

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA  
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO.

Prevalencia en cérvix de *Fusobacterium spp.* en los diferentes estadios de la historia natural del cáncer cervicouterino.

Proyecto Terminal para obtener el Grado de Maestra en Salud Pública  
con Área de concentración en Enfermedades Infecciosas.

YUVIA MICHELLE BARRERA ACOSTA  
Generación 2014-2016

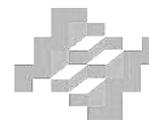
Director  
Dr. Vicente Madrid Marina- INSP-CISEI

Asesora  
Dra. Kirvis Janneth Torres Poveda- INSP-CISEI

Cuernavaca, Morelos.  
Agosto 2016.

# ÍNDICE

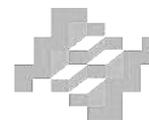
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
2.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO.	2
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO DEL CACU.	3
2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VPH.	4
2.4. MECANISMOS DE ONCOGÉNESIS DEL VPH.	4
2.5 PERSISTENCIA DEL VPH COMO FACTOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LESIÓN PREMALIGNA Y CACU.	5
<b>3. MARCO TEÓRICO.</b>	<b>6</b>
3.1. MICROBIOTA.	6
3.2. RELACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y LA MICROBIOTA.	7
3.3. SISTEMA INMUNE EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO.	8
3.4. MICROBIOTA CERVICOVAGINAL.	9
3.5. <i>FUSOBACTERIUM SPP.</i> Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE CÁNCER DE COLON.	11
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>12</b>
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	12
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	<b>12</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>13</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>13</b>
7.1. HIPÓTESIS.	13
7.2. DISEÑO DE ESTUDIO.	14
7.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO.	14
7.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.	15
7.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.	15
7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	18
<b>8. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD.</b>	<b>20</b>
<b>9. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.</b>	<b>21</b>
<b>10. RESULTADOS.</b>	<b>21</b>
10.1. MUESTRAS ANALIZADAS Y PODER DE LA MUESTRA.	21
10.2. DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.	22
10.3. ANÁLISIS BIVARIADO.	23
10.4. DETERMINACIÓN DE ODDS RATIO.	32
10.5. REGRESIÓN LOGÍSTICA.	33
<b>11. DISCUSIÓN.</b>	<b>33</b>
<b>12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.</b>	<b>36</b>
<b>13. LIMITACIONES.</b>	<b>37</b>
<b>14. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.</b>	<b>38</b>
<b>15. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>39</b>
<b>16. ANEXOS.</b>	<b>42</b>



## 1. INTRODUCCIÓN.

EL cáncer cervicouterino (CaCU) es una de las principales causas de mortalidad por neoplasia maligna en las mujeres en el mundo<sup>1-4</sup>. Nueve de cada diez muertes ocurridas por esta causa se presentan en las regiones menos desarrolladas<sup>5</sup>. En México el CaCU es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres<sup>6</sup>. Los estados de menor nivel socioeconómico presentan la mayor tasa de incidencia y mortalidad en el país<sup>1</sup>. La causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de EL CaCU, es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) <sup>4,7-9</sup>. Principalmente por los genotipos con mayor potencial oncogénico; destacándose VPH16 y VPH18<sup>8-10</sup>. Aproximadamente el 90% de las infecciones por VPH son eliminadas por el organismo de forma espontánea. Sólo en un pequeño porcentaje de mujeres que presentan infección por VPH desarrollan persistencia viral y evolucionan a una lesión escamosa intraepitelial del cérvix (LEI). La persistencia viral es por lo tanto un factor muy importante para la progresión a LEI y CaCU<sup>8</sup>.

La vaginitis bacteriana (VB) es un desorden polimicrobiano que se caracteriza por la sustitución de los *Lactobacillus* productores de peróxido de hidrogeno por grandes números de bacterias anaerobias<sup>11,12</sup>. Esta alteración de la microbiota cervicovaginal normal incrementa el riesgo de presentar infección por VPH y además contribuye a la disminución en la eliminación de la infección por parte del organismo<sup>13,14</sup>. En algunos estudios se ha observado que en los estadios avanzados de LEI y en el CaCU existe una mayor diversidad de la microbiota del cérvix y un predominio de *Fusobacterium spp.*<sup>15</sup> El género *Fusobacterium* agrupa a un conjunto de bacterias gram negativas que se han asociado a infecciones dentales, parto pre término, apendicitis y más recientemente cáncer colorectal<sup>16</sup>. Adicionalmente *Fusobacterium spp.* ha sido señalado en algunos estudios como un posible marcador biológico de infección por VPH<sup>17</sup>.



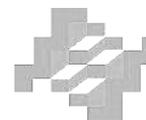
## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 Epidemiología del Cáncer Cervicouterino.

El CaCU es la cuarta causa de tumor maligno<sup>5</sup> y la causa más frecuente de muerte debida a neoplasia maligna en las mujeres a nivel mundial.<sup>1-4</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 528 000 casos nuevos de CaCU a nivel mundial para 2012, y 266 000 muertes debidas a esta causa en ese mismo año. Cerca del 85% de los casos de CaCU reportados a nivel mundial ocurren en países en desarrollo, las regiones del mundo más afectadas por esta neoplasia son el este de África, Melanesia, el Sur y Oriente de África. Lo que revela que casi 9 de cada 10 muertes por CaCU en el mundo ocurren en regiones menos desarrolladas<sup>5</sup>

Para 2012 la OMS reportó 83,000 casos nuevos de CaCU y 23,000 muertes debidas a esta causa en todo el continente americano, con una tasa de incidencia por cada 100,000 mujeres de 14.9, y una tasa de mortalidad por cada 100,000 mujeres de 5.9<sup>5</sup>. Lo que convierte al CaCU en la cuarta causa de muerte debida a cáncer en América<sup>6</sup>. Mientras que para Latinoamérica y el Caribe la OMS reporta al CaCU como la segunda causa de muerte debida a cáncer con 68,818 casos nuevos y 28,565 muertes debidas a esta causa, lo que representa una tasa de incidencia de 21.2 y una tasa de mortalidad de 8.7 que se encuentra por arriba de lo reportado en todo el continente.<sup>6</sup>

El panorama para México es muy similar al de América Latina, ya que el CaCU es la segunda causa de incidencia y mortalidad por cáncer a nivel nacional. Para el 2012 la OMS reportó 13 960 casos nuevos de CaCU en México y una tasa de incidencia de 23.3 lo que supera a la tasa de América Latina y el Caribe que presentó en este mismo año 68,818 casos con una tasa de incidencia de 12.2; además para ese mismo año México presentó 4,769 muertes por esta causa con una tasa de mortalidad de 8.1, que es ligeramente inferior a la tasa de América Latina y el Caribe que presentó 28,568 defunciones con una tasa de mortalidad del 9.9.<sup>6</sup> A pesar de que en los últimos 20 años se ha observado una disminución en la incidencia y en la mortalidad causada por el CaCU<sup>2</sup>, persiste una disparidad entre la incidencia y mortalidad entre los estados de la República Mexicana.



Estados con bajo nivel económico como Chiapas, Colima y Yucatán presentan la mayor mortalidad, mientras que Nuevo León es el estado con la menor tasa de mortalidad.<sup>1</sup>

## 2.2 Agente etiológico del CaCU.

La causa subyacente del desarrollo de CaCU es la infección por el VPH<sup>4,7-9</sup>. La infección por VPH es la infección transmitida por vía sexual más común. Se han descrito más de 170 tipos de VPH<sup>18</sup>, de los cuales por lo menos 13 poseen una gran capacidad para causar cáncer y juegan un papel esencial en el desarrollo de varios tipos de neoplasias.<sup>8-10</sup> (Ver cuadro I)

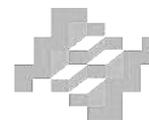
Cuadro I. Clasificación del tipo de VPH por su potencial carcinogénico.		
VPH de alto riesgo o carcinogénico	VPH de bajo riesgo	VPH probablemente carcinogénico
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	26, 53, 66

Elaboración propia de información obtenida de Muñoz y Cols.<sup>7</sup>

El VPH ha sido implicado en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Se estima que alrededor del 5% de todo el cáncer a nivel mundial se pueden atribuir a la infección por VPH. Aproximadamente el 88% de los casos de cáncer anal, 70% de los casos de cánceres vaginal, 50% de los casos de cáncer de pene, 43% de los casos de cáncer de vulva, 26% de los casos de cáncer de oro faringe y casi el 100% de los casos de cáncer de cérvix pueden ser atribuidos a la infección por VPH.<sup>8,10</sup>

Los subtipos de VPH que afectan específicamente al tracto ano genital son los subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 y 69.<sup>9</sup> Los tipos 16 y 18 son detectados en 70% de los cáncer de cérvix, el tipo 16 ha sido detectado en alrededor del 24% de las mujeres con infección por VPH, mientras que el tipo 18 se ha detectado en alrededor del 9% de las mujeres con infección.<sup>8</sup>

La prevalencia de la infección por VPH es más elevada en regiones en desarrollo como África sub-Sahariana, Latinoamérica e India. En estas regiones la prevalencia de la infección se presenta con un pico en mujeres jóvenes que disminuye después de los 35 años de edad, presentando posteriormente un segundo pico más pequeño en mujeres de mediana edad



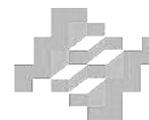
mayores de 55 años. La mayoría de los casos de CaCU se presentan en las regiones donde la prevalencia de la infección por VPH es alta. Se estima que por lo menos 80% de los cánceres atribuidos al VPH se presentan en los países subdesarrollados.<sup>8</sup>

### 2.3 Características generales del VPH.

Los VPH pertenecen a la familia Papillomaviridae y constituyen una heterogénea familia de virus no envueltos de 55nm de tamaño, que contiene DNA de doble cadena, constituidos por 72 capsómeros, que presentan tres regiones codificantes en su genoma, la región E que codifica para las proteínas tempranas, la región L que codifica para las proteínas tardías y la región LCR de control que se relaciona con las regiones E y L.<sup>9,18</sup> Las regiones E1/E2 codifican para proteínas que controlan la función de los genes de E6 y E7, la región E4 está implicada en la liberación del virus de la célula, la región E5 codifica para una proteína hidrófoba que promueve la immortalización de la célula, la región E6 codifica para proteínas que inhiben reguladores negativos del ciclo celular especialmente la inhibición del factor de transcripción p53, la región E7 codifica para una proteína que se une al supresor de tumor Rb permitiendo de ese modo a la célula progresar a través del ciclo celular en ausencia de señales mitogénicas normales, las regiones L1 / L2 codifican para proteínas estructurales para la función viral tardía y para la formación de partículas virales completas; finalmente LCR es una región de control que se encuentra entre las regiones E y L; necesaria para la replicación del virus y el control de la expresión génica.<sup>9,18,19</sup>

### 2.4. Mecanismos de oncogénesis del VPH.

El VPH infecta únicamente a células epiteliales y depende de las vías de diferenciación de estas para completar su ciclo de replicación. Infecta las células de la capa basal del epitelio del cérvix, probablemente a través de micro abrasiones presentes en la superficie epitelial. Después de algunas horas el ADN viral es extraído de la cápside y transportado al núcleo como material genético libre o episomal, la replicación ocurre solamente en células diferenciadas supra basales que no expresan la maquinaria replicativa que requiere el VPH para su supervivencia; por lo que el virus codifica las proteínas E6 y E7 para promover la proliferación celular, prolongar la progresión del ciclo celular y prevenir la apoptosis. Bajo

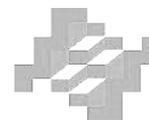


estas condiciones la célula es permisiva para la replicación viral y cientos de miles de genomas del VPH son generados por una sola célula, las proteínas de la cápside codificadas por las regiones L1 y L2 son expresadas en las capas más superficiales del epitelio ya que ahí es donde se realiza el ensamblaje viral, y el desprendimiento de nuevos viriones de la superficie epitelial. El ciclo de replicación del VPH toma aproximadamente de 2 a 3 semanas.<sup>8,18</sup>

Las células permanecen activamente involucradas en el ciclo celular y así se detiene la apoptosis. La inestabilidad genómica resultante permite la acumulación de alteraciones genéticas. Generando la transformación maligna de la célula infectada con VPH en una célula cancerosa invasiva. E6 y E7 comienzan la oncogénesis gracias a su interacción con las proteínas sintetizadas por genes supresores de tumor. E6 interactúa con RBL1 Y RBL2, uniéndose a ellas y degradándolas. Esto resulta en la liberación y activación de factores de transcripción E2F , estos factores dirigen la transcripción de genes de la fase S, incluyendo las ciclinas A y E, las cuales precipitan la entrada al ciclo celular y además promueven la síntesis de ADN.<sup>8,18</sup>

## 2.5 Persistencia del VPH como factor de riesgo para el desarrollo de lesión premaligna y CaCU.

Alrededor del 90% de las infecciones por VPH se auto limitan espontáneamente en un periodo de 6 a 18 meses. En pocas mujeres la infección por VPH persiste y después de un periodo de latencia evoluciona a una lesión escamosa intraepitelial del cérvix (LEI), esta lesión puede presentar regresión o evolucionar a CaCU.<sup>8,18</sup>. Por lo que la infección persistente es un prerrequisito para la progresión a LEI. La probabilidad de eliminar al VPH depende de la duración de la infección; así, la persistencia viral reduce la probabilidad de eliminación de la infección y de la LEI. Se ha observado además que las infecciones en mujeres mayores de 30 años persisten más que en las mujeres más jóvenes.<sup>8</sup> La infección por VPH puede ser definida como persistente cuando existen dos o más resultados positivos para VPH con un intervalo de tiempo de seis meses entre cada resultado<sup>8</sup>.



