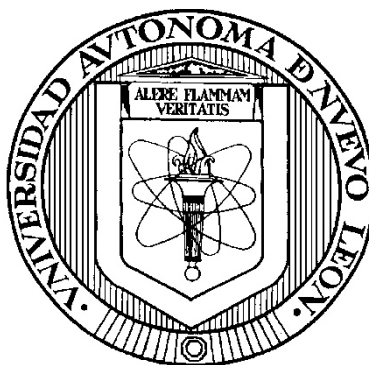


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA CITOLÓGICA EN FRESCO (CIFAR-CF)
PARA EL DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE INFECCIÓN GENITOURINARIA
POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y/O *Chlamydia trachomatis* EN
MUJERES INFÉRTILES**

Por


Q.C.B. DANIEL SALAS TREVIÑO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en
Morfología**


JULIO/2016

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA CITOLÓGICA EN FRESCO (CIFAR-CF)
PARA EL DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE INFECCIÓN GENITOURINARIA
POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y/O *Chlamydia trachomatis*
EN MUJERES INFÉRTILES


Aprobación de la Tesis:




Director de la Tesis
Dr. C. Adolfo Soto Domínguez



Co-Director de la Tesis
Dr. C. Salomón Álvarez Cuevas



Comisión de Tesis
Dr. Med. Alberto Niderhauser García



Dra. Med. Raquel Garza Guajardo
Subdirectora de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi familia, que ha sido mi motor para seguir en el camino del estudio y del saber, por haberme alentado a iniciar este paso en mi vida y sobre todo por apoyarme, estar ahí para mí y darme consejos siempre que los necesite durante todo este trayecto. Gracias mamá, gracias papá y a mi hermano Noé.

Gracias a mis tutores, que por encima de los conocimientos brindados me han dado su amistad y pusieron la confianza en mí para desarrollar este proyecto, en verdad agradezco cada minuto que gastaron en solucionar dudas, enseñarme sus experiencias, conocimientos y por siempre estar disponibles para cualquier problema. Dra. Gallegos por haberme dado la confianza de entrar en el grupo de trabajo y trabajar con sus pacientes, Dr. Adolfo Soto por estar siempre pendiente de mí y darme consejos no solo académicos si no personales, de verdad lo admiro y respeto mucho. Dr. Salomón gracias por todo su apoyo en el laboratorio, su amistad y las buenas charlas que hemos tenido, y finalmente al Dr. Niderhauser, le agradezco por todos los conocimientos y apoyos que nos brindó para este proyecto. Son un ejemplo a seguir. De la manera más sincera, muchas gracias.

De manera muy especial agradezco a mi pareja Judith, por todos los consejos que me ha dado y los momentos que hemos pasado juntos, has sido la fuente de mi inspiración y motivación para superar los obstáculos que se me han presentado y siempre has estado ahí empujándome a ser mejor, gracias por todo tu amor.

A mis amigos de toda la vida, gracias por todos los ratos de alegría que hemos pasado, por siempre estar presentes y no olvidar esta amistad.

A mis compañeros de la maestría, son personas invaluable con gran sentido del humor e inteligencia, me alegra mucho haber conocido gente como ustedes y espero conservar durante mucho tiempo su amistad. Roque, Héctor, Erick y David, gracias por todas esas tardes de cafetería, fueron extraordinarias.

A los compañeros del departamento de Patología y de Histología, que sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, que por sea cual fuere la ayuda que me hayan brindado, el aprecio de verdad. Muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, La Facultad de Medicina y a mi querida Universidad Autónoma De Nuevo León, por haberme dado los apoyos económicos para la realización de mi posgrado.

Por último, gracias a todas las personas que de alguna manera u otra hicieron posible que este proyecto se consolidará, y pudiera ser realizado.

RESUMEN

Q.C.B. Daniel Salas Treviño

Fecha de disertación: Julio, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título: Evaluación de una técnica citológica en fresco (CIFAR – CF) para el diagnóstico presuntivo de la infección genitourinaria causada por el Virus del Papiloma Humano y/o *Chlamydia trachomatis* en mujeres infértiles.

Número de páginas: 172

Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Morfología.

Área de estudio: Patología diagnóstica

Propósito y Método de Estudio: La infertilidad es un problema de salud mundial y una de las causas de esta condición son las infecciones de transmisión sexual (ITS). Los dos agentes causales de las ITS más comunes son el Virus del Papiloma Humano (VPH) y la bacteria *Chlamydia trachomatis*. El VPH está relacionado con alteraciones reproductivas como falla en la implantación del huevo a la matriz, o ruptura prematura de membranas en el parto. *Chlamydia trachomatis* tiene un extenso historial de evidencias en las que se le atribuyen problemas reproductivos, esto debido a que su infección comúnmente pasa sub-diagnosticada. En este trabajo se analizó el valor diagnóstico que posee un novedoso método citológico de alta resolución para la detección de estos dos patógenos, esto para proporcionar nuevas herramientas de estudio rápido y preciso para las pacientes que acuden a consulta ginecológica. Las muestras de una clínica privada de consulta ginecológica fueron analizadas por este método citológico de alta resolución para su análisis citopatológico, y los resultados fueron comparados contra las citologías convencionales actuales y contra la detección molecular de ADN de *Chlamydia trachomatis* y el VPH por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) considerada como estándar de oro.

Contribuciones y Conclusiones: En este estudio 122 muestras cervicales se lograron procesar de manera satisfactoria. Los datos demográficos y antecedentes reproductivos obtenidos son representativos de una población de mujeres infértiles que resultó tener una menor prevalencia de infecciones por VPH y/o *Chlamydia trachomatis* comparada con otras poblaciones de mujeres mexicanas infértiles y es la primera vez que se realiza la búsqueda de la coinfección por estos patógenos en mujeres infértiles. Se identificaron factores demográficos, antecedentes reproductivos y datos citopatológicos asociables a las infecciones por VPH y/o CT en la población estudiada. Se comprobó que la CIFAR – CF tiene mayor sensibilidad que la citología convencional de Papanicolaou (PAP) y mayor sensibilidad y especificidad que la citología convencional con tinción de Giemsa para detectar presuntivamente VPH en las mujeres infértiles, mientras que para la detección presuntiva de *Chlamydia trachomatis*, la CIFAR – CF, obtuvo mayor sensibilidad y especificidad comparada contra el PAP y la citología convencional con tinción de Giemsa.

Tabla de contenido

LISTA DE TABLAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA INFERTILIDAD: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA.....	2
1.1.1 <i>Definición de infertilidad.....</i>	2
1.1.2 <i>Epidemiología de la infertilidad.....</i>	3
1.1.3 <i>Causas de la infertilidad.....</i>	3
1.2 INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL	4
1.2.1 <i>Infecciones de transmisión sexual: Definición</i>	5
1.2.2 <i>Infecciones de transmisión sexual: Epidemiología</i>	5
1.2.3 <i>Infecciones de transmisión sexual: Factores de riesgo</i>	8
1.2.4 <i>Infecciones de transmisión sexual y la infertilidad.....</i>	8
1.3 LA INFECCIÓN GENITAL POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) ..	9
1.3.1 <i>La infección genital por el Virus del Papiloma Humano: Generalidades.</i>	10
1.3.2 <i>La infección genital por el Virus de Papiloma Humano: Asociación con la infertilidad.</i>	12
1.4 LA INFECCIÓN GENITAL CAUSADA POR <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	15
1.4.1 <i>La infección genital por Chlamydia trachomatis: Generalidades</i>	16
1.4.2 <i>La infección genital por Chlamydia trachomatis: Asociación con la infertilidad</i>	18
1.5 EL DIAGNÓSTICO EN EL LABORATORIO DE LAS INFECCIONES GENITALES CAUSADAS POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y/O <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	19
1.5.1 <i>El diagnóstico en el laboratorio de las infecciones genitales causadas por el Virus del Papiloma Humano y/o Chlamydia trachomatis: técnicas microscópicas.....</i>	20
1.5.2 <i>El diagnóstico en el laboratorio de las infecciones genitales causadas por el Virus del Papiloma Humano y/o Chlamydia trachomatis: técnicas moleculares</i>	21
1.6 LA CITOLOGÍA EN FRESCO DE ALTO CONTRASTE Y ALTA RESOLUCIÓN EN CAPA FINA (CIFAR-CF).	22

ANTECEDENTES	26
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	34
MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1 MATERIAL	37
6.1.1 Equipos utilizados.....	37
6.1.2 Reactivos y Materiales de Laboratorio utilizados.....	37
6.2. MUESTRAS DE LAS PACIENTES INFÉRTILES.....	39
6.2.1 Naturaleza y procedencia de especímenes, criterios de muestreo.	39
6.2.2 Proceso de la toma de muestra de exudado cérvico-vaginal y del cepillado cervical.....	39
6.3 MÉTODOS.....	41
6.3.1 Métodos de estudio por técnicas citológicas	41
6.3.2 Métodos de estudio por técnicas moleculares	46
6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
6.4.1 Estadística Descriptiva.....	54
6.4.2 Estadística Inferencial	54
RESULTADOS	55
7.1 EVALUACIÓN DE LOS EXUDADOS CÉRVICO-VAGINALES DE LAS PACIENTES INFÉRTILES MEDIANTE LAS TÉCNICAS CITOLÓGICAS DE CIFAR-CF, GIEMSA Y PAPANICOLAOU.	56
7.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CONFIRMATORIAS PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> EN LAS MUESTRAS DE EXUDADO CÉRVICO – VAGINAL DE LAS PACIENTES CON INFERTILIDAD.	77
7.3 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LAS CITOLOGÍAS (CIFAR – CF, PAPANICOLAOU Y GIEMSA) PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN GENITOURINARIA POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	83

7.4 RESULTADOS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS DATOS DEMOGRÁFICOS Y ANTECEDENTES DE INFERTILIDAD DE LA POBLACIÓN Y LOS HALLAZGOS CITOLÓGICOS CON LA PRESENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y/O <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	91
<i>DISCUSIÓN</i>	105
<i>CONCLUSIONES</i>	137
<i>PERSPECTIVAS</i>	139
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	141

LISTA DE TABLAS

Tabla I.I. Trabajos previos enfocados en la investigación de la repercusión de la presencia de la infección por VPH en los parámetros seminales.

Tabla VI – I. Protocolo establecido para la coloración con la técnica de Papanicolaou en las citologías cervicales convencionales.