### 3. MARCO TEÓRICO.

#### 3.1. Microbiota.

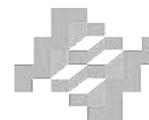
La metagenómica es una aproximación biotecnológica que permite el estudio de las secuencias genéticas de microorganismos obtenidos directamente de su hábitat, gracias a ella existe evidencia de que más de mil especies de microorganismos viven en el cuerpo humano. La metagenómica tiene el potencial de descubrir genes, familias de genes y las proteínas que codifican, lo que podría tener una gran relevancia biotecnológica y farmacéutica. Recientemente varios proyectos internacionales se han emprendido como The Human Microbiome Project (HMP) financiado por los Estados Unidos, Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) financiado por la Unión Europea y The Internacional Human Microbiome Consortium (IHMC), financiado por un consorcio integrado por instituciones Europeas, Canadienses, Chinas y Estadounidenses, con la finalidad de caracterizar la microbiota humana y comprender el papel de las cepas patogénicas y no patogénicas y su interacción con la genética del hospedero.<sup>20</sup>

El término microbiota hace referencia a la población de microbios (procariotas, virus y eucariotas) que viven como comensales en sitios anatómicos del ser humano como el intestino, la piel, el tracto genitourinario y las vías respiratorias altas. La microbiota humana es una comunidad dinámica conformada por la interacción de múltiples especies de microorganismos (más frecuentemente bacterias) y el huésped. La asociación microbiana de estas especies está determinada por fuerzas ecológicas y evolutivas como son:

- Los procesos de colonización sujetos a la dispersión, la ecología y la oportunidad.
- El apropiamiento de sitios del cuerpo impulsado por la interacción del genotipo del hospedero y los microbios.
- La competencia de las células por los recursos y la selección natural.<sup>21</sup>

Se estima que el ser humano está conformado por 40 billones de células y 22000 genes propios, además de 100 trillones de células y 2 millones de genes microbianos; lo que quiere decir que la microbiota supera en número de 10 a 1 a las células del cuerpo humano y expresa 10 veces más genes que los expresados por el hospedero.<sup>21-24</sup>.

Estudios de comparación realizados entre gemelos dicigotos y monocigotos, han demostrado que mucha de la variación del sistema inmunológico en los humanos, es determinada por



influencias no heredables provenientes del ambiente, incluyendo la microbiota.<sup>21</sup> Las comunidades microbianas juegan un papel fundamental en la inducción y capacitación del sistema inmune; por su parte el sistema inmune se ha desarrollado para facilitar una relación simbiótica con estas comunidades. Por lo que una gran fuerza que ha dirigido la evolución del sistema inmune, es la necesidad de mantener una relación homeostática con la microbiota, esta relación incluye la interacción de la microbiota con los tejidos del hospedero; así como los factores que determinan la composición de los conjuntos microbianos.<sup>20,21,24,13,25</sup>

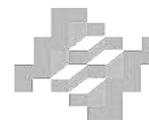
### 3.2. Relación del sistema inmune y la microbiota.

El establecimiento de la microbiota es un proceso dinámico que ocurre en los primeros años de vida. Para poder llevar a cabo este proceso el sistema inmune cuenta con varios mecanismos que evitan el desequilibrio de la relación entre la microbiota y el huésped. A pesar de que la mayoría de estos mecanismos han sido estudiados y descritos en el intestino, pueden ser aplicados a la microbiota de otras áreas. La estratificación controla la exposición de los tejidos del hospedero a los microorganismos, que generalmente son bacterias; con la finalidad de disminuir el contacto entre las células epiteliales y los microbios. Algunos mecanismos empleados para llevar a cabo la estratificación son:

- El revestimiento mucoso del intestino formado por la secreción de mucina de las células calciformes que forma una barrera de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de espesor, que evita el contacto entre las bacterias y las células epiteliales.
- La inmunoglobulina A (IgA) secretada por los linfocitos B de las placas de Peyer que evita la translocación bacteriana al unirse a las bacterias.<sup>25</sup>

Por otra parte la compartimentalización confina las bacterias que logran penetrar al intestino a determinados sitios y limita su exposición al sistema inmune. Algunos mecanismos que favorecen la compartimentalización son:

- La lecitina antibacteriana RegIIIy expresada por las células epiteliales, le proporciona resistencia a la capa mucosa interna del intestino contra la penetración bacteriana, a diferencia de lo que ocurre en la capa externa que está expuesta a un gran número de



bacterias; esta resistencia restringe así el contacto de las células epiteliales con las bacterias intestinales.

- La producción de interleucina 22(IL-22) por parte de las células linfoides innatas que residen en la lámina propia del intestino, que ayuda a contener las bacterias residentes y previene su diseminación sistémica.
- La secreción por las células de Paneth de la  $\alpha$ -Defensina, un pequeño péptido (2-3KD) con propiedades antibacteriales.<sup>25</sup>

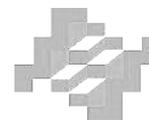
El sistema inmune también es moldeado por la microbiota, ya que algunos componentes de los microbios son necesarios para el desarrollo y la activación del mismo. Algunos ejemplos de esta interrelación son:

- La necesidad de la presencia de microbiota para el desarrollo de los folículos linfáticos en el intestino delgado.
- La presencia de lipopolisacárido o flagelina desencadena una vía de señalización dependiente de MyD88 que induce la expresión de proteínas antimicrobianas.
- La producción de IgA e IL22 depende de la presencia de componentes bacterianos como lipopolisacáridos y flagelina.<sup>25</sup>

Los efectos de la microbiota en la inmunidad del huésped se extiende más allá del intestino, se ha observado en modelos animales como pez cebra y en ratones que la microbiota contribuye al desarrollo de neutrófilos, la homeostasis y al desarrollo y diferenciación de linfocitos T y B. Además de las interacciones con el sistema inmunológico, los microbios interactúan con otros microorganismos; ya que algunas bacterias facilitan la infección del anfitrión por virus. Por ejemplo, el norovirus humano infecta a las células B probablemente ayudado por la unión del virus al grupo histo-sanguíneo de las bacterias que expresan el antígeno tales como *Enterobacter cloacae*. Por lo tanto la composición de la microbiota puede promover o inhibir la infección viral en función del tipo de virus.<sup>24</sup>

### 3.3. Sistema inmune en el tracto genital femenino.

El ambiente del tracto genital femenino puede ser dividido en tres grandes áreas; el área no estéril de la vagina y el ectocérvix, el área estéril del útero y las trompas de Falopio, y



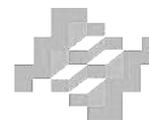
finalmente el área del endocérvix en donde la esterilidad está relacionada con la fase del ciclo menstrual.<sup>26</sup> El área no estéril como la vagina y el ectocérvix enfrentan el desafío de mantener un equilibrio entre la tolerancia a la microbiota residente y la defensa contra bacterias patógenas. Este equilibrio se lleva a cabo mediante la interacción de los componentes innatos y adaptativos del sistema inmune<sup>27</sup>.

Las células epiteliales de la mucosa vaginal actúan como una barrera física y como un mediador inmunológico que provee la primera defensa contra infecciones potenciales, además desempeñan un papel de gran importancia en la iniciación y organización de la respuesta inmune. Estas células forman una barrera altamente selectiva mediante las uniones estrechas intercelulares, que evitan la penetración de microorganismos oportunistas y patógenos; también secretan una capa de moco que protege la mucosa y provee un medio para péptidos, proteínas y moléculas orgánicas.<sup>26-28</sup> Además las células epiteliales en conjunto con macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y NK reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como los lipopolisacáridos de las bacterias gram-, o los peptidoglicanos y ácido lipoteicoico de las bacterias gram+, mediante los receptores de reconocimiento de patrones moleculares o (PRRs), este reconocimiento desencadena la producción y secreción de sustancias antimicrobianas como IL6 e IL8, lisozima, lactoferrina, entre otros pequeños péptidos.<sup>26,27</sup>

Por otra parte las células epiteliales también juegan un papel importante en la activación del componente adaptativo del sistema inmune. Esta función se lleva a cabo mediante la presentación de antígenos a los linfocitos T residentes mediante las moléculas de histocompatibilidad (CMH I y CMH II), la activación de células presentadoras de antígeno (CPA) como las células dendríticas o los macrófagos, los cuales al presentar antígenos a linfocitos T y B contribuyen a la diferenciación y activación de los mismos, lo que genera la producción de (IgA) y la producción de interleucinas que tiene la finalidad de contener y eliminar los patógenos.<sup>26-28</sup>

### 3.4. Microbiota cervicovaginal.

Cada día existe más evidencia de que las comunidades bacterianas que habitan la región cervicovaginal sirven como una importante línea de defensa. La colonización cervicovaginal por *Lactobacillus spp.*, es crítica para mantener la salud vaginal en las mujeres. Estas



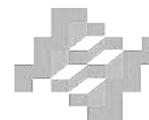
bacterias son comúnmente encontradas en el epitelio cervicovaginal y contribuyen a inhibir el crecimiento de bacterias patógenas mediante la competencia con otros microorganismos por nutrientes, la reducción del pH vaginal mediante la producción de ácidos orgánicos especialmente ácido láctico, la producción de sustancias bactericidas como las bacteriocinas y el peróxido de hidrógeno y la modulación de la respuesta inmune local, además los *Lactobacillus spp.*, también pueden inhibir la colonización de bacterias como *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp* grupo B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Prevotella*, al competir por los receptores usados por estos patógenos.<sup>13,26,17,12,11</sup>

Más de 20 especies de *Lactobacillus* se han detectado en el epitelio cervicovaginal; sin embargo; la mayoría de las mujeres presenta predominantemente cuatro especies, *L. Crispatus*, *L. Iners*, *L. Jensenii* y *L. Gasseri*. Bacterias como *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Veillonella*, *Bifidobacterium* y *Candida* también pueden estar presentes en la mucosa vaginal, aunque en menor número que los *Lactobacillus*.

La composición de las comunidades microbianas está influenciada por factores como la edad, las fluctuaciones hormonales, la actividad sexual, el uso de medicamentos y la higiene.<sup>12,11,29</sup>. La alteración del equilibrio de la microbiota vaginal se denomina disbiosis y es consecuencia de la reducción de los *Lactobacillus*. Esta alteración puede manifestarse como dos condiciones patológicas:

1) Vaginitis aerobia (VA) en la cual los *Lactobacillus* son remplazados por patógenos facultativos tales como *Escherichia coli*, Enterococos, *Staphylococcus spp*, y *Streptococcus* grupo B.

2) Vaginitis bacteriana (VB) que es un desorden polimicrobiano que afecta entre el 20 a 25% de las mujeres, y se caracteriza por la sustitución de los *Lactobacillus* productores de peróxido de hidrogeno por grandes números de bacterias anaerobias como, *Prevotella spp.*, *Mobiluncus spp.*, *G. vaginalis*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*; este incremento se asocia a la producción de enzimas proteolíticas lo que causa la degradación de los péptidos de la vagina en una variedad de aminas que en un pH elevado se tornan malolientes, lo que contribuye a la activación de interleucinas pro inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-8.<sup>12,11</sup>



La presencia de VB se ha asociado con un incremento en el riesgo de presentar infecciones transmitidas sexualmente causada por bacterias como, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*; e infecciones virales causada por herpes virus tipo 1 y 2 y VPH.<sup>17,30</sup>. En un metaanálisis elaborado por Gillete y cols. se reportó que existe una asociación positiva entre la VB y el VPH, ya que las mujeres que presentan VB tienen 1.43 más veces la posibilidad de presentar infección por VPH en el cérvix (95% CI, 1.11- 1.84,  $p = 0.005$ )<sup>30</sup>. Por otra parte Guo y cols., y Brotman y cols. observaron una disminución en la eliminación de VPH en aquellas mujeres con VB<sup>13,14</sup>. Además Clarke y cols., Dols y cols., Gao y cols., y Lee y cols., reportaron que la infección por VPH está asociada a cambios en la microbiota vaginal, con disminución de la población de *Lactobacillus* y el incremento en la diversidad de la microbiota<sup>17,31,32</sup>. De acuerdo a lo reportado por Lee y cols, las especies más abundantes en los grupos de mujeres con infección por VPH son principalmente *Fusobacterium ssp.*, ( $p < 0.05$ ) y *Sneathia spp*, señalando que estas podrían ser posibles marcadores de infección por VPH<sup>17</sup>.

Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Audirac-Chalifour y cols, en un estudio realizado en mujeres sin lesión en cérvix, con LEI y con CaCU, en el cual se observó que la diversidad de la microbiota del cérvix es mayor en estadios avanzados de CaCU; y que las mujeres con LEI o CaCU presentaban un predominio de *Fusobacterium spp.*<sup>15</sup>

### 3.5. *Fusobacterium spp.* y su relación con el desarrollo de cáncer de colon.

El género *Fusobacterium* agrupa a un conjunto de bacterias Gram negativas y aerobias estrictas que se han asociado a infecciones dentales, parto pre término, apendicitis y más recientemente a cáncer colorectal <sup>16</sup>. *Fusobacterium nucleatum* y *Fusobacterium necrophorum* son los patógenos que con mayor frecuencia se aíslan de este género. *Fusobacterium nucleatum* es un miembro común de la microbiota orofaríngea en los humanos<sup>33</sup>. Recientemente se ha estudiado la relación de *Fusobacterium nucleatum* con el cáncer colorectal. En un estudio desarrollado por Ya-Nan y cols. se encontró que la presencia de *Fusobacterium nucleatum* se incrementa conforme avanza el grado de malignidad en el tejido colorectal. Además encontraron en un modelo de ratón que la presencia de *Fusobacterium nucleatum* incrementa los niveles de IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-31 y CD40<sup>34</sup>. En el estudio realizado por Kosuke y cols. se encontró que la cantidad de *Fusobacterium nucleatum* es mayor en el tejido de carcinoma colorectal que en el tejido no



tumoral adyacente<sup>35</sup>. Por otra parte en los estudios realizados por Ya.Nan y cols. y Kostic y cols. se encontró que *Fusobacterium nucleatum* promueve el desarrollo de cáncer de colon en ratones en comparación con aquellos sin *Fusobacterium*.<sup>36</sup>

## 4. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la prevalencia de *Fusobacterium spp.*, a nivel del cérvix en los diferentes estadios de la historia natural del CaCU.

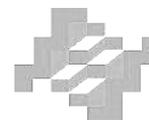
### 4.1. Objetivos específicos

- Clasificar la población de estudio de acuerdo al diagnóstico histopatológico de cérvix.
- Describir las características de salud sexual y reproductiva de la población de estudio
- Determinar la frecuencia de *Fusobacterium spp.*, a nivel del cérvix en los diferentes estadios de la historia natural del CaCU.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El CaCU es la segunda causa de muerte debido a tumores en las mujeres en México. Se ha demostrado que la infección de las células epiteliales del cérvix por el VPH es la causa subyacente del desarrollo de esta neoplasia. Alrededor de 90% de las infecciones del cérvix por el VPH se eliminan de manera espontánea; y el 10% restante persisten. La persistencia del VPH en las células epiteliales del cérvix es un prerrequisito para la progresión hacia CaCU.

Un factor importante que recientemente se ha asociado a la persistencia de la infección por VPH, es la alteración de la microbiota a nivel de cérvix; ya que se ha observado que las mujeres VPH positivas presentan una mayor variedad de especies bacterianas en la microbiota del cérvix. Adicionalmente, en un estudio piloto se ha reportado una frecuencia mayor de *Fusobacterium spp* en cérvix en mujeres con LEI y CACU, por lo que se requiere de la validación de estos hallazgos en un estudio transversal con mayor número de



muestras, para ver la representatividad de este género bacteriano por estadio de la enfermedad.

Ante esta información se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la prevalencia en cérvix de *Fusobacterium spp.*, en los diferentes estadios de la historia natural del cáncer cervicouterino?

## 6. JUSTIFICACIÓN.

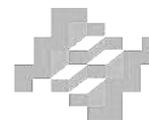
En un estudio previo realizado por Audirac-Chalifour y colaboradores, en el cual se analizó la diversidad y composición de la microbiota del cérvix de mujeres con infección por VPH, LEI y CaCU; se observó que la diversidad de la microbiota en cérvix se incrementa paralelamente a la progresión del grado de malignidad de las lesiones intraepiteliales. Además se observó que especies del género *Fusobacterium spp.*, se presentaban predominantemente en las mujeres con LEI y CaCU <sup>15</sup>. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lee y Cols. en un estudio realizado a una cohorte de mujeres gemelas en Corea; en donde se observó que *Fusobacterium spp.*, era el género bacteriano más abundante en aquellas mujeres que presentaba infección por VPH <sup>17</sup>. Por lo que determinar la prevalencia de *Fusobacterium spp.*, en mujeres sin infección por VPH, con infección por VPH, con LEI y CaCU, podría contribuir a dilucidar la representatividad de este género bacteriano en los diferentes estadios de la historia natural del CaCU.

De encontrarse una representatividad mayor de *Fusobacterium spp.*, en los estadios avanzados de la enfermedad; se podrían sentar las bases para que se deriven estudios futuros que demuestren el mecanismo causal de esta posible asociación; y poder así proponer a *Fusobacterium spp.*, como un potencial biomarcador microbiológico que podría evaluarse en las mujeres con infección por VPH.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1. Hipótesis.

En un estudio exploratorio realizado por Audirac-Chalifour y colaboradores <sup>15</sup> denominado “Asociación de la composición de la microbiota y el perfil de citocinas en cérvix con los distintos estadios de la historia natural del cáncer cervicouterino”, se observó la existencia de mayor diversidad de microbiota del cérvix en mujeres con LEI y CaCU en comparación



con las mujeres que no presentaban LEI, VPH+ y VPH-. Además se observó que la especie más predominante en las mujeres con LEI y CaCU era *Fusobacterium spp.*

Por lo que se plantea la siguiente hipótesis:

- Existe una mayor prevalencia de *Fusobacterium spp.* en los casos de LEI y CaCU, en comparación con las mujeres sin lesión escamosa intraepitelial.

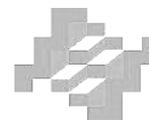
## 7.2. Diseño de estudio.

Se realizó un estudio de tipo observacional con diseño transversal. La fuente de datos fue primaria; analizándose los datos obtenidos del procesamiento de 460 muestras de ADN extraído de exudados y biopsias de cérvix que forman parte de un banco biológico de muestras de cérvix que se conformó en el proyecto madre “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical”.

## 7.3. Población de estudio.

El presente estudio se encontró anidado en el proyecto madre “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical”; el cual se aprobó por los comités de bioseguridad, investigación y ética en investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) (Ver Anexo 1). En este estudio se integró un banco de ADN obtenido de exudados de cérvix de mujeres sin lesión en cérvix y de biopsias de cérvix de mujeres con LEI y CaCU que firmaron el consentimiento informado y accedieron a que sus muestras pudieran ser utilizadas en otros proyectos de investigación (ver Anexo 2) En el presente estudio la población estuvo conformada por 445 muestras de ADN proveniente de exudado de cérvix de mujeres sin lesión en cérvix, con LEI y con CaCU, con y sin VPH (Ver Cuadro II), que acudieron por atención ginecológica en el periodo comprendido de Junio de 2008 a Noviembre del 2011 al centro de atención para la salud de la mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos (CAPASAM) y al Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

### Cuadro II. Distribución del número de muestra por grupo de estudio.



Grupo de estudio	Numero de muestras
Sin lesión	61
Lesión escamosa intraepitelial	237
Cáncer cervicouterino	147
Total de muestras	445

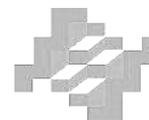
#### 7.4. Criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión para el proyecto madre fueron acceder voluntariamente a participar y firmar el consentimiento informado, tener más de 18 años de edad, contestar en su totalidad el cuestionario conformado por 40 reactivos, resultado de tipificación de VPH y contar con diagnóstico citológico, colposcópico o histológico de: LEI de bajo grado, LEI de alto grado, CaCU o negativo a alteraciones histopatológicas. Los criterios de exclusión para el proyecto madre fueron el padecer de una enfermedad autoinmune, presentar un cuadro inflamatorio o referir antecedente de infección de transmisión sexual diferente a VPH.

Para el presente estudio se incluyeron aquellas muestras obtenidas de mujeres que no tuvieron el antecedente de utilización de antibióticos o antimicóticos en los 30 días previos a la toma de la muestra. Fueron eliminadas aquellas muestras con las que no se contó con una cantidad suficiente e integridad adecuada del ADN para realizar la técnica de detección de *Fusobacterium spp.* La integridad del ADN se estableció mediante la amplificación del gen endógeno GA3PDH de las muestras de cérvix pre-seleccionadas para el estudio.

#### 7.5. Procesamiento de muestras.

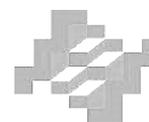
Inicialmente se realizó las diluciones que se requirieron para obtener una concentración de ADN en las muestras de 50ng/μl. Posteriormente se realizó la determinación de la integridad del ADN de las muestras mediante la amplificación del gen endógeno GA3PDH mediante PCR punto final, utilizando primers específicos para dicho gen y bajo condiciones de reacción y de amplificación descritos en los cuadros 3 al 6. Se utilizó un control positivo y un control negativo para garantizar el adecuado procesamiento de las muestras. Posteriormente se analizaron las alícuotas producto de la PCR a través de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observó la presencia del amplicón de interés mediante la tinción de los geles con bromuro de etidio y su visualización en foto documentador, se utilizó líder-50 como marcador del tamaño de los amplicones.



Finalmente se realizó la búsqueda de los genes específicos de *Fusobacterium spp.* (rpIF-F y rpIB-F) únicamente en las muestras que fueron positivas para el gen endógeno GA3PDH. Se realizó PCR punto final utilizando los primers sentido “forward” (rpIB-F. 5-‘AGACCTGAAAARTCTTTAAC-3’ y rpIF-F. 5’-AGAGTAGGTAAAAAACCTA-3’) y los antisentido o “reverse” (rpIB-R-5’-CGTTTCTTCTTCTTAGCATA-3’ y rpIF-R 5’-TTTTACCTTCTTTTCTTC-3’). Se realizó electroforesis en gel de acrilamida al 10% de las muestras procesadas por PCR punto final, para observar la presencia de los amplicones de interés, esto mediante la tinción de los geles con bromuro de etidio y su visualización en foto documentador. Con este procedimiento se pudo determinar la presencia de los genes específicos de *Fusobacterium spp.* en las muestras de ADN analizadas.

<b>Cuadro III. Condiciones de reacción de PCR para el gen GA3PDH</b>			
Reactivo	Concentración inicial	Concentración requerida.	Volumen por reacción 25µl
Buffer	10X	1X	2.5µL
Primer 347F	pmol/µL	10 pmol/µL	1µL
Primer 803R	pmol/µL	10 pmol/µL	1µL
dNTP's	25mM	0.2mM	2µL
MgSO <sub>4</sub>	50mM	1.5mM	0.75µL
Taq	5 U/µL	0.1 U/µL	0.1µL
Agua	-----	-----	16.65 µL
ADN	Variable	50ng	1µL

<b>Cuadro IV. Condiciones de reacción de PCR para genes específicos de <i>Fusobacterium spp.</i> (rpIF-F y rpIB-F)</b>			
Reactivo	Concentración inicial	Concentración requerida.	Volumen por reacción 25µl
Buffer	10X	1X	2.5µL
Primer sentido	rpIB:31 nanomoles. rpIF:30.7 nanomoles	10 pmol/µL	1µL
Primer anti sentido	rpIB:23.9 nanomoles. rpIF:30.7 nanomoles	10 pmol/µL	1µL
dNTP's	25mM	0.2mM	2µL
MgSO <sub>4</sub>	50mM	1.5mM	0.75µL
Taq	5 U/µL	0.1 U/µL	0.1µL
Agua	-----	-----	16.65 µL
ADN	Variable	50ng	1µL

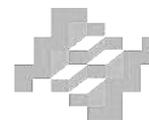


**Cuadro V. Condiciones de amplificación para el gen GA3PDH**

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94 °C	3min
30 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	30seg
Alineación	55 °C	30 seg
Extensión	68 °C	30 seg
Extensión final		
	68 °C	5min

**Cuadro VI. Condiciones de amplificación para *Fusobacterium spp.***

<b>Gen rplB de <i>Fusobacterium spp.</i></b>		
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94 °C	5 min
35 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	1 min
Alineación	54 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final		
	72 °C	5min
<b>Gen rplF de <i>Fusobacterium spp.</i></b>		
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94 °C	5 min
35 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	1 min



Alineación	50 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	5min

### 7.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico stata13 (StataCorpLP).

Las variables que fueron analizadas son las siguientes: (Ver Cuadro VII):

- Variable dependiente: Resultado para detección de *Fusobacterium spp.*
- Variables independientes: variables sociodemográficas (edad, etnicidad, nivel socioeconómico, ocupación, nivel educativo, tabaquismo e IMC). Variables gineco-

Cuadro VII. Tipos de variables y escalas de medición utilizadas en el análisis		
Nombre de la Variable	Tipo de variable	Escala de medición
<b>Variables Sociodemográficas</b>		
Edad	Numérica	Razón
Etnicidad	Categórica dicotómica	Nominal
Nivel socioeconómico	Categórica dicotómica	Nominal
Ocupación	Categórica politómica	Nominal
Nivel educativo	Categórica politómica	Ordinal
Tabaquismo	Categórica dicotómica	Nominal
IMC	Numérica	Intervalo
<b>Variables Gineco-Obstétricas</b>		
Edad de menarca	Numérica	Razón
Edad de inicio de la vida sexual	Numérica	Razón
Edad de primer parto	Numérica	Razón
Antecedentes familiares de CaCU	Categórica dicotómica	Nominal
Número de parejas sexuales	Categórica dicotómica	Nominal
Número de gestaciones	Categórica dicotómica	Nominal
Método de planificación familiar	Categórica politómica	Nominal
Antecedentes de ITS's	Categórica politómica	Nominal
<b>Variables Infecciosas</b>		
Infección por VPH	Categórica dicotómica	Nominal
Genotipos oncogénicos	Categórica politómica	Nominal
Coinfección de VPH	Categórica dicotómica	Nominal
Anticuerpos contra VHS-2	Categórica dicotómica	Nominal
Infección activa de VHS-2	Categórica dicotómica	Nominal
Determinación de <i>Chlamydia trachomatis</i> por PCR	Categórica dicotómica	Nominal
Resultados de <i>Fusobacterium spp</i>	Categórica dicotómica	Nominal



obstétricas (Edad de menarca, edad de inicio de la vida sexual, edad de primer parto, antecedentes familiares de CaCU, número de parejas sexuales, número de gestaciones, método de planificación familiar, antecedentes de ITS's). Variables infecciosas (infección por VPH, genotipos oncogénicos, coinfección de VPH, anticuerpos contra VHS-2, infección activa por VHS-2, determinación de *Chlamydia trachomatis* por PCR y resultados de *Fusobacterium spp.*).