Tabla VI - II. Especificaciones de la PCR empleada para la detección del gen de la Beta-Globina en el ADN extraído a partir de los exudados cérvico-vaginales.

Tabla VI - III. Especificaciones de la PCR empleada para la detección del VPH en el ADN extraído a partir de los exudados cérvico-vaginales.

Tabla VI - IV. Especificaciones de la PCR empleada para la detección de *Chlamydia trachomatis* en el ADN extraído a partir de los exudados cérvico-vaginales.

Tabla VII – I. Datos demográficos de las pacientes involucradas en el estudio.

Tabla VII – II. Datos históricos relacionados con infertilidad en el grupo de pacientes estudiado.

Tabla VII – III. Resultados de las observaciones de los elementos celulares y acelulares asociados a inflamación en los ECV de las pacientes infértiles.

Tabla VII – IV. Resultados microbiológicos obtenidos con el análisis citológico de los ECV de las pacientes con infertilidad.

Tabla VII – V. Resultados del diagnóstico con la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou en las pacientes estudiadas.

Tabla VII – VI. Resultados de las observaciones en los ECV para la detección presuntiva bajo criterio morfológico para VPH y *Chlamydia trachomatis*.

Tabla VII - VII. Resultados de las pruebas confirmatorias para la detección de VPH y *Chlamydia trachomatis* en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Tabla VII – VIII. Comparativa entre los resultados y pruebas estadísticas del valor diagnóstico de CIFAR – CF contra los obtenidos por PCR para la detección de VPH.

Tabla VII – IX. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico del Papanicolaou y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de VPH.

Tabla VII – X. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la citología cervical con tinción de Giemsa y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de VPH.

Tabla VII – XI. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la CIFAR y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Tabla VII – XII. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico del PAP los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Tabla VII – XIII. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la citología con tinción de Giemsa y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Tabla VII – XIV. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la Inmunofluorescencia directa y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Tabla VII – XV. Conjunto de los valores diagnósticos de las técnicas citológicas analizadas para la detección del VPH y *Chlamydia trachomatis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Incidencia de las ocho principales infecciones de transmisión sexual en Estados Unidos en el 2008.

Figura 1.2 - Representación esquemática del genoma del VPH que ilustra la ubicación de las proteínas virales “E” y “L” y la región reguladora río arriba.

Figura 7.1 - Leucocitos abundantes en ECV.

Figura 7.2 - Macrófagos abundantes en ECV.

Figura 7.3 - Eritrocitos en ECV.

Figura 7.4 - Detritus celulares en ECV.

Figura 7.5 - Cristales en ECV.

Figura 7.6 - Abundantes bacterias cocoides.

Figura 7.7 - Abundantes bacterias bacilares en el ECV.

Figura 7.8 - Estructuras fúngicas en el ECV.

Figura 7.9 - Papanicolaou Clase I.

Figura 7.10 - Papanicolaou de Clase II.

Figura 7.11 - Papanicolaou de Clase III.

Figura 7.12 - Células con el efecto citopático del VPH (Coilocitos).

Figura 7.13 - Células con inclusiones morfológicamente compatibles con *Chlamydia trachomatis* (IMCCT).

Figura 7.14. - Gráfico de relación entre la presencia de leucocitos con otros signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.15 - Gráfico de relación entre la presencia de leucocitos con elementos microbiológicos en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.16 - Gráfico de relación entre la presencia de macrófagos con otros signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.17 - Gráfico de relación entre la presencia de macrófagos con estructuras microbiológicas presentes en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.18 - Gráfico de relación entre la presencia de signos citomorfológicos de infección con coilocitosis en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.19 - Gráfico de relación entre la presencia de estructuras microbiológicas con coilocitosis en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.20 - Gráfico de relación entre la presencia de células con IMCCT con signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.21 - Gráfico de relación entre la presencia de células con IMCCT con estructuras microbiológicas en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Figura 7.22 - Micrografías de la técnica de Inmunofluorescencia directa empleada en la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Figura 7.23 - Gel electroforético de la amplificación del gen de la proteína β – Globina de las muestras 39 a la 51.

Figura 7.24 - Gel electroforético de la amplificación por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis* de las muestras 64 a la 68.

Figura 7.25 - Gel electroforético de la amplificación de la PCR para la detección del VPH de las muestras 34 a 42.

Figura 7.26 - Promedios de los datos generales de las pacientes infectadas y no infectadas con VPH y resultado de las pruebas estadísticas.

Figura 7.27 - Gráfico de asociación entre los datos históricos de infertilidad con la presencia de VPH.

Figura 7.28 - Promedios de los datos generales de las pacientes infectadas y no infectadas con *Chlamydia trachomatis* (CT) y resultado de las pruebas estadísticas.

Figura 7.29 - Gráfico de asociación entre los datos históricos de infertilidad con la presencia de *Chlamydia trachomatis*.

Figura 7.30 - Promedios de los datos generales de las pacientes coinfectadas y no coinfectadas con VPH y CT y el resultado de las pruebas estadísticas.

Figura 7.31 - Gráfico de asociación entre los datos históricos de infertilidad con la coinfección de VPH y CT.

Figura 7.32 - Comparación de los rangos promedios de los hallazgos citológicos significativos entre las muestras VPH (+) y VPH (-).

Figura 7.33 - Gráfico de asociación entre el resultado del Papanicolaou e infección por VPH.

Figura 7.34 - Comparación de los rangos promedios de los hallazgos citológicos significativos entre las muestras CT (+) y CT (-).

Figura 7.35 - Comparación de los rangos promedios de los hallazgos citológicos significativos entre las muestras VPH y CT (+) y VPH y CT (-).

Figura 7.36 - Gráfico de asociación entre el resultado del Papanicolaou y la coinfección por VPH y CT.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

NIH: National Institute of Health

ASRM: American Society of Reproductive Medicine

ITS: Infecciones de Transmisión Sexual

OMS: Organización Mundial de la Salud

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HSV – 2: Virus del Herpes Simple tipo 2

VPH: Virus del Papiloma Humano

VHB: Virus de la Hepatitis B

CDC: Center for Diseases Control

URR: Upstream Regulatory Region (inglés de región regulatoria rio arriba)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: AdenosinTrifosfato

CE: Cuerpo Elemental de *Chlamydia*

CR: Cuerpo Reticular de *Chlamydia*

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

LBC: Liquid – Base Cytology (Ingles de: Citología en base liquida)

MOMP: Mayor Outside Membrane Protein (inglés de: Proteína Mayor de Membrana Externa)

HSP60: Heat Shock Protein 60 Kilodatons (inglés de: Proteína de Choque térmico de 60 Kilodaltones)

CIFAR – CF: Citología en fresco de alto contrate y alta resolución en capa fina

ECV: Exudado Cérvico-Vaginal

IFD: Inmunofluorescencia Directa

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH: Potencial de Hidrógeno

°C: Grados Celsius

%: Por ciento

mL: Mililitros

μL: Microlitros

RPM: Revoluciones por minuto

Mm: Milímetros

Pb: Pares de bases

IC: Intervalo de Confianza

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

EOH: Estimulación Ovárica Hormonal

IMCCT: Inclusiones Morfológicas *Compatibles con Chlamydia trachomatis*

LAD: Marcador de Peso Molecular

LIB: Carril Libre

CN: Control Negativo

CP: Control Positivo

VPP: Valor Predictivo Positivo

VPN: Valor Predictivo Negativo

IVSA: Inicio de Vida Sexual Activa

CT: *Chlamydia trachomatis*

PMN: Leucocitos Polimorfonucleares

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA INFERTILIDAD: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA.

La infertilidad o subfertilidad ha adquirido en los últimos tiempos una mayor importancia como problema de salud mundial, sobre todo en las ciudades de mayor densidad poblacional, donde debido a las presiones sociales y laborales, las personas suelen vivir bajo situaciones de estrés y un estilo de vida muy alterado que se vuelve propenso a desarrollar complicaciones reproductivas tanto en el hombre como en la mujer, las cuales afectan de manera directa la capacidad de concebir un hijo (Brugo-olmedo, *et al.* 2003).

1.1.1 Definición de infertilidad

La infertilidad no tiene una definición generalizada pues depende mucho desde la perspectiva que se esté atendiendo el problema, ya sea en la clínica, procedimientos de medicina reproductiva o en la demografía, sin embargo, entidades importantes como la National Institute of Health (NIH) o la American Society of Reproductive Medicine (ASRM) han establecido las definiciones más aceptadas en el campo de la medicina. (Gurunath, *et al.* 2011). Debido a que no existe un consenso en los criterios diagnósticos, es frecuente que los pacientes que padecen esta patología, no sean diagnosticados en el tiempo y de la manera apropiada, perdiendo tiempo e incrementando el gasto en atención de la salud al retrasar su tratamiento (Evers, 2002).

La ASRM, define infertilidad como la incapacidad para que una pareja logre un embarazo exitoso (que resulte en un recién nacido vivo) después de practicar relaciones sexuales sin utilizar métodos anticonceptivos durante un lapso de al menos 12 meses (Tarín,

et al. 2015), esta definición es la más aceptada a nivel mundial, al estar estructurada por una asociación especializada en este tipo de alteraciones.

1.1.2 Epidemiología de la infertilidad

La incidencia anual global de la infertilidad se estima en 1.2 parejas de cada 1000 en población general y se tienen promedios de prevalencias en distintos países que van desde el 8% hasta el 20% (Wilkes, *et al.* 2009), por lo que se considera que afecta aproximadamente de 60 a 80 millones de parejas alrededor del mundo de las cuales la mayoría viven en países en vías de desarrollo (Suneeta *et al.* 2012).

Como se mencionó anteriormente, los factores socioeconómicos del país en donde se reside repercuten directamente en la prevalencia de la enfermedad, se ha visto que existe un mayor porcentaje de parejas infértiles en los países en vías de desarrollo contra los países desarrollados (3.5-16.7% vs 6.9-9.3%) e inclusive, en algunas regiones del África este porcentaje se eleva hasta el 40% (Bahamondes & Makuch, 2014).

En diversos estudios se ha comprobado que factores como la etnia, el estatus socioeconómico, la calidad de vida, la autoestima, el estrés laboral y el género están relacionados con la prevalencia y tratamiento de la infertilidad (Keramat, *et al.* 2014; Kessler, *et al.* 2013), siendo aquellas personas con bajo estatus socioeconómico, quienes presentan bajas tasas de tratamientos exitosos después de haber sido diagnosticados (Smith, *et al.* 2011).