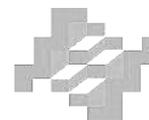


Se realizó un análisis descriptivo de las variables sociodemográficas, gineco-obstétricas e infecciosas. Posteriormente se realizó un análisis bivariado entre el diagnóstico histopatológico y las variables independientes (sociodemográficas, gineco-obstétricas e infecciosas); así como un análisis bivariado entre el resultado de *Fusobacterium spp.* y las variables independientes (sociodemográficas, gineco-obstétricas e infecciosas usando la prueba de  $\chi^2$  o Kruskal Wallis para las variables categóricas y continuas, respectivamente. Finalmente se realizó un análisis de regresión logística ajustando por las variables independientes que resultaron asociadas en el análisis bivariado; para determinar si existía asociación entre la presencia de *Fusobacterium spp.* y los diferentes estadios de lesión intraepitelial y CaCU ajustando por las variables edad, nivel socioeconómico, número de parejas sexuales, antecedentes de ITS's ,método de planificación familiar, infección por VPH de alto riesgo y VPH16. Se determinaron los Odds ratios (OR) con sus respectivos intervalos de confianza (IC).

## 8. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD.

Este estudio se encontró anidado en el proyecto madre “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical” el cual se aprobó por las comisiones de investigación, bioseguridad y ética del Instituto Nacional de Salud Pública (Ver Anexo 1). Además se contó con el consentimiento escrito de las participantes del proyecto madre que aceptaron que sus muestras pudieran ser utilizadas por el grupo de investigación en otras investigaciones (Ver Anexo 2). Se contó con una carta de autorización por parte del Dr. Vicente Madrid Marina titular del proyecto “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical” para poder acceder a la base de datos y al banco de ADN derivado de este proyecto (Ver Anexo 3).

Este proyecto contó con la aprobación de las comisiones de bioseguridad y ética del Instituto Nacional de Salud Pública (Ver Anexo 4). Las muestras analizadas fueron identificadas por una etiqueta numérica por lo que el nombre de las participantes se mantuvo confidencial. Únicamente el equipo de trabajo de este estudio tuvo acceso a la información derivada del



mismo. Durante la realización de este estudio no se expuso a ningún participante a riesgo físico, psíquico o moral, por lo que este estudio tuvo un riesgo bajo.

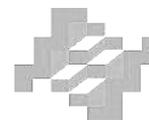
## 9. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.

Este estudio fue posible debido a que el proyecto contó con el apoyo de CONACyT para su realización; a través del proyecto titulado “Microbioma de cérvix en los diferentes estadios que llevan al desarrollo de cáncer cervicouterino” con número de registro SEP CB-2011-01-169552.

## 10. RESULTADOS.

### 10.1. Muestras analizadas y poder de la muestra.

Se analizaron 445 muestras del cérvix para determinar la expresión del gen endógeno GA3PDH, de las cuales se eliminaron 84 muestras por no presentar amplificación de dicho gen. Las muestras positivas a GA3PDH fueron analizadas para al menos uno de los genes específicos de *Fusobacterium spp.* (rplB o rplF). Encontrándose que de las 361 muestras que amplificaron el gen endógeno, 39 fueron positivas para *Fusobacterium spp.* (Ver cuadro VIII). Se calculó el porcentaje de pérdida por grupos de estudio, encontrando que el grupo sin lesión presentó el mayor porcentaje. Por lo que se calculó el poder de la muestra utilizando la prevalencia en el grupo sin lesión y la prevalencia en el grupo de CaCU y sus respectivos tamaños de muestra para calcularla. Obteniendo un poder del 91%. Sin embargo, al calcular el poder de la muestra entre grupos se observó que el poder entre el grupo sin lesión y con lesión fue del 20%, esto debido a la baja prevalencia para *Fusobacterium spp.*, que ambos grupos presentan. El poder de la muestra calculado entre los grupos con lesión y CaCU fue de 90%.

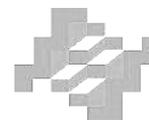


<b>Cuadro VIII. Distribución de muestras positivas a <i>Fusobacterium spp.</i> por grupos de estudio.</b>			
	<b>Sin lesión</b>	<b>Con lesión</b>	<b>Cáncer</b>
<i>Muestras incluidas en el análisis</i>	61	237	147
<i>Muestras eliminadas</i>	18	32	34
<i>Porcentaje de muestras eliminadas</i>	29.5%	13.5%	23.1%
<i>Muestras positivas GA3PDH</i>	43	205	113
<i>Muestras positivas para <i>Fusobacterium spp.</i></i>	1	11	27
<i>Porcentaje de muestras positivas a <i>Fusobacterium spp.</i></i>	2.3%	5.3%	23.8%

## 10.2. Distribución de las variables incluidas en el estudio.

Se realizó el análisis de la distribución de las variables continuas y categóricas que se utilizaron para este estudio. Para las variables sociodemográficas se observó que la media de edad fue de 40.3 años, la media para el IMC fue de 26.40. El 86.43% del grupo de estudio pertenecía a etnicidad blanca; el 73.13% pertenece a un nivel socioeconómico bajo, el 75.07% negó tener antecedentes de tabaquismo, el 88.92% del grupo no refirió antecedentes familiares de CaCU, el 92.24% refirió dedicarse al hogar, y la mayoría del grupo refirió tener un nivel educativo de analfabeta o primaria con un 48.20%.

En cuanto a las variables gineco-obstétricas e infecciosas se observó que la media edad de menarca fue de 12.84 años. La media para la edad de inicio de la vida sexual fue de 17.9 años. La media para la edad del primer parto fue de 19.9 años. La mayoría refirió utilizar algún método no hormonal para la planificación familiar con un 44.60%. El 56.79% tenía antecedentes de 3 o menos gestaciones. La mayoría refirió haber tenido 3 o menos parejas sexuales con un 85.87%. El 65.37% tenía antecedentes de alguna infección de transmisión sexual. El 85.04% presentaba una infección por VPH. El 81.44% del grupo presentó una infección por un genotipo de alto riesgo de VPH. El genotipo oncogénico más prevalente fue



el VPH16 con un 46.26%. La mayoría del grupo presentó una mono infección por VPH con un 81.99%.

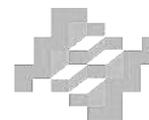
El 74.24% presentó un resultado negativo para anticuerpos contra VHS-2, adicionalmente sólo el 5.82% presento una infección activa por VHS-2. El 98.06% presentó un resultado negativo para *Chlamydia trachomatis*. El 56.79% presentó un diagnóstico histopatológico de lesión, el 31.30% de CaCU y el 11.91% presentó un diagnóstico sin lesión. Finalmente el 89.20% del grupo presentó un resultado negativo para *Fusobacterium spp.*; mientras que la prevalencia global de *Fusobacterium spp.* fue de 10.80%.

### 10.3. Análisis bivariado.

Se realizó un análisis bivariado entre los grupos de diagnóstico histopatológico (sin lesión, lesión y CaCU) y las variables sociodemográficas (edad, etnicidad, nivel socioeconómico, ocupación, nivel educativo, tabaquismo e IMC) (Ver Cuadro IX). Se observó que la media de edad es mayor en aproximadamente 15 años para el grupo de CaCU en comparación con los grupos sin lesión y con lesión ( $p= 0.001$ ). La mayoría de las mujeres de los tres grupos de estudio eran de raza blanca, siendo el grupo de CaCU el de mayor porcentaje con un 91.15% ( $p=0.0001$ ).

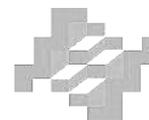
En lo que respecta al nivel socioeconómico se observa que mientras que el 86.05% del grupo sin lesión pertenece a un nivel socioeconómico medio alto /alto, para los grupos con lesión y CaCU el 20% y el 16.81% respectivamente, pertenecen a este nivel socioeconómico ( $p=0.0001$ ). Se observó que en los grupos con lesión y CaCU la mayoría de las mujeres se dedicaba al hogar con un 97.56% y un 98.23% respectivamente; mientras que en el grupo sin lesión solo el 51.16% se dedicaba al hogar ( $p=0.0001$ ).

En cuanto al nivel educativo se observó que el grupo sin lesión tuvo un mayor porcentaje que pertenece a un nivel profesionalista o técnico con un 53.49%, mientras que en el grupo con lesión el nivel educativo de secundaria/preparatoria tiene el mayor porcentaje con un 48.78% y para el grupo con CaCU el nivel educativo de analfabeta/primaria tuvo el mayor porcentaje con un 74.34% ( $p=0.0001$ ). Para la variable de IMC se observó que el grupo de CaCU tuvo la mayor media de los tres grupos de estudio con 27.14 ( $p=0.0178$ ).



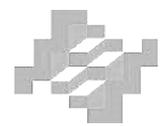
<b>Cuadro IX. Análisis bivariado entre los grupos de diagnóstico histopatológico y las variables sociodemográficas.</b>					
Variable	Total de muestra n= 361	Grupos de diagnóstico			Valor de p
		Sin lesión n=43	Lesión n=205	CaCU n=113	
<i>Edad</i>	<i>Med 40.30</i>	<i>Med 35.16</i>	<i>Med 35.66</i>	<i>Med 50.67</i>	<i>0.0001</i>
<i>Etnicidad.</i>					<i>0.0001</i>
<i>Blanco</i>	<i>86.43%</i>	<i>65.12%</i>	<i>88.29%</i>	<i>91.15%</i>	
<i>No Blanco</i>	<i>13.57%</i>	<i>34.88%</i>	<i>11.71%</i>	<i>8.85%</i>	
<i>Nivel socioeconómico</i>					<i>0.0001</i>
<i>Medio alto/ Alto</i>	<i>26.86%</i>	<i>86.05%</i>	<i>20</i>	<i>16.81</i>	
<i>Bajo</i>	<i>73.13%</i>	<i>13.95%</i>	<i>80</i>	<i>83.19</i>	
<i>Ocupación</i>					<i>0.0001</i>
<i>Trabaja o Estudia</i>	<i>7.76%</i>	<i>48.84</i>	<i>2.44</i>	<i>1.77</i>	
<i>Ama de casa</i>	<i>92.24%</i>	<i>51.16</i>	<i>97.56</i>	<i>98.23</i>	
<i>Nivel educativo</i>					<i>0.0001</i>
<i>Profesionista/técnico</i>	<i>13.02%</i>	<i>53.49</i>	<i>9.76</i>	<i>3.54</i>	
<i>Secundaria o preparatoria</i>	<i>38.78%</i>	<i>34.88</i>	<i>48.78</i>	<i>22.12</i>	
<i>Analfabeta o primaria</i>	<i>48.20%</i>	<i>11.63</i>	<i>41.46</i>	<i>74.34</i>	
<i>Antecedentes de Tabaquismo</i>					<i>0.604</i>
<i>Sin antecedente</i>	<i>75.07%</i>	<i>76.74%</i>	<i>76.59</i>	<i>71.68</i>	
<i>Con antecedentes</i>	<i>24.93%</i>	<i>23.26%</i>	<i>23.41</i>	<i>28.32</i>	
<i>IMC</i>	<i>Med 26.40</i>	<i>Med 24.62</i>	<i>Med 26.38</i>	<i>Med 27.14</i>	<i>0.0178</i>

En lo que respecta al análisis bivariado que se realizó entre los grupos de diagnóstico y las variables gineco-obstétricas (Edad de menarca, edad de inicio de la vida sexual, edad de primer parto, antecedentes familiares de CaCU, número de parejas sexuales, número de gestaciones, método de planificación familiar, antecedentes de ITS's)(Ver Cuadro X); se observó que la media para la edad de inicio de la vida sexual fue mayor en el grupo sin lesión ( $p=0.0069$ ) ; así como la media de edad del primer parto ( $p=0.0112$ ); al compararlo con los grupos con lesión y CaCU. En lo que respecta al número de gestaciones el 83.73% del grupo sin lesión refirió tres o menos gestaciones así como el 58.54% del grupo con



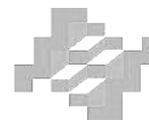
lesión, mientras que el 56.64% del grupo con CaCU refirió cuatro o más gestaciones ( $p=0.001$ ). El método de planificación familiar que presentó el mayor porcentaje en el grupo sin lesión fue el método hormonal con un 46.51%, para el grupo con lesión fueron los métodos no hormonales con un 50.73%, mientras que para el grupo de CaCU el mayor porcentaje fue para el uso de ningún método con un 48.67% ( $p=0.0001$ ). En cuanto a los antecedentes de ITS's se observó que en el grupo sin lesión y CaCU el mayor porcentaje refirió no tener antecedentes de ITS's con un 48.84% y un 51.33% respectivamente, mientras que en el grupo con lesión el mayor porcentaje se encuentra en el antecedente de candidiasis con un 25.37% ( $p=0.000$ ).

En el análisis bivariado entre los grupos de diagnóstico histopatológico y las variables infecciosas (infección por VPH, genotipos oncogénicos, coinfección de VPH, anticuerpos contra VHS-2, infección activa de VHS-2, determinación de chlamydia por PCR y resultados de *Fusobacterium spp.* (Ver Cuadro XI). Se observó que la infección por VPH de alto riesgo estaba presente en el 83.72% del grupo sin lesión, el 70.73% del grupo con lesión y el 100% del grupo de CaCU ( $p=0.000$ ). Los genotipos oncogénicos con mayor porcentaje para muestra total fueron los distintos al 16 y 18, con un 39.53% en el grupo sin lesión, y con un 36.10% en el grupo con lesión, mientras que para el grupo de CaCU el VPH16 presentó un 88.50% ( $p=0.000$ ). Adicionalmente se observó que el 16.26% del grupo sin lesión presentaba una coinfección de 2 o más genotipos de VPH, en el grupo con lesión el 27.32% presentaba esta infección, mientras que en el grupo de CaCU únicamente el 1.77% la presentaba ( $p=0.000$ ). Con respecto a la infección por VHS-2 se observó que el 6.98% del grupo sin lesión presentó anticuerpos contra VHS-2, el 23.41% del grupo con lesión y el 37.17% del grupo de CaCU presentó anticuerpos positivos ( $p=0.000$ ). Finalmente al analizar los resultados de *Fusobacterium spp.* por los grupos de diagnóstico histopatológico se observó que el 2.33% del grupo sin lesión fue positivo para este género bacteriano, el 5.37% del grupo con lesión fue positivo, mientras que el 23.89% del grupo de CaCU fue positivo ( $p=0.000$ ).



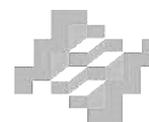
**Cuadro X. Análisis bivariado entre los grupos de diagnóstico histopatológico y las variables gineco-obstétricas.**

Variable	Total de muestra n= 361	Grupos de diagnóstico.			Valor de p
		Sin lesión n= 43	Lesión n=205	CaCU n=113	
<i>Edad de menarca</i>	Med 12.84	Med 13.04	Med 12.76	Med 12.91	0.7191
<i>Edad inicio de vida sexual</i>	Med 17.96	Med 19.55	Med 17.86	Med 17.52	0.0069
<i>Edad de primer parto</i>	Med 19.9	Med 23	Med 19.78	Med 19.48	0.0112
<i>Antecedentes de CaCU</i>					0.153
Sin Antecedentes	88.92%	95.35	86.34	91.15	
Con antecedentes	11.08%	4.65	13.66	8.85	
<i>Número de parejas sexuales</i>					0.137
<3	85.87%	79.07	87.32	85.84	
4-9	11.08%	11.63	10.24	12.39	
>10	3.05%	9.30	2.44	1.77	
<i>Numero de gestaciones</i>					0.0001
< 3	56.79%	83.73	58.54	43.36	
>4	43.21%	16.28	41.46	56.64	
<i>Método de Planificación Familiar</i>					0.0001
Ninguno	24.10%	9.30	13.66	48.67	
No hormonales	44.60%	44.19	50.73	33.63	
Hormonales	31.30%	46.51	35.61	17.70	
<i>Antecedentes de ITS</i>					0.0001
Sin antecedentes	34.63%	48.84%	22.44%	51.33%	
Vaginosis	12.19%	0%	18.05%	6.19%	
Candidiasis	17.45%	20.93%	25.37%	1.77%	
Chlamydia	1.94%	2.33%	2.93%	0%	
VPH	4.71%	13.95%	4.39%	1.77	
Co-infección candidiasis-vaginitis-VPH	2.22%	4.65%	2.93%	0%	
Co-infección candidiasis- herpes	0.28%	0%	0.49%	0%	
Anticuerpo o referencias herpes	20.78%	9.30%	18.54%	29.20%	
Infección activa herpes	5.82%	0%	4.88%	9.73%	



**Cuadro XI. Análisis bivariado entre los grupos de diagnóstico histopatológico y las variables infecciosas.**

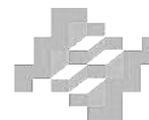
Variable	Total de muestra n= 361	Grupos de diagnostico			Valor de p
		Sin lesión n=45	Lesión n=205	CaCU n=113	
<i>Infección por VPH</i>					0.000
<i>Negativo</i>	14.96%	13.95%	23.41%	0%	
<i>Positivo</i>	85.04%	86.05%	76.59%	100%	
<i>Genotipo VPH</i>					0.000
<i>Negativo</i>	14.96%	13.95%	23.41%	0%	
<i>Bajo riesgo</i>	3.60%	2.33%	5.85%	0%	
<i>Alto riesgo</i>	81.44%	83.72%	70.73%	100%	
<i>Genotipos Oncogénicos</i>					0.000
<i>Negativo</i>	16.62%	13.95%	26.41 %	0%	
<i>Distinto a 16 y 18</i>	25.78%	39.53%	36.10%	1.77%	
<i>VPH18</i>	8.59%	18.60%	5.85%	9.73%	
<i>VPH16</i>	46.26%	25.58%	27.32%	88.50%	
<i>VPH 16 Y 18</i>	2.77%	2.33%	4.39%	0%	
<i>Coinfección de VPH*</i>					0.000
<i>Sin coinfección</i>	81.99%	83.72%	72.68%	98.23%	
<i>Con coinfección</i>	18.01%	16.26%	27.32%	1.77%	
<i>Anticuerpos VHS-2</i>					0.000
<i>Negativo</i>	74.24%	93.02%	76.59%	62.83%	
<i>Positivo</i>	25.76%	6.98%	23.41%	37.17%	
<i>Infección activa VHS-2</i>					0.046
<i>Negativo</i>	94.18%	100%	95.12%	90.27%	
<i>Positivo</i>	5.82%	0%	4.88%	9.73%	
<i>Detección de Chlamydia</i>					0.190
<i>Negativo</i>	98.06%	97.67%	97.07%	100%	
<i>Positivo</i>	1.94%	2.33%	2.93%	0%	
<i>Resultado Fusobacterium spp.</i>					0.000
<i>Negativo</i>	89.20%	97.67%	94.63%	76.11%	
<i>Positivo</i>	10.80%	2.33%	5.37%	23.89%	



Adicionalmente se realizó un análisis bivariado entre el resultado de *Fusobacterium spp.* y las variables sociodemográficas (edad, etnicidad, nivel socioeconómico, ocupación, nivel educativo, antecedentes de tabaquismo e IMC). ( Ver Cuadro XII). Se observó que la media de edad es mayor para las muestras positivas para *Fusobacterium spp.* en comparación con las muestras negativas ( $p=0.0018$ ). Así mismo se observó que el 87.18% de las muestras que fueron positivas a *Fusobacterium spp.* pertenecieron al nivel socioeconómico bajo; mientras que el 71.23% de las muestras negativas pertenecieron a este mismo nivel socioeconómico, el 12.82% de las muestras positivas correspondieron a un nivel socioeconómico medio o alto, así como un 28.57% de las muestras negativas ( $p= 0.036$ ).

**Cuadro XII. Análisis bivariado entre resultados de *Fusobacterium spp.* y variables sociodemográficas.**

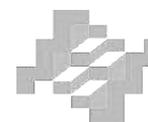
Variable	Resultados para <i>Fusobacterium</i>		Valor de <i>p</i>
	Negativo	Positivo	
<i>Edad</i>	Med 39.50	Med 46.89	0.0018
<i>Etnicidad.</i>			0.628
<i>Blanco</i>	86.02%	89.74%	
<i>No Blanco</i>	13.98%	10.26%	
<i>Nivel socioeconómico</i>			0.036
<i>Medio/ Alto</i>	28.57%	12.82%	
<i>Bajo</i>	71.43%	87.18%	
<i>Ocupación</i>			0.199
<i>Estudia/ Trabaja</i>	8.39%	2.56%	
<i>No trabaja</i>	91.61%	97.44%	
<i>Nivel educativo</i>			0.548
<i>Profesional/ Técnico</i>	13.35%	10.26%	
<i>Preparatoria/ Secundaria</i>	39.44%	33.33%	
<i>Primaria/Analfabeta</i>	47.20%	56.41%	
<i>Antecedentes de tabaquismo</i>			0.617
<i>Sin antecedentes</i>	75.47%	71.79%	
<i>con antecedentes</i>	24.53%	28.21%	
<i>IMC</i>	Med 26.39	Med 26.56	0.7575



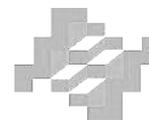
El análisis bivariado entre los resultados de *Fusobacterium spp.* y las variables gineco-obstétricas (edad de menarca, edad de inicio de vida sexual, edad de primer parto, antecedentes de CaCU, número de parejas sexuales, número de gestaciones, método de planificación familiar, antecedentes de ITS's y diagnóstico histopatológico) (Ver Cuadro XIII). Se observó que el 46.15% de las muestras positivas a *Fusobacterium spp.* tenían antecedente de utilizar algún método anticonceptivo no hormonal, 38.54% no utilizaba ningún método y sólo el 15.38% refirió utiliza un método hormonal; en comparación con las muestras negativas en las cuales el 44.41% utilizaba un método no hormonal, el 33.23% utilizaba un método hormonal y el 22.36% no utilizaba ningún método ( $p=0.026$ ).

Al realizar el análisis entre el resultado para *Fusobacterium spp.* y el diagnóstico histopatológico se observó que el 69.23% de las muestras positivas para este género bacteriano presentaba un diagnóstico histopatológico de CaCU; el 28.21% de las muestras positivas tenía el diagnóstico de lesión intraepitelial de bajo o alto grado, mientras que únicamente el 2.56% de las muestras positivas correspondieron al grupo sin lesión ( $p=0.00$ ). Al analizar los resultados de *Fusobacterium spp.* con los antecedentes de infección de transmisión sexual; se observó que el 53.81% de las muestras positivas no presentaba antecedentes de ITS's, el 30.77% presentaba anticuerpos positivos para herpes o refería el antecedente de infección previa por herpes, el 5.13% presentaba antecedentes de candidiasis vaginal; mientras que los antecedentes de vaginosis, infección por clamidia o VPH se presentaron en un 2.56% respectivamente. ( $p=0.026$ )

Al realizar el análisis bivariado entre los resultados de *Fusobacterium spp.* y las variables infecciosas (Infección por VPH, genotipos oncogénicos de VPH, coinfección de VPH, anticuerpos contra VHS-2, infección activa de VHS-2, determinación de *Chlamydia trachomatis* por PCR) (Ver Cuadro XIV). Se observó que en el 94.87% de las muestras positivas para *Fusobacterium spp.* se detectó el genoma viral de VPH, mientras que en el 83.85% de las muestras negativas se detectó el VPH. En el 76.92% de las muestras positivas a *Fusobacterium spp.*, se presentó infección por el VPH16 como genotipo oncogénico, el 7.69% de las muestras positivas presentó VPH18, así como genotipos oncogénicos distintos a 16 y 18 ( $p=0.001$ ).