1.1.3 Causas de la infertilidad

Entre las causas más comunes que provocan infertilidad en la mujer se encuentran los desórdenes ovulatorios, alteraciones tisulares estructurales en el oviducto (mejor conocido

como factor tubárico), adhesiones peritoneales que afectan la permeabilidad del útero, endometriosis, anormalidades uterinas; en el varón las alteraciones morfológicas de los espermatozoides y el envejecimiento físico y metabólico tanto de la mujer como del hombre (Adamson & Baker, 2003). Generalmente, se acepta que en conjunto estas causas representan el 75% de los casos de infertilidad, mientras que el otro 25% lo abarcan aquellos casos de infertilidad inexplicable, es decir, que no se le puede encontrar una causa clínica aparente (Hart, 2003).

Una de las causas de la infertilidad más frecuente son las alteraciones tubárico-peritoneales, aproximadamente el 30% de las parejas infértiles padecen este tipo de patologías del tracto reproductivo femenino, inducido por la presencia de adhesiones pélvicas debidas a infecciones crónicas, enfermedad inflamatoria pélvica o endometriosis, las cuales son causadas principalmente por las infecciones de transmisión sexual de carácter crónico y persistente (Brugo-Olmedo *et al.* 2003).

1.2 INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) tienen una gran repercusión en la salud sexual y reproductiva de la mujer.

Las mujeres son consideradas con mayor vulnerabilidad a ser infectadas, ya que este tipo de infecciones se detectan hasta que las complicaciones surgen, lo que ayuda a su diseminación (Ortayli, *et al.* 2014) y a que las secuelas que se presenten en la mayoría de los casos sean difíciles de revertir.

1.2.1 Infecciones de transmisión sexual: Definición

Las ITS son aquellas que se transmiten a través del contacto sexual íntimo ya sea por coito vaginal, sexo anal o sexo oral, sin importar que la relación sea heterosexual u homosexual (of Nurse-Midwaves, 2013).

A lo largo de los años, las ITS se han considerado como un problema de salud pública importante debido al gran impacto que tienen en la calidad de vida de las personas infectadas. La sintomatología típica de estas infecciones en la mujer se encuentra la presencia de dolor o ardor en la zona genital, flujo vaginal y dolor abdominal; en el caso de los hombres se observa con frecuencia la presencia de secreción uretral así como ardor al orinar y en los casos más drásticos se presentan úlceras genitales (OMS, 2015).

Por otra parte, estas infecciones suelen repercutir también en la salud mental de los pacientes presentando frecuentemente signos de depresión, ansiedad o frustración (Graziottin & Serafini, 2009).

Importantemente, las infecciones que pasan desapercibidas y sin tratamiento pueden tornarse crónicas y persistentes, lo que incrementa la posibilidad de generar secuelas que lleven a provocar infertilidad (Gradison, 2012).

1.2.2 Infecciones de transmisión sexual: Epidemiología

Según la OMS, actualmente las ITS se encuentran dentro de los primeros cinco motivos de consulta, además de que cada día un millón de personas contraen una infección de esta índole (OMS, 2015).

Los patógenos más comunes y reconocidos que se transmiten sexualmente son ocho y los agentes causales son el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus del Herpes Simple Tipo 2 (VHS-2), Virus del Papiloma Humano (VPH), Virus de la Hepatitis B (VHB),

Chlamydia trachomatis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* (sífilis) y *Trichomonas vaginalis* (Fuchs & Brockmeyer, 2014; of Nurse-Midwaves, 2013) (Ver Figura 1.1). Estos gérmenes están distribuidos por todo el orbe, estudios recientes han logrado correlacionar la prevalencia de estas enfermedades con la región geográfica mundial, siendo menos prevalente en el este de Asia, el norte de África y el Medio Oriente, por otro lado la región con mayor prevalencia fue la del África Sub-Sahariano (Kenyon, *et al.* 2014).

Reportes actualizados de la Centro de control de enfermedades en Estados Unidos (CDC) muestran que las ITS en la población estadounidense tienen una incidencia de 20 millones de infecciones por año, y que la prevalencia, es decir, las infecciones nuevas más las previamente registradas, suman alrededor de 110 millones, representando esto, un gasto económico de más de 16 billones de dólares por año por el costo de atención a los pacientes (CDC, 2013).

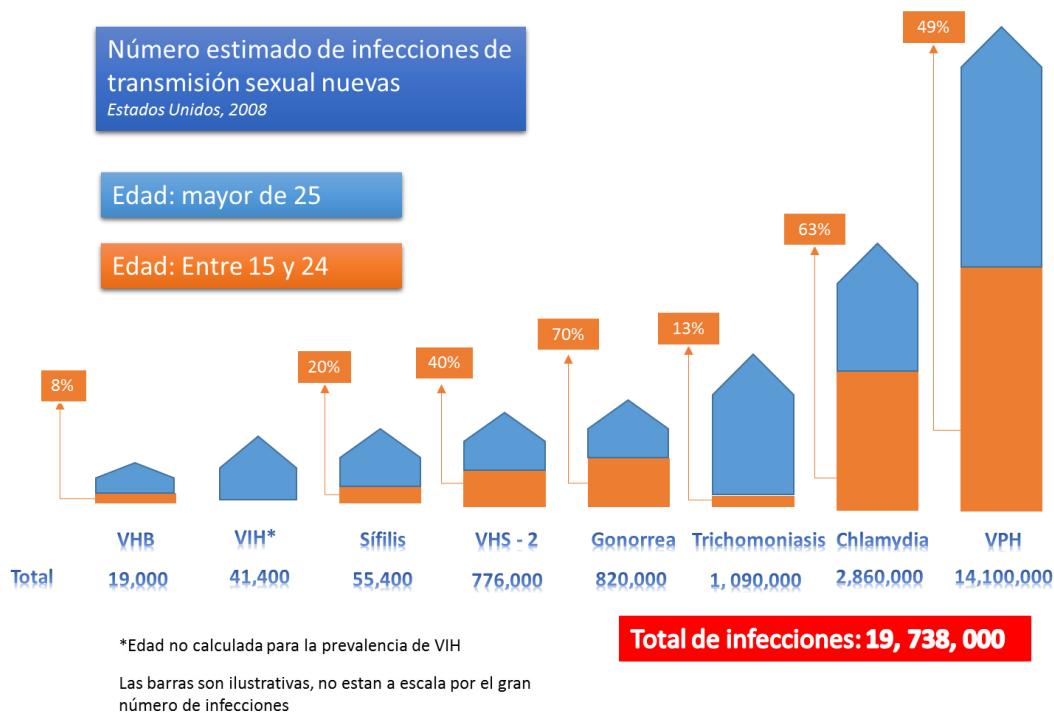


Figura 1.1 – Incidencia de las ocho principales infecciones de transmisión sexual en Estados Unidos en el 2008. (Modificado de CDC, 2013)

Desde la perspectiva económica, las enfermedades de transmisión sexual son un problema muy importante de orden global, ya que presentan una alta morbilidad y mortalidad por lo que es necesario invertir cantidades importantes de dinero, tanto por parte del gobierno como de los pacientes infectados, ya que los tratamientos para estas infecciones son en la mayoría prolongado y costoso. En Estados Unidos en el año 2010 se atendieron 19.7 millones de casos de las principales ocho enfermedades de transmisión sexual, lo que generó un gasto total estimado de 15.6 billones de dólares. Solamente en las infecciones atribuidas al VPH fue de 1.7 billones de dólares y para las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* el gasto fue de 516.7 millones de dólares, las cuales son las dos ITS más comunes en Estados Unidos (Gaydos & Hardick, 2014).

1.2.3 Infecciones de transmisión sexual: Factores de riesgo

En la actualidad, se considera que las ITS tienen múltiples factores que incrementan su frecuencia. El nivel socioeconómico bajo y por consiguiente la escasa educación y conocimiento de estas infecciones son las razones por las que estas patologías son tan frecuentes y continúan elevándose (Crichton, *et al.* 2015).

Así mismo, son muy comunes entre la población joven las prácticas sexuales de riesgo como tener múltiples parejas sexuales, inicio de vida sexual activa a edad temprana, tener relaciones con sexo-servidoras(es), poco o nulo uso del preservativo (Gates, *et al.* 2015) lo cual incrementa considerablemente la probabilidad de adquirir una ITS (Charu, *et al.* 2015). Por todo lo anteriormente mencionado, existe una necesidad inherente de ahondar en las estrategias de prevención de estas enfermedades que afectan a poblaciones de todas las edades, orientación sexual y nivel socioeconómico. Por lo que se debe de implementar una cultura de la prevención adecuada, ampliando a la población la información necesaria y realizar campañas de monitoreo generalizado frecuentemente, lo que ayudará en gran parte al personal clínico a la detección oportuna y tratamiento óptimo de estas enfermedades (Owusu-Edusei Jr, *et al.* 2013).

1.2.4. Infecciones de transmisión sexual y la infertilidad.

Las ITS afectan de manera variable en el humano dependiendo de su localización, naturaleza y patógeno que se encuentre causando la enfermedad, de los ocho principales microorganismos mencionados anteriormente (VPH, VIH, VHS-2, VHB, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* y *Treponema pallidum*) los dos más frecuentes: VPH y *Chlamydia trachomatis*, se han relacionado con patologías

asociadas a alteraciones reproductivas en hombres y mujeres (Ljubin-Sternak & T, 2014; Souho, *et al.* 2015).

La infección por el VPH y la infección genital por *Chlamydia trachomatis* son dos de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes en nuestra región (De Haro-Cruz *et al.* 2011; López Rivera, *et al.* 2012) y últimamente han sido objeto de estudio por su gran repercusión en las consecuencias que conllevan, como lo es el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (Haedicke & Iftner, 2013; Koskela *et al.*, 2000) además de diversas alteraciones seminales y gestacionales relacionadas al VPH y Enfermedad Inflamatoria Pélvica, así como complicaciones gineco-obstétricas que confluyen en la aparición de infertilidad por parte de *Chlamydia trachomatis* (Agrawal, *et al.* 2009; Zuo, *et al.* 2011), por lo que se debe poner especial atención en las infecciones ginecológicas causadas por estos patógenos para que se lleve a cabo el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de manera correcta y oportuna, lo que reduciría la aparición de estas patologías y secuelas que conducen a complicaciones como la infertilidad e inclusive consecuencias mortales como el cáncer.