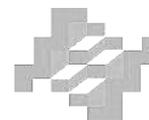

**Cuadro XIII. Análisis bivariado entre resultados de *Fusobacterium* spp. y variables Gineco-obstétricas.**

Variable	Resultados para <i>Fusobacterium</i> spp.		Valor de p
	Negativo	Positivo	
<i>Edad de menarca</i>	Med 12.82	Med 13.02	0.6117
<i>Edad inicio de vida sexual</i>	Med 17.99	Med 17.69	0.6352
<i>Edad de primer parto</i>	Med 20.05	Med 18.88	0.1128
<i>Antecedentes de CaCU</i>			0.365
<i>Sin Antecedentes</i>	89.44%	84.62%	
<i>Con antecedentes</i>	10.56%	15.38%	
<i>Número de parejas sexuales</i>			0.09
<3	87.27%	74.36%	
4-9	9.94%	20.51%	
>10	2.80%	5.13%	
<i>Numero de gestaciones</i>			0.281
< 3	57.76%	48.72%	
>4	42.24%	51.28%	
<i>Método de Planificación Familiar</i>			0.026
<i>Ninguno</i>	22.36%	38.46%	
<i>No hormonales</i>	44.41%	46.15%	
<i>Hormonales</i>	33.23%	15.38%	
<i>Antecedentes de ITS</i>			0.026
<i>Sin antecedentes</i>	32.3%	53.81%	
<i>Vaginosis</i>	13.35%	2.56%	
<i>Candidiasis</i>	18.94%	5.13%	
<i>Chlamydia</i>	1.86%	2.56%	
<i>VPH</i>	4.96%	2.56%	
<i>coinfeccion candidiasis-vaginitis-VPH</i>	2.48%	0%	
<i>coinfeccion candidiasis- herpes</i>	0.31%	0%	
<i>Anticuerpo o referencias herpes</i>	19.57%	30.77%	
<i>Infección activa herpes</i>	6.21%	2.56%	
<i>Diagnostico histopatológico</i>			0.00
<i>Sin lesión</i>	13.04%	2.56%	
<i>Lesión</i>	60.25%	28.21%	
<i>CaCU</i>	26.71%	69.23%	



**Cuadro XIV. Análisis bivariado entre resultados de *Fusobacterium spp.* y variables infecciosas.**

Variable	Resultados para <i>Fusobacterium spp</i>		Valor de p
	Negativo	Positivo	
<i>Detección VPH</i>			0.046
Negativo	16.15%	5.13%	
Positivo	83.85%	94.87%	
<i>Genotipo de VPH</i>			0.088
Negativo	16.15%	5.13%	
Bajo riesgo	4.04%	0%	
Alto riesgo	79.81%	94.87%	
<i>Genotipos Oncogénicos</i>			0.001
Negativo	18.01%	5.13%	
Distinto a 16 y 18	27.95%	7.69%	
VPH18	8.7%	7.69%	
VPH16	42.55%	76.92%	
VPH 16 Y 18	2.8%	2.56%	
<i>Co-infección de VPH</i>			0.268
Sin co-infección	81.06%	89.74%	
Con co-infección	18.94%	10.26%	
<i>Anticuerpos VHS-2</i>			0.252
Negativo	75.16%	66.67%	
Positivo	24.84%	33.33%	
<i>Infección activa VHS-2</i>			0.714
Negativo	93.79%	97.44%	
positivo	6.21%	2.56%	
<i>Chlamydia trachomatis</i>			0.554
Negativo	98.14%	97.44%	
Positivo	1.86%	2.56%	

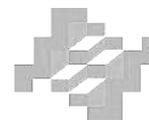


#### 10.4. Determinación de Odds Ratio.

Se realizó el cálculo de la Odds Ratio (OR) para las variables que presentaron significancia estadística en el análisis bivariado entre los resultados de *Fusobacterium spp.* y las variables sociodemográficas, gineco-obstétricas e infecciosas (Ver Cuadro XV). Observando que los casos que pertenecían a un nivel socioeconómico bajo tienen 1.72 veces más la posibilidad de tener un resultado positivo a *Fusobacterium spp.* en comparación con las de nivel socioeconómico medio alto o alto (IC 1.03- 1.17). Las mujeres que refirieron antecedentes de cuatro o más parejas sexuales presentaron 1.3 veces más posibilidad de presentar un resultado positivo para *Fusobacterium spp.* en comparación con las mujeres que refirieron antecedentes de tres o menos parejas sexuales (IC 1.07-5.20).

Las muestras con un diagnóstico histopatológico de CaCU tuvieron 5.17 veces más posibilidad de ser positivas a *Fusobacterium spp.* en comparación con las muestras con diagnóstico histopatológico sin lesión o con lesión (IC 2.99-12.72). Adicionalmente se observó que las muestras positivas a un genotipo de alto riesgo de VPH tienen 3 veces más posibilidad de tener un resultado positivo para *Fusobacterium spp.* en comparación con las muestras que no presentan un genotipo de VPH de alto riesgo (IC 1.09- 19.92). Finalmente se observó que las muestras positivas a VPH16 presentaron 3.5 veces más posibilidad de tener un resultado positivo a *Fusobacterium spp.* en comparación con las muestras negativas a VPH16 (IC 2.08-10.47).

<b>Cuadro XV. Estimación del OR para resultado positivo a <i>Fusobacterium spp.</i></b>			
<b>Factor de exposición</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>	<b>IC</b>
Nivel socioeconómico Bajo	2.72	0.036	1.03-1.17
4 o más parejas sexuales.	2.36	0.0288	1.07-5.20
Diagnostico histopatológico de CaCU	6.17	0.0000	2.99-12.72
Infección por VPH alto riesgo	4.06	0.0412	1.09-19.92
Infección por VPH 16	4.56	0.0001	2.08-10.47

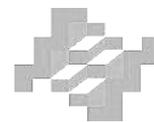


### 10.5. Regresión logística.

Debido al reducido poder que existe entre los grupos sin lesión y el grupo de lesión (20%) se realizó una recategorización del diagnóstico histopatológico en el cual se sumaron ambos grupos para incrementar el poder. Observando que el poder entre el grupo sin lesión/lesión y el grupo de CaCU es de 99%. Posteriormente se realizó una regresión logística entre estos dos grupos de diagnóstico y los resultados de *Fusobacterium* ajustando por edad, nivel socioeconómico, número de parejas sexuales, antecedentes de ITS's ,método de planificación familiar, infección por VPH de alto riesgo y VPH16. Observando que existe una asociación estadística entre el grupo de CaCU y los resultados de *Fusobacterium spp.* ( $p=0.00247$ ) (IC 1.01-7.23); el grupo de CaCU tiene 1.7 veces más posibilidades de presentar un resultado positivo a *Fusobacterium spp.* en comparación con el grupo sin lesión/ lesión. Adicionalmente se observó que las mujeres de nivel socioeconómico bajo presentaron 2.1 veces más posibilidades de presentar un resultado positivo en comparación con las mujeres de nivel socioeconómico medio alto/alto ( $p=0.034$ ) (IC 1.08- 9.18). Se observó también que las mujeres con antecedentes de 4 o más parejas sexuales presentaron 2.7 más posibilidades de presentar un resultado positivo a *Fusobacterium spp.* en comparación con las mujeres con antecedentes de 3 parejas o menos ( $p=0.005$ ) (IC1.50-9.46). Finalmente se observó que las mujeres que tenían algún antecedente de ITS presentaban 38% menos posibilidad de presentar un resultado positivo a *Fusobacterium spp.* en comparación con las mujeres sin antecedentes de ITS ( $p=0.016$ ) (IC 0.17-0.83).

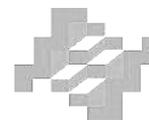
## 11. DISCUSIÓN.

La especie *Fusobacterium* integra un conjunto de bacterias Gram negativas anaerobias estrictas que forma parte de la microbiota normal de la cavidad oral y de la mucosa intestinal<sup>15,16</sup>. Este género bacteriano además ha sido identificado como un patógeno oportunista que se ha asociado al desarrollo de infecciones odontológicas, infecciones obstétricas como coriamnioitis, sepsis neonatal, apendicitis, enfermedad inflamatoria intestinal y más recientemente con cáncer colorectal <sup>15,16,37</sup>.



Los resultados observados en el presente estudio muestran que existe una mayor prevalencia de muestras de cérvix positivas a *Fusobacterium spp.* en el grupo de CaCU; seguido por el grupo con lesión de alto grado y el grupo de lesión de bajo grado; siendo el grupo sin lesión el que presenta una menor prevalencia de muestras positivas a este género bacteriano. A pesar de que no se encontraron estudios publicados que busquen la prevalencia de este género bacteriano específico en muestras de cérvix durante los diferentes estadios de la historia natural del CaCU; en el estudio de Audirac-Chalifour y cols<sup>15</sup> en el cual observaron la asociación entre la diversidad de la microbiota del cervix y el diagnóstico histopatológico de los diferentes estadios de CaCU, se describió que las muestras del cérvix provenientes de mujeres con lesión de alto grado y CaCU presentaban una mayor abundancia de *Fusobacterium spp.* en comparación con los estadios tempranos de la historia natural del CaCU. Estos resultados parecen ir en el mismo sentido que los observados por Mitra y cols., los cuales observaron que la diversidad de la microbiota del cérvix se encuentra asociada al incremento en el grado de neoplasia intraepitelial cervical (NIC); ya que los bajos niveles de *Lactobacillus spp.* y el incremento en la diversidad de bacterias anaerobias son tres veces más frecuentes en mujeres con lesión de alto grado y cuatro veces más frecuente en mujeres con CaCU en comparación con los controles libres de lesión; reportando adicionalmente que existe una sobre expresión de *Fusobacterium spp.*, principalmente *Sneathia sanguinegens* en las muestras obtenidas de mujeres con lesión de alto grado( $p < 0.01$ )<sup>38</sup>.

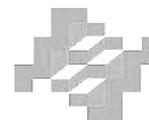
Adicionalmente se pudo observar que la presencia de una infección por VPH se encuentra asociado a la posibilidad de presentar un resultado positivo para *Fusobacterium spp.*, y que la posibilidad de esta asociación se incrementa si la infección es debida a un genotipo de alto riesgo especialmente el genotipo oncogénico VPH16. Estos resultados coinciden con los reportado por Lee y col. en un estudio llevado a cabo en una cohorte de gemelas coreanas; en el cual encontraron que la infección por VPH estuvo fuertemente asociada con la abundancia de varias especies de la microbiota vaginal, particularmente la Fusobacteria *Sneathia spp.* Las Fusobacterias fueron más prevalentes en el grupo VPH positivo que en el grupo VPH negativo ( $p < 0.05$ ); además de observar que la Fusobacteria *Sneathia* era tres veces más frecuente en mujeres que tenían una infección por un genotipo de VPH de alto riesgo<sup>17</sup>.



Finalmente se observó las mujeres que tienen un nivel socioeconómico bajo y las que refirieron haber tenido cuatro o más parejas sexuales tuvieron más posibilidades de presentar un resultado positivo para *Fusobacterium spp.* A pesar de que no se encontraron estudios publicados que analizaran la asociación entre este género bacteriano y el nivel socioeconómico y entre *Fusobacterium spp.* y el número de parejas sexuales, este resultado posiblemente puede ser explicado por el hecho de que las bacterias anaerobias como *Fusobacterium spp.* incrementan su abundancia en la microbiota cervicovaginal cuando se presenta una condición denominada VB; la cual se caracteriza por la disminución en la concentración de *Lactobacillus spp.* y el incremento de bacterias anaerobias<sup>39,40</sup>. Se ha observado que la prevalencia de la VB es mayor en países pobres o en áreas rurales de países en desarrollo<sup>41</sup>. Esto podría en parte explicar la asociación observada entre el resultado positivo para *Fusobacterium spp.* y el nivel socioeconómico. Adicionalmente se ha observado que existe un mayor riesgo de VB asociado al incremento de parejas sexuales<sup>41</sup>. En un metaanálisis realizado por Fethers y cols. sobre los factores de riesgo sexuales y la VB observaron que existe una asociación entre la VB y el incremento en el número de parejas sexuales (OR rango 1.3-5.4)<sup>39</sup>.

La infección persistente por VPH es un importante requisito para el desarrollo de lesiones del cérvix de alto grado. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de las infecciones progresa a CaCU<sup>14</sup>. El tracto reproductivo femenino se caracteriza por un microambiente inmunológico único. La mucosa cervicovaginal está cubierta por un gran número de bacterias comensales, especialmente *Lactobacillus spp.*<sup>38</sup>, que tiene un importante papel en el mantenimiento de la salud; ya que los lactobacilos ayudan a controlar la sobre expresión de bacterias anaerobias, incluyendo *Fusobacterium spp.*<sup>14</sup>.

En varios estudios se ha identificado la potencial importancia de *Fusobacterium spp.* como en una posible factor en el desarrollo de cáncer colorectal<sup>15,16,38</sup>. A pesar de no conocer en su totalidad el mecanismo por el cual podría ocurrir esto. Se ha observado que existe una modificación del microambiente inmunotumoral modulado por vías de señalización dependientes de E-caderina/  $\beta$ -catenin mediante la adhesina FadA<sup>15,37</sup>. La adhesina FadA ha sido identificada como la forma de unión entre *Fusobacterium nuclatum* y las células del huésped<sup>42</sup>. FadA se une a las moléculas de unión caderinas, uniéndose a la VE-caderinas en el endotelio y a las E-caderinas en las células epiteliales. La unión de FadA con la E-caderina genera la ruptura de las uniones celulares, lo que favorece la invasión de las células

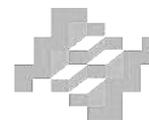


epiteliales<sup>33,42</sup>. Adicionalmente la E-caderina es un supresor de tumor que funciona a través de  $\beta$ -catenin. La unión de FadA con el complejo E-caderina/  $\beta$ -catenin ocasiona la inhibición de la actividad antitumoral de E-caderina, así como la translocación nuclear de  $\beta$ -catenin, activando así el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, lo que favorece el desarrollo de cáncer colorectal<sup>15,37</sup>. Además se han observado niveles más elevados de FadA en el epitelio de pacientes con cáncer colorectal que lo observado en el epitelio de pacientes sanos<sup>15,37</sup>. Algunos estudios muestran que existe una distribución anormal de E-caderina y  $\beta$ -catenin en el citoplasma de células obtenidas de lesiones pre malignas o de CaCU<sup>15,43,44</sup>. Por lo que es posible que también exista una sobreexpresión de FadA en pacientes con CaCU que presenten una infección por *Fusobacterium spp.*

Por otra parte en el estudio de Audirac-Chalifour y cols. se observó que las muestras del cérvix que presentaron una mayor diversidad de la microbiota así como la presencia de bacterias Gram negativas como *Fusobacterium spp.* presentaban mayores niveles en cérvix de ARNm de IL-4 y TGF-  $\beta$ 1<sup>15</sup>. Estudios como los de Torres- Poveda y col y Alcocer-Gonzalez y col mostraron que existen niveles elevados de ARNm de TGF-  $\beta$ 1, IL-4 e IL-10 en las muestras del cérvix de pacientes con CaCU y con lesiones escamosas intraepiteliales<sup>45,46</sup>. Por lo que es posible que la infección por *Fusobacterium* juegue un importante papel en el desarrollo de un microambiente inmunosupresor determinado por la presencia de interleucinas antiinflamatorias como IL-4 y TGF-  $\beta$ 1 en células del cérvix transformadas por VPH<sup>15</sup>.