1.3 LA INFECCIÓN GENITAL POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Desde el punto de vista ginecológico, la consecuencia más letal de la infección genital por el VPH es el desarrollo de cáncer cérvico-uterino, sin embargo, no es la única.

Últimamente se ha comenzado a mencionar al VPH como un factor importante a tomar en cuenta para la salud reproductiva humana, existen diversos estudios donde se asocia la presencia del VPH con distintos problemas reproductivos (Souho *et al.*, 2015). Estos estudios dan la pauta para seguir en el camino del conocimiento hacia entender el papel que tiene la

infección del VPH no solo como la causa del cáncer cérvico-uterino sino también como la agente causal del desarrollo de la infertilidad atribuible a una infección microbiológica.

Está documentado que la infección del VPH tiene repercusiones en la salud reproductiva tanto del hombre como de la mujer y la mayoría de los estudios que abordan estas líneas de investigación abarcan una gran gama de padecimientos que afectan la vida reproductiva y fertilidad de la pareja (Gizzo *et al.*, 2014). Por lo tanto, es de gran importancia encontrar las posibles asociaciones que puedan existir entre el VPH y dichos eventos.

1.3.1 La infección genital por el Virus del Papiloma Humano: Generalidades.

Los VPH son un grupo viral de aproximadamente 118 genotipos perteneciente a la familia *Papoviridae* de los que alrededor de unos 40 se ha visto que infectan el tracto genital y 12 han sido clasificados como altamente carcinogénicos (Sanjose *et al.*, 2010).

El Virus del Papiloma humano (VPH) mide aproximadamente de 55 nm, es un virus de ADN de doble cadena circular con un genoma de cerca de 8000 pares de bases que generan ocho proteínas virales de dos distintas clases: Las tempranas denominadas con la letra “E” (Del inglés *Early*), y tardías o “L” (Del inglés *Late*) (Muñoz, *et.al*, 2006) (Ver Figura 1.2).

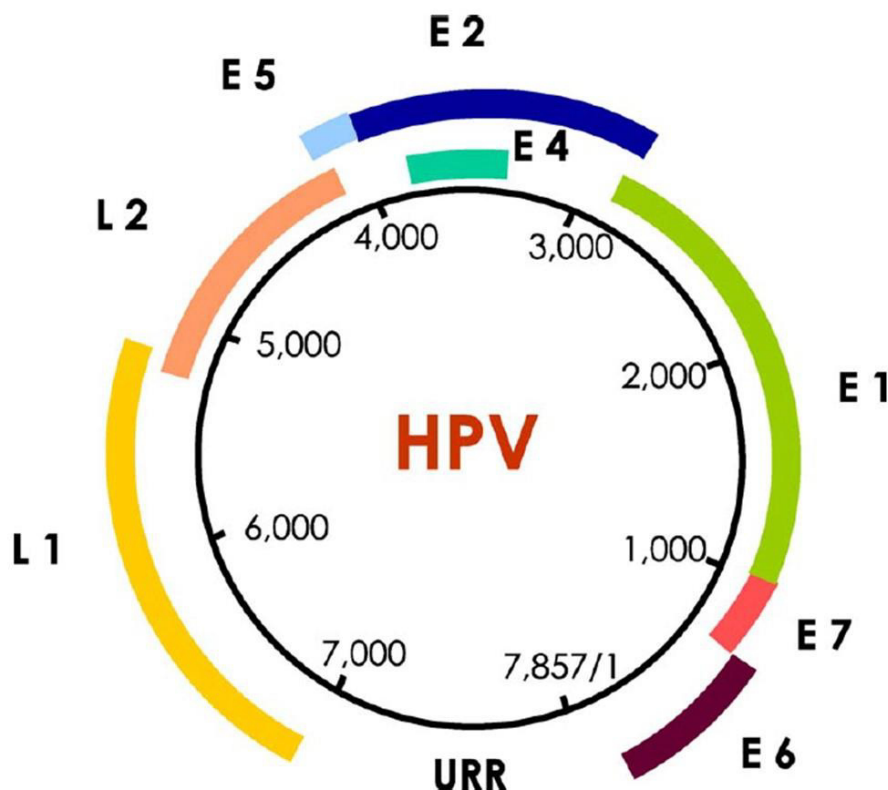


Figura 1.2 – Representación esquemática del genoma del Virus del Papiloma Humano que ilustra la ubicación de las proteínas virales “E” y “L” y la región regulatoria río arriba.(Muñoz et al., 2006)

Este microorganismo no está cubierto por una envoltura, más bien cuenta con una nucleocápside proteica icosaédrica con 72 capsómeros, presenta tropismo a los epitelios mucosos cilíndricos o escamosos tales como el tracto reproductivo femenino y masculino, boca y también epitelio nasal. Los VPH son capaces de formar papilomas benignos así como desarrollar mutaciones en el ADN de las células huésped, provocando teratogénesis y tumorigénesis (Haedicke & Iftner, 2013).

La infección por VPH tiene como manifestación más común la aparición de verrugas genitales o cutáneas benignas que pueden ser fácilmente tratadas (Koshiol, *et.al*, 2004), sin embargo, en las infecciones persistentes con genotipos carcinogénicos pueden desarrollarse

múltiples tipos de cáncer dependiendo de su localización ya sea en cérvix, vagina, vulva, pene, cavidad oral, cabeza o cuello o en el canal anal (Giuliano *et al.*, 2011).

El cáncer cérvico-uterino está considerado como el cuarto más común en la mujer, GLOBOCAN en el 2012 estimó que se diagnosticaron 528,000 casos en ese año, así mismo 275,128 fallecimientos debido a este padecimiento. Datos de esta misma fuente muestran que México presenta una incidencia anual de entre 20.6 a 30.2 personas por cada 100,000 habitantes, y la mortalidad se estima entre 9.8 a 17.5 por cada 100,000 habitantes (GLOBOCAN, 2012).

Existen algunos cofactores que se conjugan con la infección del VPH para desarrollar cáncer cérvico-uterino tales como: la infección por *Chlamydia trachomatis*, VHS-2, el hábito de fumar tabaco, ingesta de anticonceptivos orales, inicio de vida sexual a temprana edad, múltiples embarazos, nivel socio-económico bajo, inmunosupresión, inflamación crónica, deficiencias nutrimentales, polimorfismos en los genes que codifican a las proteínas de procesamiento de antígenos y otras respuestas inmunogenéticas del huésped (Bhatla *et al.* 2013).

1.3.2 La infección genital por el Virus de Papiloma Humano: Asociación con la infertilidad.

Actualmente se conocen algunos aspectos que relacionan la presencia de la infección por el VPH y la infertilidad. En pacientes masculinos se ha encontrado asociaciones entre deficiencias en la calidad espermática y la presencia del VPH, sobre todo en los parámetros espermáticos de motilidad progresiva y la morfología de los espermatozoides (Foresta, *et al.* 2010; Yang, *et al.* 2013), sin embargo, esta relación genera cierta controversia debido a que existen estudios en donde se han analizado estos mismos parámetros y no se ha visto

correlación entre la infección y la disminución de estas características (Golob *et al.* 2014; Schillaci *et al.* 2013). (Tabla I.I).

Estudio	Diseño del Estudio	N	Motilidad espermática	Cuenta espermática	Morfología espermática normal
Yang Y et al, 2013	Control de casos	1138	Disminuida	Disminuida*	Disminuida
Garolla et al, 2013	Prospectivo – Transversal	257	Disminuida	Disminuida*	Incrementada*
Foresta et al, 2010	Prospectivo– Transversal	290	Disminuida	Disminuida	Disminuida*
Foresta et al, 2010	Prospectivo – Transversal	200	Disminuida	Disminuida*	Disminuida*
Lai et al, 1997	Prospectivo – Transversal	24	Disminuida		
Bezold et al, 2007	Control de casos	241		Disminuida	
Schilaci et al, 2013	Prospectivo – Transversal	308	Incrementada*	Disminuida*	Incrementada*

Tabla I.I. – Trabajos previos enfocados en la investigación de la repercusión de la presencia de la infección por VPH en los parámetros seminales. (Modificado de Suoho *et al.*, 2015)

* = Valores significativos $P < 0.05$.

Recientemente se ha encontrado que dicho patógeno puede internalizarse tanto en los espermatozoides como en las células inflamatorias del líquido seminal (Garolla, *et al.*, 2011), lo que puede ser una posible explicación de que el paciente presente pérdida de la motilidad espermática y oligozoospermia al cambiar el metabolismo proteico. Por otra parte, en estudios realizados en pacientes masculinos de parejas infértiles que acuden a realizarse técnicas de reproducción asistida, se ha observado la asociación que existe entre la infección con VPH y el aumento en los embarazos no exitosos (Perino *et al.*, 2011).

En las mujeres, existen investigaciones que han encontrado asociaciones entre la presencia del VPH y la aparición de alteraciones reproductivas, además de anormalidades en las citologías cervicales (Zuo *et al.*, 2011), estos hallazgos aún permanecen en discusión, ya que hace falta dilucidar los mecanismos por los cuales este virus ocasiona estas alteraciones.

Uno de los puntos de inflexión más importantes en la investigación de este campo fue el descubrimiento realizado por Gómez y colaboradores en donde vieron que este virus tiene la capacidad de infectar la placenta y han visto que está fuertemente relacionada con la aparición de partos prematuros (Gomez *et al.*, 2008), en este sentido, se han desarrollado recientemente algunos trabajos de investigación que también señalan esta asociación (Cho *et al.*, 2013; Zuo *et al.*, 2011), lo que sugiere que la presencia del virus afecta en gran parte el proceso del embarazo tardío y el parto a término.

Los abortos espontáneos son sin duda, uno de los acontecimientos más devastadores para la salud física y mental de las parejas infértiles, en algunos estudios se ha reportado que la presencia del VPH es significativamente mayor en aquellos productos que se liberan cuando ocurre un aborto espontáneo en comparación con un aborto clínico electivo (Hermonat *et al.*, 1997), no obstante, existen otros trabajos que no reproducen esta relación (Skoczyński, *et al.*, 2011). En base a estos resultados se ha discutido la controversia sobre el papel del VPH y su repercusión con estos eventos, el mecanismo de acción y explicaciones que sustenten estas tendencias.

De manera interesante, la infección por el VPH también influye en el éxito de las técnicas de reproducción asistida ya que se ha visto que existe una menor posibilidad de lograr un embarazo satisfactorio en las pacientes infectadas contra las que no lo están (Spandorfer *et al.*, 2006).

En estudios empleando modelos *in vitro*, los cuales buscan aclarar los mecanismos por los cuales el VPH afecta negativamente los aspectos reproductivos en el hombre, se ha encontrado en modelos murinos embrionarios que este virus tiene un efecto inhibitor en el crecimiento del cigoto hacia el blastocisto así como en la adhesión de este a la pared del útero (Henneberg, *et al*, 2006), inclusive se ha encontrado que tiene la capacidad de inducir la muerte celular programada en el blastocisto a través del mecanismo de fragmentación del ADN (Calinisan,*et al*, 2002; Hong, *et al*, 2013).

1.4 LA INFECCIÓN GENITAL CAUSADA POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

La infección por *Chlamydia trachomatis* urogenital es la enfermedad de transmisión sexual de carácter bacteriano más común en el mundo, cada año aproximadamente 100 millones de casos son diagnosticados mundialmente, y se cree que esta cifra está subestimada (Land *et al*, 2010), ya que suele pasar como una enfermedad silenciosa que no genera una fase aguda prominente que ayude a percibir los síntomas en aproximadamente dos tercios de las mujeres afectadas, por lo que pasa sin ser notada por la persona infectada, no es diagnosticada y no recibe tratamiento, por lo que con frecuencia es una infección crónica persistente, con efectos subclínicos y alteraciones de la fertilidad (Alvarez Cuevas, 2012; Mylonas, 2012).

Actualmente, se han reportado diversos trabajos mostrando que *Chlamydia trachomatis* está incrementando su resistencia a los antibióticos de rutina utilizados para su tratamiento, esto debido a su alta tasa de re-infección y de infecciones persistentes que no son eliminadas en su totalidad (Dean, 2009) y aunque los programas de monitoreo se han practicado en varios países, la prevalencia mundial sigue creciendo, demostrando la

necesidad de establecer métodos efectivos de detección oportuna y una mayor difusión de la prevención de este tipo de infecciones (Spiliopoulou, *et al.* 2005).

1.4.1 La infección genital por *Chlamydia trachomatis*: Generalidades

Chlamydia trachomatis es la bacteria más representativa del genero *Chlamydia*, es un patógeno intracelular obligado que para completar su ciclo de vida, requiere infectar e instalarse en células eucariotas para utilizar sus vías metabólicas (Choroszy-Król *et al.* 2012). *Chlamydia trachomatis*, se ha catalogado como una bacteria gram negativa no móvil y posee membrana interna y externa. *Chlamydia trachomatis* es una bacteria aerobia que necesita de ATP de la célula huésped, aunque recientemente se ha visto que el genoma de esta bacteria tiene genes que codifica para ADP/ATP translocasas, ATPasa vacuolar y ATPasas flagelares, que pueden estar involucradas en la generación de ATP por la propia bacteria. Durante el ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*, se presentan dos fases morfológicamente y metabólicamente distintas (Stephens, *et al.* 1998). La forma infecciosa es denominada Cuerpo Elemental (CE), el cual es metabólicamente inactivo y muy resistente a factores ambientales adversos y la forma replicativa que es metabólicamente activa se denomina Cuerpo Reticular (CR) (Cervantes G, 2009).

La OMS publicó la incidencia global de las enfermedades de transmisión sexual curables, donde está incluida la causada por *Chlamydia trachomatis*, la cual tiene una cantidad estimada de 105.7 millones de casos nuevos solo en el año 2008, de los cuales 26.4 millones se presentaron en la región de las Américas (OMS, 2012).

La infección por *Chlamydia trachomatis* puede causar daños severos como: infertilidad por obstrucción tubárica, patología del tracto genital masculino, o enfermedades

cardiovasculares autoinmunes. Además, está comprobado que la presencia de esta infección, facilita el contagio por el VIH y el VPH (Malhotra *et al.* 2013).

La mayoría de las infecciones por esta bacteria en las mujeres cursa como asintomática (60-80%), pero la gama de síntomas que pueden aparecer incluye la cervicitis mucopurulenta, endometritis, salpingitis, síndrome uretral, proctitis, sepsis post-aborto y perihepatitis (Molano *et al.* 2005).

En los hombres, al igual que las mujeres, la mayoría de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* pasan sin ser detectadas, en ocasiones se llegan a manifestar síntomas como uretritis, prostatitis, epididmitis y orquitis (Al-Moushaly, 2013). No se ha logrado establecer una asociación de esta infección con la alteración de los parámetros seminales, a nivel de ultraestructura se ha observado que la cabeza del espermatozoide se altera con la presencia de este patógeno, pero esto no representa mayor lo que los hace un reservorio muy adecuado para transmitir la enfermedad (Lee & Lee, 2013).

Existen numerosos estudios que correlacionan la presencia de *Chlamydia trachomatis* como cofactor para el desarrollo de neoplasia cervical intraepitelial (NIC), aunque existe mucha contradicción en esta asociación, ya que ciertos estudios reportan que no existe relación estadísticamente significativa entre la presencia de *Chlamydia trachomatis* y el desarrollo de NIC (Bhatla *et al.* 2013) mientras que por otro lado, diversos trabajos reportan un alto grado de asociación entre la infección y el desarrollo de estas lesiones (Koskela *et al.* 2000; Smith *et al.* 2002). Estos resultados en donde se asocia la presencia de estos dos microorganismos apoyan la teoría de que al existir una inflamación crónica hay más posibilidad de contraer una infección viral debido a la presencia alta de células inflamatorias en la zona genital (Oliveira *et al.* 2008).

1.4.2 La infección genital por *Chlamydia trachomatis*: Asociación con la infertilidad

El papel que tiene la infección crónica por *Chlamydia trachomatis* en la infertilidad ha sido ampliamente estudiado en el pasado y se tienen muchas evidencias de que la infección crónica de este patógeno lleva al desarrollo de múltiples alteraciones reproductivas.

La patogenia que ocurre en las infecciones por *Chlamydia trachomatis* se monta una respuesta inflamatoria sostenida que continuamente está reclutando células que liberan factores quimiotácticos, los cuales van desarrollando un daño tisular en el tejido afectado, provocando una posterior cicatrización y fibrosis tisular y pérdida de la función tisular normal (Molano *et al.* 2005), por lo que tejidos como endometrio y las trompas de Falopio se ven muy afectadas en su estructura y función, desarrollando así problemas para la correcta fecundación e implantación del óvulo.

El aborto espontáneo ha sido un problema recientemente estudiado ya que representa uno de las repercusiones más severas dentro de las alteraciones reproductivas y se ha visto que las pacientes presentan estos eventos al portar títulos altos de anticuerpos IgG contra *Chlamydia trachomatis* (Vigil *et al.* 2002), además en las placentas de abortos espontáneos es frecuente encontrar al microorganismo *in situ* (Baud, *et al.* 2011), estos resultados que apoyan la idea de que la infección crónica por *Chlamydia trachomatis* está relacionada con la manifestación de abortos espontáneos.

También se ha reportado que en la infertilidad por factor tubárico la infección por *Chlamydia trachomatis* tiene un importante papel (Briceag *et al.* 2015), la mayoría de estas pacientes han cursado con cuadros asintomáticos en donde la bacteria logra ascender hasta esta zona del tracto genital superior sin dar signos de su presencia, repercutiendo en el desarrollo del factor tubárico (Kodaman, *et al.* 2004), esta alteración puede tener cómo motivo el daño tisular que ocurre a nivel de los cilios de las trompas de Falopio y su

consecuente obstrucción debido a la inflamación crónica causada por la infección crónica (Linhares & Witkin, 2010; Stephens, *et al.* 2011). La inflamación de esta zona y el daño mencionado también está relacionado con los embarazos ectópicos, que se han encontrado estrechamente asociados con la presencia de *Chlamydia trachomatis* en al menos la tercera parte de las pacientes que enfrentan esta alteración (Peipert, 2003).

En un estudio realizado en el año 2014, se encontró que existe una fuerte relación entre la disminución de la calidad espermática de pacientes coinfectados con *Chlamydia trachomatis* y el VPH, comparando un grupo de pacientes infectados únicamente con *Chlamydia trachomatis*, (con síntomas de prostatitis crónica), los pacientes coinfectados presentaban espermatozoides deficientes en la motilidad progresiva y la morfología normal (Cai *et al.* 2014). Estos resultados enfatizan la necesidad de conocer si esta asociación de gérmenes podrá también afectar la fertilidad y salud reproductiva femenina cuando se presenta dicha coinfección y de ser así, que procesos afecta.

1.5 EL DIAGNÓSTICO EN EL LABORATORIO DE LAS INFECCIONES GENITALES CAUSADAS POR EL VPH Y/O *Chlamydia trachomatis*

A saber, de todas las complicaciones que representan estas dos infecciones, el laboratorio juega un papel crucial en la detección oportuna de dichos patógenos, los métodos diagnósticos siempre deben ir en vías de mejorar parámetros como la sensibilidad y especificidad, y para aspectos prácticos, deben ser también económicos, rápidos y fiables, de tal manera que se pueda establecer un diagnóstico certero con el menor gasto de recursos posible.

Las guías actuales de la CDC recomiendan un monitoreo anual para la detección del VPH en las mujeres de 21 a 65 años de edad (CDC, 2014) y para *Chlamydia trachomatis*

aquellas sexualmente activas menores de 25 años de edad y en mujeres mayores a 25 años que presenten factores de riesgo, tales como nueva pareja sexual o múltiples parejas sexuales, también se indica en pacientes que presenten signos y síntomas de infección (Stauffer *et al.* 2012). El principal problema de estas dos infecciones es la dificultad para ser diagnosticadas clínicamente ya que aproximadamente el 70% de las mujeres no presentan síntomas ni signos al momento de la infección (Molano *et al.* 2005) y en el caso del VPH aproximadamente el 90% son infecciones transitorias (Moscicki, 2007), además estadísticamente, las mujeres tienen menores posibilidades de acceso a las pruebas y tratamiento que los hombres, por lo que estas tienen mayor morbilidad que los hombres (Ortayli *et al.* 2014).

1.5.1 El diagnóstico en el laboratorio de las infecciones genitales causadas por VPH y/o *Chlamydia trachomatis*: técnicas microscópicas.