## 12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

En este estudio se observó que la prevalencia de *Fusobacterium spp.*, aumentó conforme existe un incremento en el grado de malignidad de las lesiones precursoras de CaCU. A pesar que existe una asociación estadística entre el diagnóstico histopatológico de CaCU y la prevalencia de *Fusobacterium spp.*, no se puede establecer una asociación causal debido al diseño del estudio. Por lo que es necesario desarrollar estudios con un diseño que permita establecer la causalidad. Ya que con los resultados obtenidos en el presente estudio no se puede establecer si la presencia de *Fusobacterium spp.* favorece la persistencia del VPH y por lo tanto el desarrollo de CaCU o si por el contrario las lesiones del cérvix de alto grado y el CaCU favorecen el crecimiento de *Fusobacterium spp.*

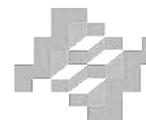


Finalmente es recomendable la realización de un estudio con el objetivo de determinar la expresión de interleucinas antiinflamatorias como (IL-4, IL-10, TGF-  $\beta$ 1) así como la medición de E-caderina,  $\beta$ -catenin y FadA en las células epiteliales de los diferentes estadios de lesiones precursoras del CaCU con y sin infección por *Fusobacterium spp.*, para observar si estos factores celulares se encuentran asociados a la infección por *Fusobacterium spp.*

### 13. LIMITACIONES.

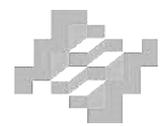
Debido a que este estudio se realizó utilizando un banco ADN extraído de muestras del cérvix que fue previamente conformado, no se pudo incrementar el número de muestras incluidas en cada grupo de estudio. Por lo que el grupo control (sin lesión) fue el que menor número de muestras tuvo, lo que afectó el poder de la muestra entre el grupo sin lesión y con lesión ya que ambos grupos presentaron una baja prevalencia para *Fusobacterium spp.*

La calidad del ADN fue otra limitación del estudio, ya que existió un porcentaje considerable de muestras eliminadas debidas a que la degradación del ADN que no permitió la amplificación del gen endógeno.



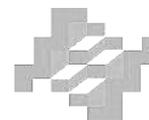
## 14. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Fechas	Septiembre 2015	Octubre 2015	Noviembre 2015	Diciembre 2015	Enero 2016	Febrero 2016	Marzo 2016	Abril 2016	Mayo 2016	Junio 2016	Julio 2016	Agosto 2016	Septiembre 2016
Búsqueda bibliográfica													
Elaboración del protocolo													
Sometimiento de protocolo a comisiones													
Procesamiento de muestras													
Análisis de resultados													
Elaboración final de PT													
Sometimiento del PT al comité evaluador													
Práctica profesional													
Examen de Titulación													
Titulación													



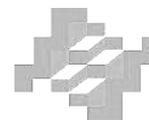
## 15. BIBLIOGRAFÍA.

1. Sánchez-Barriga, J. J. Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. *Gac. Med. Mex.* **148**, 42–51 (2012).
2. Kably, A. *et al.* La carga del cáncer cervicouterino y de la infección por virus del papiloma humano en México y en el mundo. *Ginecol. Obstet. Mex.* **79**, 788–793 (2011).
3. Franco, E. L., Schlecht, N. F. & Saslow, D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J.* **9**, 348–359 (2003).
4. Organización Mundial de la Salud. Control integral del cáncer cervicouterino. *Guía prácticas esenciales* 292 (2007). at <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789243547008\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789243547008_spa.pdf)>
5. GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Cervical cancer. at <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp#INCIDENCE>>
6. Fact Sheets by Population. at <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)>
7. Nubia Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., and Chris J.L.M. Meijer, M. D. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. 518–527 (2003). at <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa021641>>
8. Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S. & Kitchener, H. C. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* **382**, 889–899 (2013).
9. Faridi, R., Zahra, A., Khan, K. & Idrees, M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Viol. J.* **8**, 269 (2011).
10. Vedham, V., Verma, M. & Mahabir, S. Early-life exposures to infectious agents and later cancer development. *Cancer Med.* n/a–n/a (2015). doi:10.1002/cam4.538
11. Huang, B., Fettweis, J. M., Brooks, J. P., Jefferson, K. K. & Buck, G. a. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. *Clin. Lab. Med.* **34**, 747–761 (2014).
12. Nardis, C., Mosca, L. & Mastromarino, P. Vaginal microbiota and viral sexually transmitted diseases. *Ann Ig* **25**, 443–456 (2013).
13. Brotman, R. M. *et al.* Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J. Infect. Dis.* **210**, 1723–1733 (2014).
14. Guo, Y.-L., You, K., Qiao, J., Zhao, Y. & Geng, L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int. J. STD AIDS* **23**, 581–4 (2012).
15. Audirac-chalifour, A., Torres-poveda, K. & Bahena-román, M. Cervical Microbiome and



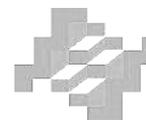
Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. (2016). doi:10.1371/journal.pone.0153274

16. Cochrane, K. *et al.* Anaerobe Complete genome sequences and analysis of the *Fusobacterium nucleatum* subspecies *animalis* 7-1 bacteriophage  $\phi$  Funu1 and  $\phi$  Funu2. *Anaerobe* **38**, 125–129 (2016).
17. Lee, J. E. *et al.* Association of the Vaginal Microbiota with Human Papillomavirus Infection in a Korean Twin Cohort. *PLoS One* **8**, e63514 (2013).
18. Ghittoni, R. The role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicalscience* **9**, 1–9 (2015).
19. Bravo, I. G. & Felez-Sanchez, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol. Med. Public Heal.* **2015**, 32–51 (2015).
20. Belizário, J. E. & Napolitano, M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol.* **6**, 1–16 (2015).
21. Tomkovich, S. & Jobin, C. Microbiota and host immune responses: a love-hate relationship. *Immunology n/a–n/a* (2015). doi:10.1111/imm.12538
22. Gillings, M., Paulsen, I. & Tetu, S. Ecology and Evolution of the Human Microbiota: Fire, Farming and Antibiotics. *Genes (Basel)*. **6**, 841–857 (2015).
23. Ravel, J. *et al.* Human microbiome science: vision for the future, Bethesda, MD, July 24 to 26, 2013. *Microbiome* **2**, 16 (2014).
24. Belkaid, Y. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. **18**, 1199–1216 (2013).
25. Hooper, L. V, Littman, D. R., Macpherson, A. J. & Program, M. P. Interactions between the microbiota and the immune system. **336**, 1268–1273 (2015).
26. Quayle, A. . The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J. Reprod. Immunol.* **57**, 61–79 (2002).
27. Wira, C., Fahey, J. & Sentman, C. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol. ...* **206**, 306–335 (2005).
28. Aldunate, M. *et al.* Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front. Physiol.* **6**, 1–23 (2015).
29. Petrova, M. I. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front. Physiol.* **6**, 81 (2015).
30. Gillet, E. *et al.* Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **11**, 10 (2011).
31. Clarke, M. A. *et al.* A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect. Dis.* **12**, 33 (2012).
32. Gao, W., Weng, J., Gao, Y. & Chen, X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect. Dis.* **13**, 271 (2013).
33. Afra, K., Laupland, K., Leal, J., Lloyd, T. & Gregson, D. Incidence , risk factors , and



outcomes of *Fusobacterium* species bacteremia. *BMC Infect. Dis.* **13**, 1 (2013).

34. Yu, Y. *et al.* Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum* -induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. **6**, (2015).
35. Ozeki, I. *et al.* Antiviral effects of peginterferon alpha-2b and ribavirin following 24-week monotherapy of telaprevir in Japanese hepatitis C patients. *J. Gastroenterol.* **46**, 929–937 (2011).
36. Kostic, A. D. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe* **14**, 207–215 (2013).
37. Mara Roxana Rubinstein, Xiaowei Mang, Wendy Liu, Yujan Hao, Guifang Cai, Y. W. H. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* **14**, 195–206 (2013).
38. Mitra, A. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. 1–11 (2015). doi:10.1038/srep16865
39. Fethers, K. A., Fairley, C. K., Hocking, J. S., Gurrin, L. C. & Bradshaw, C. S. Sexual Risk Factors and Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **47**, (2008).
40. Li, X., Wang, C., Zhang, X., Gao, G. & Tong, F. Risk factors for bacterial vaginosis: results from a cross-sectional study having a sample of 53 , 652 women. 1525–1532 (2014). doi:10.1007/s10096-014-2103-1
41. Bautista, C. T. *et al.* Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology , prevalence , risk factors , and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Mil. Med. Res.* 1–10 (2016). doi:10.1186/s40779-016-0074-5
42. Han, Y. W. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* **23**, 141–147 (2015).
43. Auvinen E, Carpen O, Korpela T, Ronty M, Vaheri A, T. J. Altered expression of ezrin, E-Cadherin and  $\beta$ -Catenin in cervical neoplasia. *Neoplasma* **60**, 56–61 (2013).
44. Rodríguez-Sastre MA, González-Maya L, Delgado R, Lizano M, Tsubaki G, Mohar A, et al. Abnormal distribution of E-cadherin and beta-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecol Onco* **97**, 330–336 (2005).
45. Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, B.-M. & VH, Peralta-Zaragoza O, et al. Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin. Oncol.* **5**, 753–763 (2014).
46. Alcocer-González JM, Berumen J, Tamez-Guerra R, Gariglio P, Hernández-Pando R, B.- & Morales VH, et al. In Vivo Expression of Immunosuppressive Cytokines in Human Papillomavirus- Transformed Cancer Cells. *Viral Immunol.* **19**, 481–491 (2006).



## 16. ANEXOS.

### 16.1. Anexo 1.

Cartas de aprobación de las Comisiones de Bioseguridad, Ética en Investigación e Investigación del Proyecto Madre.



CB10-041.

Cuernavaca, Mor., a 21 de Enero del 2010.

CB: 806 - CI: 814

**Dr. Vicente Madrid Marina**  
Responsable de Proyecto  
CISEI-INSP  
Presente

Por medio del presente informo a usted que el dictamen de la Comisión de Bioseguridad para la incorporación de dos co-investigadores, los M. en C. Margarita Bahena Román y Alfredo Lagunas Martínez en el proyecto de investigación titulado: "Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cancer cervical en mujeres procedentes del Estado de Guerrero" es: EXENTO DE REVISIÓN.

Atentamente,



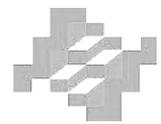
**Dr. Salvador F. Villalpando Hernández**  
Presidente de la Comisión  
de Bioseguridad-INSP

ccp. Dr. Eduardo Lazcano Ponce.- Presidente de la Comisión de Investigación.-Presente.  
Dra. Julieta Ivonne Castro Romero.- Presidenta de la Comisión de Ética.- Presente.

Col. Santa María Ahuacatlán  
62008 Cuernavaca, Morelos  
México

Tel-Fax:01 (777) 3293000 ext 7204  
Secretaría: 7204

[s.villalpando@insp.mx](mailto:s.villalpando@insp.mx)



INSTITUTO NACIONAL DE  
SALUD PÚBLICA

Avenida Universidad 855,  
Colonia Santa María Ahuacatlilán  
62100 Cuernavaca, Morelos, México

Teléfono: +52 (777) 329 30 00 Ext.2465  
Email: jcastro@insp.mx  
web: www.insp.mx

## COMISIÓN DE ÉTICA

Dra. Julieta Ivone Castro Romero  
Presidenta

Cuernavaca, Mor., 18 de enero, 2010.  
CI: 814,

**Vicente Madrid Marina**  
Investigador principal  
Presente

Estimado investigador,

Por medio del presente me permito informar a usted que el dictamen de la Comisión de Ética al addendum de su estudio titulado: ***"Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cancer cervical en mujeres procedentes del Estado de Guerrero"*** fue:

### ***Exento de revisión***

Para registrar a los M. en C. Margarita Bahena Román y Alfredo Lagunas Martínez como co-investigadores del presente estudio.

Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión, previo a su implementación, utilizando el sistema de *Modificaciones a Proyectos en Desarrollo* que se encuentra dentro del sistema SIID. Si Usted tiene dudas sobre el registro de modificaciones menores, favor de comunicarse con esta Comisión para su consideración.

Atentamente





**Instituto Nacional de Salud Pública**  
**Comisión de Investigación**

No. de Ref. 814.

CI-231.

Cuernavaca, Mor., a 5 de junio del 2009.

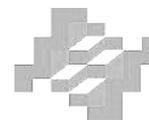
**Dr. Vicente Madrid Marina**  
**Responsable de Proyecto**  
**CISEI-INSP**  
**Presente**

Por medio del presente informo a usted que se registró la aprobación de la Comisión de Bioseguridad del proyecto de investigación titulado: **“Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del estado de Guerrero”**; cumpliendo con los requisitos para la **Aprobación** definitiva de la Comisión de Investigación.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

**Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce**  
**Presidente de la Comisión**  
**de Investigación-INSP**



## 16.2. Anexo 2.

Consentimiento informado del proyecto madre del cual se conformó el banco de ADN utilizado para el presente estudio.



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRASANGUÍNEAY PARA TOMA DE MUESTRA DE EXUDADO CERVICAL

FECHA: / / / / / / / / / /  
Día mes año

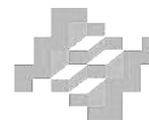
En México mueren muchas mujeres por Cáncer cérvicouterino y cada año se reportan másde 11,000 nuevos casos; lo cual sugiere que existe un factor genético en la población que la haga susceptible a esta enfermedad. El Instituto Nacional de Salud Pública está realizando un estudio titulado “Polimorfismos de la región reguladora del gen de Interleucina 10 y su asociación con la infección del virus del papiloma humano y el cáncer cérvicouterino” con el fin de identificar factores genéticos de susceptibilidad en la población mexicana.

EnesteestudioseestáninvitandoamujeresqueacudenaconsultaenelCentrodeAtención de la Mujer referidas de centros de atención primaria con un diagnóstico presuntivo que será confirmado ó descartado por el ginecólogo colposcopista. En caso de aceptar participar en el estudio mediante la firma de esta carta de consentimiento se le pedirá lo siguiente:

- a) Responder a un cuestionario de 42 preguntas sobre características demográficas e historia reproductiva que le hará el profesional encargado de toma de muestra en un tiempo aproximado de 15 minutos. La información que usted dé será estrictamente confidencial y de suma importancia para el logro de los objetivos del presente estudio. Cuando esta información se emplee en reportes científicos, fueron resumidos de tal forma, que no aparezca algún nombre o forma alternativa de identificación.
- b) Permitir la toma de muestra sanguínea (2 tubos de 7 ml = dos cucharaditas) por el profesional especializado encargado, con la que nos permitirá extraer el ADN para analizarlos polimorfismos del gen del L-10, el ARN para analizar la expresión del ARNm del L-10 y suero para medir el nivel de proteína del L-10 y establecer relaciones con el diagnóstico que el ginecólogo colposcopista le realice. Por otro lado, esta muestra servirá para la creación de un banco de ADN, ARN y suero que nos permitirá en un futuro realizar otras investigaciones de importancia para la salud de la población en general. La toma de sangre será tomada con material nuevo y estéril y se llevará a cabo en el consultorio del Centro de Atención para la Salud de la Mujer, así como la aplicación del cuestionario.
- c) Permitir la toma de muestra de exudado de cérvix por el ginecólogo colposcopista en un tiempo aproximado de 10 minutos. En este procedimiento le tomarán muestra del canal endocervical con un cepillo (citobrush) y la colocarán en un tubo con medio de conservación para realizar posteriormente la prueba de detección del Virus del Papiloma Humano por PCR y la extracción de ARN para el análisis de expresión de IL-10 en cérvix. Adicionalmente el ginecólogo le tomará muestra de esta zona para realizar un frotis o extendido en lámina para la citología o Papanicolau y le hará una colposcopia adicionándole ácido acético para detectar tempranamente cualquier tipo de lesión que tenga que ser tratada. El diagnóstico colposcópico lo realizará el ginecólogo colposcopista al momento de la consulta, la citología será enviada para su análisis patológico.

#### RIESGOS Y MOLESTIAS POTENCIALES:

La toma de muestra de exudado cervical es algo incómodo, pero el doctor(a) que realiza este procedimiento, lo hace muy rápido, limitándole las posibles molestias, en beneficio de su salud.



La toma de muestra de sangre puede ser un poco dolorosa y en ocasiones puede dejar un moretón alrededor del sitio de la toma. Sin embargo, la persona encargada de tomarle la muestra es un profesional con experiencia y tratará de que esto no suceda.

En caso de cualquier problema relacionado con la toma de las muestras, personal del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos, le atenderá sin costo alguno.

#### BENEFICIOS POTENCIALES:

Los resultados de este estudio permitirán conocer si usted tiene una infección por el Virus del Papiloma Humano o algún tipo de lesión del cuello uterino que requiera de tratamiento oportuno.

En la siguiente cita de control luego de la toma de muestra, el ginecólogo colposcopista del Centro de Atención para la Salud de la Mujer, le dará a cada uno de las pacientes el diagnóstico colposcópico. El resultado de la prueba de PCR para VPH y de la citología, se dará al paciente un mes después de la toma de muestra en una de las citas de control. Los resultados se darán por escrito, con copia en la historia clínica de cada uno de las pacientes. En caso de que los resultados muestren que usted tiene alguna lesión, el personal médico especializado del Centro de Atención para la Salud de la Mujer donde usted es atendida, la orientará y le brindará el mejor esquema para su tratamiento.

#### PARTICIPACIÓN:

Su participación es VOLUNTARIA y por lo tanto, puede dejar de contestar alguna pregunta, suspenderla entrevista o retirarse del estudio en cualquier momento. Las muestras de sangre y de exudado de cérvix que usted está donando fueron procesadas para obtener ADN, ARN y suero. Cada una de las muestras será etiquetada con un código cuya identidad sea confidencial y fueron almacenadas en los bancos del laboratorio 4 planta baja del Centro de investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública. En caso de que usted decida retirarse del estudio, esto no afectará de ninguna manera la calidad y cantidad de atención médica que recibe de parte del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos. No es posible en caso de retiro del estudio, devolver la muestra que usted donó, dado que la muestra ya pudo haber sido procesada, sólo que no se incluirá en el estudio sin su autorización.

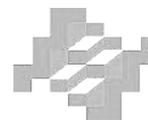
Todos los gastos que se generen en la presente investigación fueron cubiertos por el Instituto Nacional de Salud Pública y los Servicios de Salud de Morelos y se le garantiza confidencialidad de la información que usted muy amablemente nos brinde.

Para cualquier aclaración o duda respecto a este estudio favor de llamar por cobrar al teléfono (777)3293056 con el Dr. Vicente Madrid, responsable de la investigación en el Instituto Nacional de Salud Pública en la ciudad de Cuernavaca. Para cualquier duda derivada de la toma de muestra, favor de llamar por cobrar al teléfono (777)3101438 con el Dr. Javier Salgado, responsable de la investigación en el Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos en la ciudad de Cuernavaca.

Para cualquier aclaración o duda sobre sus derechos como participante en este estudio de investigación, puede comunicarse con la Dra. Julieta Ivone Castro, Presidenta de la Comisión de Ética del Instituto Nacional de Salud Pública al teléfono (777)329-30-00 Extensión 7424, de lunes a viernes de 9:00 a 17:00 hrs.

#### AUTORIZACIÓN

Leído lo anterior, acepto participar en el estudio descrito y a que los propósitos de este han sido explicados a mi satisfacción. Queda copia de esta forma de consentimiento, registrada en la Historia Clínica del apaciente del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Nombre: \_\_\_\_\_ Entrevistador: \_\_\_\_\_

Testigo1 \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Parentesco con el paciente: \_\_\_\_\_

Testigo2 \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

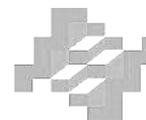
Parentesco con el paciente: \_\_\_\_\_

Además, autorizo que mi muestra de sangre sea guardada en un banco de muestras en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la responsabilidad del Investigador Responsable del proyecto, el Dr. Vicente Madrid Marina y sea utilizada en otros proyectos de investigación diferentes a este”.

Sí acepto

No acepto

**Comisión de Ética**  
**Instituto Nacional de Salud Pública**  
Versión Aprobada:  
Mayo 12, 2009  
Proyecto: CI-814  
Folio Identificador: J16



### 16.3. Anexo 3.

Carta de autorización para utilizar la base de datos y el banco de DNA derivado del proyecto “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical”.

Cuernavaca, Morelos a 26 de enero del 2016

**Mtra. Angélica Angeles Llerenas.**  
Presidenta del Comité de Ética en Investigación.  
Instituto Nacional de Salud Pública

**Dra. Celia Alpuche Aranda.**  
Presidenta de la Comisión de Bioseguridad.  
Instituto Nacional de Salud Pública

**Dr. Eduardo Lazcano Ponce.**  
Presidente de la Comisión de Investigación.  
Instituto Nacional de Salud Pública

#### **Presente.**

Por medio del presente, me permito autorizar a **Yuvia Michelle Barrera Acosta**, alumna de la Maestría en Salud Pública con Área de Concentración en Enfermedades Infecciosas, inscrita con la Matrícula: 2014121210. Generación: 2014-2016.

Para que utilice la base de datos y el banco de ADN que se integró a partir del estudio “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical”, para la realización de su trabajo para obtención de grado, titulado:

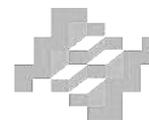
**“PREVALENCIA DE FUSOBACTERIUM SPP. EN DIFERENTES ESTADIOS DE LESIÓN INTRAEPITELIAL CERVICAL Y CANCER CERVIOCOUTERINO EN MUJERES MEXICANAS.”**

Se extiende la presente a los veintiséis días de enero del dos mil dieciséis.

Atentamente

**Dr. Vicente Madrid Marina.**

Investigador en Ciencias Médicas F. SNI III  
Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer.  
Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas.  
Instituto Nacional de Salud Pública.



## 15.4 Anexo 4.

Cartas de aprobación del comité de ética y de bioseguridad del INSP..



Registro ante CONBIOÉTICA: 17CEI00120130424  
Registro ante COFEPRIS: 13 CEI 17 007 36  
FWA: 00015605

Cuernavaca, Morelos, a 10 de abril de 2016  
PT: 192

**YUVIA MICHELLE BARRERA ACOSTA**  
**Maestría en Salud Pública**  
**Área de concentración en Enfermedades Infecciosas**  
Presente

En relación a su protocolo de Proyecto de Titulación "**Prevalencia en cérvix de *Fusobacterium spp.*, en los diferentes estadios de la historia natural del cáncer cervicouterino**", me permito informarle que los miembros de este Comité han acordado otorgarle el dictamen de:

### **Exento de Revisión**

Lo anterior debido a que su investigación no incluye sujetos humanos y/o la base secundaria que está utilizando ya ha sido revisada y aprobada por este u otro Comité de Ética.

Le solicito atentamente que en caso de ocurrir algún cambio o actualización de datos que afecten el planteamiento actual de su protocolo de tesis, lo comunique oportunamente para someterlo a consideración de este Comité.

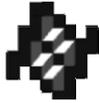
Atentamente

**Angélica Ángeles Llerenas**  
**Presidente**

ccp. – Dra. Elizabeth Ferreira Guerrero

Avenida Universidad 655  
Cerrada Los Pinos y Caminera  
Colonia Santa María Ahuacatitlán  
62100 Cuernavaca, Morelos, México  
com.: (777) 329 3000

**www.insp.mx**



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA  
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD



CBI6-058.

Cuernavaca, Mor., a 16 de marzo de 2016.

CB: 735

Yuvia Michelle Barrera Acosta  
Responsable de Proyecto  
Maestría en Enfermedades Infecciosas (MC)-ESPM  
P r e s e n t e

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el protocolo tesis titulado: "PREVALENCIA EN CÉRVIX DE FUSOBACTERIUM SPP., EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE LA HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER CERVICOUTERINO", el dictamen del Comité de Bioseguridad es: **APROBADO** debido a que dicho proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) y CRETI; por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Le recordamos que deberá entregar el resto de las cartas responsivas del manejo y disposición final de los RPBI del resto de los estados participantes en el proyecto así como de la lista detallada de los responsables de la entrega, traslado y recepción de material biológico del proyecto de investigación.

Atentamente,

Dra. Celia M. Alpuche Aranda  
Presidente del Comité  
de Bioseguridad-INSP

Col. Santa María Ahuacatlilán  
62508 Cuernavaca, Morelos, México

e-mail: [celia.alpuche@insp.mx](mailto:celia.alpuche@insp.mx)

Tel-Fax: 01 (777) 3293000 ext 7204  
Secretaría Técnica: ext 1525  
e-mail: [alejandra.contreras@insp.mx](mailto:alejandra.contreras@insp.mx)