Hasta la fecha, para el diagnóstico de la infección por VPH, la citología cervical tradicional con tinción de Papanicolaou ha sido considerada como el parámetro más satisfactorio en cuestión de tiempo y costo de estudio para el monitoreo del cáncer cérvico-uterino pero presenta severas deficiencias de sensibilidad (Cuzick, 2002) que podrían arrojar resultados falsos negativos por factores como la aleatoriedad de la distribución de las células, errores en la toma y preparación de las muestras por lo que el estudio se torna un tanto subjetivo y condicionado a la observación del analista (Cuschieri & Cubie, 2005). Actualmente, la citología convencional está siendo reemplazada por la citología en base líquida o LBC por sus siglas en inglés (liquid-base cytology), esta preparación es capaz de reducir los resultados falsos negativos al eliminar algunas interferencias con el uso de filtros especiales, sin embargo aún no logra tener una sensibilidad mayor a 80% (Mcgoogan, 2004),

en países desarrollados como Inglaterra y Escocia ya han adaptado la citología de base líquida como su estudio de monitoreo principal para el cáncer cérvico-uterino.

Por otro lado, para las infecciones por *Chlamydia trachomatis* la preparación de frotis teñidos con Giemsa es ampliamente utilizada como monitoreo, es una herramienta muy útil para la observación de los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos característicos de esta bacteria (Tabatabaei, *et al.* 2012) y es una técnica bastante aplicable a laboratorios que no cuenten con muchos recursos económicos en zonas de alta prevalencia de la infección.

Otra de las técnicas microscópicas más utilizadas para la detección de *Chlamydia trachomatis*, es la IFD, que consiste en la identificación visual del microorganismo mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra la proteína MOMP o la HSP60, dicho anticuerpo está conjugado a un fluorocromo para su detección, sin embargo, una limitante importante es la necesidad de un microscopio de fluorescencia (Osaka & Hefty, 2013).

1.5.2 El diagnóstico en el laboratorio de las infecciones genitales causadas por el VPH y/o *Chlamydia trachomatis*: técnicas moleculares

El procedimiento considerado como el estándar de oro para la detección de *Chlamydia trachomatis* así como para el VPH es la amplificación de ácidos nucleicos, en ambos casos existen ya ensayos comerciales aprobados disponibles para su venta, y son altamente recomendados por la CDC debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez comparada contra las técnicas de cultivo celular (Gaydos & Hardick, 2014).

Sin embargo, la implementación de estas técnicas y la infraestructura necesaria tiene un alto costo por lo que la mayoría de la población no puede acceder a estas pruebas, sobre todo los sectores de bajos recursos socioeconómicos que son los más afectados por estas infecciones, lo que conlleva a que estas enfermedades sigan sin ser detectadas oportunamente

para su erradicación (Owusu-Edusei Jr *et al.* 2013) por lo que en la mayoría de los países en vías de desarrollo suele haber altos índices de prevalencia de esta infección (Peeling, *et al.* 2006).

Generalmente, en este tipo de infecciones primero se indican las técnicas de monitoreo, es decir, las microscópicas, con la intención de buscar anormalidades en las células epiteliales o signos de inflamación tenues que sean sospechosos de la presencia de estos microorganismos, posteriormente y sólo en los casos dudosos, se realiza el análisis molecular para tener una confirmación del diagnóstico. Actualmente se ha visto que en conjunto, el estudio citológico y molecular son mucho más sensibles y significativos, que cada uno por separado (Mayrand, *et al.* 2007), posterior al diagnóstico, las técnicas citológicas son de gran importancia para el seguimiento de las lesiones.

1.6 LA CITOLOGÍA EN FRESCO DE ALTO CONTRASTE Y ALTA RESOLUCIÓN EN CAPA FINA (CIFAR-CF).

La citología en fresco de alto contraste y alta resolución en capa fina es una técnica implementada hace ya más de 10 años por nuestro grupo de trabajo como un estudio de bajo costo, fácil y rápido. Estudia principalmente los epitelios mucosos como las vías respiratorias superiores (Nasofaringe, faringe y laringo-faringe) o también en vías genitourinarias, tanto masculinas como femeninas (Uretra, Vagina, Cérvix) y analiza los diferentes tipos celulares, los hallazgos citomorfológicos y la presencia sugestiva de estructuras bacterianas tales como cuerpos de inclusión clamidiales y bacterias pleomórficas (Ramos Gonzalez *et al.* 2011). Esta técnica citológica ha demostrado tener buenos atributos para ser utilizada como un método de monitoreo adecuado para las infecciones genitales causadas por *Chlamydia trachomatis* y

Ureaplasma urealyticum, en estudios realizados tanto en modelos murinos (Alvarez Cuevas, 2012), así como también en trabajos de investigación realizados en pacientes masculinos infértiles (Ramos Gonzalez, 2011)

Esta técnica en fresco, es muy útil para evaluar aspectos inflamatorios tales como la presencia de células inflamatorias como leucocitos, macrófagos, así como también evaluar el estado epitelial del sujeto analizando la existencia de eritrocitos, detritus celulares y la citomorfología epitelial. Es posible evaluar también la flora vaginal e identificar infecciones bacterianas y fúngicas, además, también con esta citología se pueden observar algunas características del efecto citopático causado por el VPH como la vacuolización citoplasmática perinuclear y las anormalidades nucleares de agrandamiento, hipercromasia y la observación de cromatina granular fina (Krawczyk *et al.* 2008; Spinelli & Altamirano, 2003).

Todo lo antes descrito es posible debido a los procesos de concentración de la muestra que ayudan a mejorar la sensibilidad del análisis, además, el contrastado con colorantes supravitales no alteran la actividad celular ya que están disueltos en solución fisiológica. Estos colorantes son el Rojo Neutro, que posee propiedades de indicador ácido-base es capaz de dar un buen contraste nuclear para observar anormalidades de este organelo (Peters & Barbosa, 1971) y la Eosina Y que tiñe estructuras acidófilas como las proteínas citoplasmáticas (Fischer, *et al.* 2008), además que nos permite evaluar la vitalidad celular, ya que es permeable en las células muertas por su desarreglo membranal, no así en las células viables (Zhang, *et al.* 2015).

Además del contraste, una buena observación microscópica requiere la correcta distribución uniforme de los componentes celulares para que sean evaluados, esto se logra en la CIFAR-CF mediante la realización de un extendido en capa fina del material biológico

centrifugado a bajas revoluciones para no afectar la morfología celular. De dicho material se toma un pequeño volumen para que sea capaz de distribuirse en todo el volumen disponible de la preparación, así las células tendrán un espacio considerable para ser examinadas.

Las técnicas citológicas, son propensas a tener diversos factores de error inherentes a la técnica o atribuibles al personal que lleva a cabo la preparación de la muestra y la observación, las fuentes de error más comunes en este tipo de estudios son la mala calidad en la toma de muestra o que sea insuficiente para el análisis (Singh *et al.* 2015), así como la utilización de colorantes oxidados o precipitados. Por otra parte, el personal analista debe estar completamente capacitado para observar y distinguir todos los componentes celulares y acelulares que pueda contener la muestra, por lo que se necesita de un programa de entrenamiento y actualización constantes y contar con conocimientos amplios en morfología o citopatología, es preferible también que una misma persona sea la que observe todas las preparaciones, para reducir la variabilidad de los resultados y el grado de error.

Por último, es importante que esta citología no sea catalogada como un método de diagnóstico confirmatorio ni como una alternativa de la citología con tinción de Papanicolaou o de Giemsa, sino más bien como un apoyo para la evaluación de la salud y el estado citopatológico del endo-ectocérvix de la paciente y en base a los resultados observados tomar decisiones sobre las posteriores acciones para encontrar el diagnóstico y/o tratamiento.

Este proyecto va encaminado a demostrar la utilidad de la CIFAR – CF como herramienta de apoyo en el diagnóstico presuntivo de la infección genital por el VPH y/o por *Chlamydia trachomatis* en mujeres infértiles. Por lo que se llevará a cabo una correlación de los hallazgos observados en las citologías con las pruebas moleculares catalogados como los métodos de referencia diagnóstica para dichos microorganismos, para valorar los parámetros diagnósticos de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de la CIFAR-CF para estas

infecciones, así como también encontrar rasgos citopatológicos que hagan sospechar de dichas infecciones.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO

La infertilidad está definida actualmente como un problema de salud pública y se estima que aproximadamente una de cada seis parejas mexicanas en edad reproductiva tienen problemas para concebir un hijo (Secretaría de Salud, 2015). Entre las causas relacionadas con el desarrollo de infertilidad, se encuentra especialmente el factor infeccioso, que afecta tanto a las mujeres como a los hombres con el mismo grado de susceptibilidad, pero con diferencias en las manifestaciones clínicas.

Las infecciones de transmisión sexual a nivel mundial se encuentran entre los primeros cinco motivos de consulta en el adulto, y son muy frecuentes en personas en edad reproductiva, sobre todo en los países subdesarrollados donde los programas de prevención, detección y tratamiento no son tan eficaces para controlar estos padecimientos a nivel poblacional. Entre los factores de riesgo más importantes para adquirir una infección de transmisión sexual se encuentran la baja situación socioeconómica, así como la poca o nula información sobre estas enfermedades, el tabaquismo, alcoholismo y múltiples parejas sexuales, así como un inicio en la vida sexual prematuro.

El VPH y *Chlamydia trachomatis* ocupan el primero y segundo lugar de los agentes causales de infecciones de transmisión sexual mundialmente. (OMS, 2015). Generalmente, las infecciones causadas por estos microorganismos pasan desapercibidas por los clínicos debido a la poca respuesta inmunológica generada por el organismo, lo cual dificulta en gran medida llegar a un diagnóstico clínico oportuno por lo que los métodos de diagnóstico en el laboratorio son muy útiles en este tipo de infecciones.

Actualmente, existe un repertorio muy extenso de técnicas para el estudio de estos microorganismos, entre las que figuran como las más frecuentes las técnicas citológicas y las técnicas moleculares, las primeras son muy útiles para el monitoreo poblacional de la infección y ayudan a conocer el estado de salud del individuo, y las últimas, al ser altamente sensibles y específicas deben ser utilizadas solamente como la confirmación de las anomalías observadas en las citologías. Debe de mencionarse que la finalidad de las dos técnicas, su uso y aplicaciones clínicas son muy distintas, no obstante, empleadas en conjunto constituyen la mejor opción para llegar a un diagnóstico certero y la elección de un tratamiento efectivo.

La implementación de nuevos métodos de diagnóstico que sean seguros, objetivos, económicos y rápidos es importante para este tipo de infecciones comúnmente asintomáticas, en este sentido nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una técnica citológica en fresco para la observación de muestras de exudados de epitelios mucosos, como las cavidades del aparato genital masculino y femenino.

En la última década, nuestro grupo de trabajo, con sede en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, ha trabajado para demostrar la validez de dicha citología para la detección preliminar de la presencia de *Chlamydia trachomatis*. Se han llevado a cabo diversos estudios comparativos para *Chlamydia trachomatis*, observando las muestras con CIFAR - CF y después con la técnica de IFD contra esta bacteria, obteniéndose buenos valores de sensibilidad y especificidad. (Ramos Gonzalez *et al.* 2011). Además, la CIFAR – CF ha sido utilizada en el desarrollo de diversos trabajos de investigación, probando su versatilidad para observar cambios

citomorfológicos, así como parámetros de inflamación y presencia de microorganismos diversos, como bacterias o levaduras. (Alvarez Cuevas, 2012; Ramos González, 2011).

Hasta el momento, no se ha realizado un estudio que compare el valor diagnóstico que la CIFAR – CF podría presentar para detectar preliminarmente la infección por el VPH, mediante la observación del efecto citopático causado por este, así como tampoco se ha llevado a cabo la evaluación sistemática de la capacidad para identificar *Chlamydia trachomatis* comparando contra el estándar de oro, es decir, los métodos moleculares. Por estas razones este proyecto tiene su objetivo en demostrar el verdadero poder diagnóstico que posee la CIFAR - CF para la detección de estas dos infecciones en una población de mujeres infértiles.

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la infertilidad en la población mexicana se considera una problemática debido a diversos factores, entre ellos los socioeconómicos y ambientales, hábitos y comportamientos sexuales de riesgo y la poca información sobre la prevención de las infecciones de transmisión sexual, las cuales tienen una alta repercusión en esta condición, su gran gasto público para su tratamiento y prevención, y que si bien, últimamente han bajado las tasas de incidencia y prevalencia en comparación con décadas anteriores, no se ha logrado tener un control epidemiológico.

Las ITS causadas por el VPH y por *Chlamydia trachomatis* son las dos más comunes en nuestra región, y además se ha demostrado que tienen un papel importante en el desarrollo de alteraciones reproductivas cuando el diagnóstico de estos microorganismos no es oportuno y la infección no se atiende.

La implementación de nuevos métodos de bajo costo, rápidos y eficaces que ayuden a la detección y el diagnóstico de estos microorganismos proveerá un avance importante en la profilaxis de estas pacientes y mejorar su calidad de vida. Este trabajo va encaminado a estudiar la eficacia que tiene un novedoso método citológico en el diagnóstico presuntivo de estos dos microorganismos.

HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

La CIFAR-CF tiene mayor sensibilidad y especificidad que la citología teñida con Papanicolaou o Giemsa para detectar presuntivamente la infección genitourinaria por el VPH y/o *Chlamydia trachomatis* de mujeres infértiles.

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la CIFAR-CF presenta mayor Sensibilidad y Especificidad que la citología con tinción de Papanicolaou o Giemsa para detectar presuntivamente la infección genitourinaria por el VPH y/o *Chlamydia trachomatis* de mujeres infértiles.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los hallazgos morfológicos y citopatológicos de los exudados cérvico-vaginales (ECV) de pacientes infértiles empleando las técnicas citológicas de CIFAR-CF, Giemsa y Papanicolaou.
2. Caracterizar el valor de las técnicas citológicas como pruebas diagnósticas realizando el diagnóstico confirmatorio de *Chlamydia trachomatis* mediante IFD y PCR, así como del VPH por PCR en las muestras de ECV.
3. La CIFAR-CF tiene mayor sensibilidad y especificidad que la citología teñida con Papanicolaou o Giemsa para detectar presuntivamente la infección genitourinaria por el VPH y/o *Chlamydia trachomatis* de mujeres infértiles.

MATERIAL Y MÉTODOS

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL

Finalmente, Para la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou, se utilizó un “citobrush” y la muestra fue tomada después del exudado cérvico-vaginal específicamente de la zona endo-ectocervical, para evitar al máximo interferencias de moco o sangre. Con la muestra obtenida se realizaron los frotis que fueron fijados inmediatamente con alcohol al 95% durante 10 minutos.

6.1.1 Equipos utilizados

- ✓ Refrigerador Isotemp, Fisher Scientific
- ✓ Vortex agitador, ThermoScientific
- ✓ Pipetas automáticas de 10, 100 y 1000 microlitros, Biopette marca Labnet
- ✓ Puntillas de 10 microlitros, Costar
- ✓ Puntillas de 100, 1000 microlitros, GlobeScientific
- ✓ Balanza analítica, Marca AND
- ✓ Termomezclador, Vortemp 56, Labnet
- ✓ Microcentrifuga prism R, Labnet
- ✓ Cámara electroforética OwlEasycaster B2, ThermoScientific
- ✓ Transiluminador Benchtop UV, Marca UVP
- ✓ Termociclador Surecyclor 8800, AgilentTechnologies
- ✓ Microcentrifuga para tubos de PCR, Sprout
- ✓ Cámara para PCR, PlasLabs
- ✓ Autoclave SK100C, Marca Yamato
- ✓ Microscopio de Campo Claro con aditamento para Fluorescencia, Axiostar A1, Carl Zeiss
- ✓ Dispensadores, Dispensette, Marca BRAND.
- ✓ Incubadora, Boekel

6.1.2 Reactivos y Materiales de Laboratorio utilizados

- ✓ Hisopos de algodón, Protec[®]
- ✓ Cepillo citobrush[®]
- ✓ Criotubos de 2 ml, Corning[®]
- ✓ Microtubos de 1.5 ml, Biopur de Eppendorf[®]

- ✓ Buffer de fosfatos salino estéril, Sigma-Aldrich®
- ✓ Solución salina estéril, PISA®
- ✓ Frascos para esterilización, Pyrex®
- ✓ Puntillas de 10 microlitros, Costar®
- ✓ Puntillas de 100 y 1000 microlitros, GlobeScientific®
- ✓ Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 1000 mililitros, Pyrex®
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 250 mL, Pyrex®
- ✓ Portaobjetos, Corning®
- ✓ Cubreobjetos No.2, 22 x 22, Corning®
- ✓ Cubreobjetos No. 2, 22 x 44, Corning®
- ✓ Contenedores RPBI (Bolsas y frascos rígidos)
- ✓ Jarras Koplín para 5 laminillas de 50 mL
- ✓ Eosina Y, Certistain®
- ✓ Rojo Neutro, Sigma-Aldrich®
- ✓ Solución Alcohólica de Giemsa al 0.4%, CTR Scientific®
- ✓ Hematoxilina de Harris, HYCEL®
- ✓ OG-6, CTR Scientific®
- ✓ EA-50, CTR Scientific®
- ✓ Alcohol etílico absoluto, BiobasicCanadaInc®
- ✓ Xilol, CTR Scientific®
- ✓ Entellán, Merck®
- ✓ Lápiz con punta diamante
- ✓ Ácido clorhídrico concentrado, CTR Scientific®
- ✓ Hidróxido de amonio concentrado, J.T. Baker®
- ✓ Kit de detección para *Chlamydia trachomatis* por inmunofluorescencia (*Chlamydia* direct IF identification kit, Biomériux®, sa, Lyon, France)
- ✓ Acetona, CTR Scientific®
- ✓ Kit de extracción y purificación de ADN (Nucleospin®Blood, Machery-NagelGmbH& Co., Germany)
- ✓ Cebadores para PCR, Integrated DNA Technologies® (GH20, GH21, MY09, MY11, KL1, KL2)
- ✓ Bromuro de etidio, Sigma-Aldrich®
- ✓ Agarosa, Oxoid®
- ✓ Tris-HCl, Sigma-Aldrich®
- ✓ Ácido Bórico, Jalmek®
- ✓ Ácido etilendiaminotetracético sal disódica, Productos Químicos Monterrey®
- ✓ Agua Grado Molecular (Nuclease Free-Water, Integrated DNA Technologies®)
- ✓ GoTaq® Green Master Mix, Promega®
- ✓ Marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder), Promega®

6.2. MUESTRAS DE LAS PACIENTES INFÉRTILES

6.2.1 Naturaleza y procedencia de especímenes, criterios de muestreo.

Para esta investigación se recopilieron muestras de exudado cérvico-vaginal de pacientes que acuden a una clínica de infertilidad de atención privada llamada “Laboratorio Sertoli” en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México, con la que existe previo convenio y relación laboral, la forma de reclutamiento de los pacientes fue por medio de invitación verbal en el momento de su consulta.

Las pacientes que participaron en este estudio cumplieron con los siguientes requisitos:

✓ Criterios de inclusión:

- Mayores de 18 años
- Firmen el consentimiento informado por escrito
- Pacientes diagnosticadas con infertilidad primaria o secundaria

✓ Criterios de exclusión

- No firmar el consentimiento informado por escrito
- Mujeres con incapacidad mental
- Pacientes sin diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria
- Mujeres que presenten alergias a medicamentos utilizados para su tratamiento

6.2.2 Proceso de la toma de muestra de exudado cérvico-vaginal y del cepillado cervical.

Durante el proceso de la consulta, a las pacientes que voluntariamente participaron en el estudio se les entregó y explicó el consentimiento informado para su autorización, y posteriormente se les realizó una entrevista clínica y una revisión médica ginecológica

exhaustiva. En esta evaluación se tomaron en cuenta antecedentes de infecciones genitales, signos y síntomas característicos de alteraciones reproductivas, historial natal y otros datos para fines clínicos. Una vez concluidas la entrevista y la revisión clínica, se procedió a la toma de muestras, las cuales fueron recolectadas por personal médico capacitado para mantener la calidad de las mismas. Como requisito indispensable, todas las pacientes debían tener un periodo de abstinencia sexual de 24 horas y no haberse aplicado ningún tipo de óvulo o pomada vaginal en las 72 horas previas a la toma de muestra.

Para el exudado cérvico vaginal fue necesario colocar a la paciente en posición ginecológica y exponer el cuello usando un espéculo estéril. Posteriormente se retiró el exceso de secreción o de mucus, cuando era necesario, sin tocar la superficie del cuello con un hisopo de algodón o dacrón. La toma de muestra fue de las zonas del endocérvix y del ectocérvix abarcando también la pared vaginal.

Al momento de la toma se evitó el sangrado, sin embargo, si el cérvix sangraba en el procedimiento no se afectó el estudio. El primer hisopo fue destinado para realizar la CIFAR - CF y se introdujo el hisopo en el fondo del tubo de transporte y se guardó a 4°C. El segundo hisopo se empleó para realizar la citología con tinción de Giemsa, empleando la técnica de frotis directo y fijación inmediata con alcohol al 95% durante 10 minutos.

6.3 MÉTODOS

6.3.1 Métodos de estudio por técnicas citológicas

6.3.1.1 Citología en fresco de alto contraste y alta resolución en capa fina (CIFAR-CF)

A las muestras de exudado cérvico-vaginal tomadas en la consulta y entrevista ginecológicas, que fueron guardadas a 4°C temporalmente, se les realizó el siguiente procedimiento para llevar a cabo la técnica de CIFAR.

- ✓ Como primer paso se realizó la resuspensión del contenido celular en buffer de fosfatos (pH: 7.4) estéril, para esto, en el caso de las muestras recolectadas con hisopos, estos fueron sumergidas en 1 mL de dicho buffer en microtubos de 1.5 mL.
- ✓ Una vez el hisopo en el buffer, se rotó con intensidad media durante un minuto con el fin de liberar el material biológico en el medio.
- ✓ Después, se cortó el bastón del hisopo de tal manera que este quede dentro del tubo cerrado.
- ✓ Con el tubo cerrado, se llevó a agitación por vortex a velocidad baja durante 1 minuto con el fin de resuspender el material en el buffer y de evitar daños en las estructuras celulares.
- ✓ Una vez realizada la resuspensión se retiró el hisopo del tubo, exprimiéndolo contra las paredes de este, para recuperar la máxima cantidad de muestra posible.
- ✓ El tubo con el resuspendido celular se llevó a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.

- ✓ Posterior a la centrifugación, el paquete celular formado en el fondo del tubo se separó del sobrenadante por decantación y se resuspendió en 200 μ L de buffer de fosfatos estéril, generando el concentrado celular que se usó en la técnica citológica.
- ✓ Una vez obtenido el concentrado celular, se rotularon 3 portaobjetos con el número de la muestra correspondiente y con la identificación de “Eosina amarillenta”, “Rojo Neutro” y “Fresco”.
- ✓ A cada uno de los portaobjetos se le agregaron 10 μ L del concentrado celular.
- ✓ Al portaobjetos rotulado como “Eosina amarillenta” se le agregó 10 μ L de este colorante, de manera similar con el rotulado como “Rojo neutro” y al rotulado como “Fresco” 10 μ L de buffer de fosfatos salino.
- ✓ Se mezclaron los colorantes con el concentrado celular correspondiente y se le coloca un cubreobjetos de 22 x 22 milímetros.
- ✓ Posteriormente se llevó a cabo la observación microscópica en campo claro a 1000 aumentos y los hallazgos celulares y microbiológicos fueron reportados en un diario para la captura de los resultados para su interpretación.
- ✓ En el reporte citológico, todos los parámetros a evaluar, por ejemplo: leucocitos, macrófagos, detritus celulares, cocos, bacilos o levaduras se dividieron en rangos que van del 0 al 4 dependiendo de la abundancia de estos en la muestra, de manera que se realizó un análisis semi-cuantitativo, siendo el 0 “nulo” (0/campo), 1 “Escaso” (1-2/campo), 2 “Moderado” (3-5/campo), 3 Abundante (6-10/campo) y 4 “Muy abundante” (>10/campo). Este sistema de evaluación se adaptó por igual en todas las técnicas citológicas empleadas en este estudio.

6.3.1.2 Citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou

Durante la toma de las muestras, el segundo hisopo de exudado cérvico-vaginal fue destinado para generar un frotis en una laminilla, la cual fue fijada inmediatamente con alcohol etílico al 70% durante 10 minutos, dejando secar a temperatura ambiente hasta evaporación total. Posteriormente se realizó la tinción de Papanicolaou modificada por nuestro grupo de trabajo, esquematizada en la Tabla II.

- ✓ El montaje de las preparaciones ya teñidas fue llevado a cabo con entellán para la colocación de un cubreobjetos de 44x22.
- ✓ Para el diagnóstico citológico de esta técnica se utilizó la evaluación en base a la clasificación de Papanicolaou debido a los fines estrictamente citológicos de los análisis realizados (Papanicolaou, 1954), que va del I al IV dependiendo del grado de malignidad que muestren las células presentes en la preparación donde:
 - Clase I: No hay evidencia de malignidad, sin células atípicas: Normal
 - Clase II: Cambios celulares atípicos atribuibles a inflamación inespecífica.
Sin evidencia de malignidad
 - Clase III: Células atípicas sospechosas para malignidad. Efecto citopático del VPH.
 - Clase IV: Bastante evidencia de neoplasia maligna, células con cambios malignos.
 - Clase V: Células cancerosas. Carcinoma *in situ*, evidencia concluyente de malignidad.

- ✓ Las observaciones para el análisis se realizaron a 100 aumentos para la inspección general de la muestra y a 400 aumentos para ver los detalles celulares.
- ✓ Por último, se procedió a la observación en microscopia de campo claro para reportar los hallazgos citológicos en la bitácora correspondiente.

Solución empleada	Tiempo o inmersiones efectuadas
Alcohol al 96%	2 minutos
Agua destilada	5 inmersiones
Hematoxilina de Harris	2 minutos
Agua de la llave "corriente"	A chorro lento, hasta que deje de colorearse
Agua acidificada	1 inmersión y enjuagar en agua destilada
Agua amoniacal	1 inmersión y enjuagar en agua destilada
Alcohol al 96%	5 inmersiones
Colorante OG-6	2 minutos
Alcohol al 96%	5 inmersiones
Colorante EA-50	2 minutos
Alcohol al 96%	5 inmersiones
Alcohol absoluto 100%	5 inmersiones
Xilol	5 inmersiones
Xilol	5 inmersiones

Tabla VI – I. Protocolo establecido para la coloración con la técnica de Papanicolaou en las citologías cervicales convencionales.

6.3.1.3 Citología cervical convencional con tinción de Giemsa

Durante la toma de las muestras, el tercer hisopo de exudado cérvico-vaginal fue destinado para generar un frotis en una laminilla, la cual fue fijada inmediatamente con

alcohol etílico al 70% durante 10 minutos, dejando secar a temperatura ambiente hasta evaporación total

- ✓ Posteriormente se realizó la tinción, sumergiendo la preparación en el colorante de Giemsa (solución alcohólica al 0.4%) durante un lapso de 40 minutos
- ✓ Por último se realizó el montaje utilizando entellán y un cubreobjetos de 44 x 22 mm. Los datos de las observaciones se registraron en el diario de captura de resultados correspondiente.
- ✓ Terminado ese tiempo las laminillas se lavaron en agua destilada con un proceso de 10 inmersiones, secando a temperatura ambiente.
- ✓ Para el reporte citológico, se utilizó el sistema semi-cuantitativo mencionado en las técnicas anteriores

6.3.2 Métodos de estudio por técnicas moleculares

6.3.2.1 Detección de *Chlamydia trachomatis* mediante IFD.

A partir del concentrado celular remanente de la CIFAR– CF se realizó la prueba de IFD para determinar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en tales muestras. Se empleó el kit comercial de detección mediante IFD usando anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* (*Chlamydia* direct IF identification kit; bioMérieux, sa. Lyon, France).

El procedimiento que se usó fue el siguiente:

- ✓ Del concentrado celular remanente de las pruebas citológicas se tomaron 20 μL y se colocaron sobre un portaobjetos en un área aproximada de 1 cm^2 y se dejaron secar a temperatura ambiente.

- ✓ Posteriormente para la fijación se introdujeron las laminillas preparadas en una jarra Koplin con acetona durante 10 minutos, una vez cumplido este tiempo, las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente.
- ✓ Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario anti-*Chlamydia trachomatis* conjugado con isotiocianato de fluoresceína durante 30 minutos a temperatura controlada de 25°C y bajo condiciones de humedad.
- ✓ Posteriormente se retiró el exceso de reactivo con buffer de fosfatos y se colocó el cubreobjetos sellándose con una gota de glicerol incluido en el kit.
- ✓ Las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemania), empleando objetivo de 100 aumentos y ocular de 10 aumentos con cifra de campo 18.
- ✓ Para cada lote de reactivo se verificó la calidad del reactivo procesando un portaobjetos de control negativo y uno de control positivo (*Chlamydia* vDirect IF(C+/C-), BioMerieux, Francia).
- ✓ Se consideró positivo el resultado de esta prueba cuando se observen más de 10 cuerpos elementales fluorescentes en el total de la muestra biológica analizada. Las observaciones fueron reportadas en la bitácora correspondiente.

6.3.2.2 Extracción de ADN de los concentrados celulares de las muestras de ECV mediante columnas de sílica.

Para la extracción de ADN, se utilizaron los concentrados celulares de los ECV que también fueron usados para los estudios de CIFAR e IFD y se emplearon las columnas de extracción Nucleospin® Blood (Machery – Nagel GmbH & Co., Germany) bajo las

instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones, el procedimiento realizado se menciona a continuación:

- ✓ Se tomaron 100 μ L del concentrado celular para transferirlo a un nuevo microtubo estéril en donde se llevó a cabo la reacción de lisis celular.
- ✓ Al microtubo de lisis, se agregaron después 100 μ L de buffer de fosfatos salino (pH: 7.4) y después 200 μ L del reactivo “B3” y 25 μ L de proteinasa K (incluidos en el kit) para posteriormente agitar vigorosamente en vortex durante 30 segundos.
- ✓ Una vez mezclados bien todos los componentes de la lisis, se procedió a incubar las muestras a 70°C durante un lapso de 25 minutos.
- ✓ Posteriormente, al lisado celular se le agregaron 210 μ L de etanol absoluto y se agito vigorosamente el tubo con la ayuda de un vortex durante 15 segundos.
- ✓ Después de mezclar, la muestra fue cargada en el dispositivo que contiene la columna junto a un tubo de recolección acoplado y se centrifugo a 10200 rpm, el sobrenadante fue desechado junto con el tubo y la columna se transfiere a otro tubo de recolección.
- ✓ Al dispositivo con la columna se le agregaron 500 μ L de buffer “BW” (incluido en el kit), es importante que el nuevo tubo de recolección se encuentre acoplado, una vez hecho esto, se procede a la centrifugación a 10200 rpm y el sobrenadante se desecha junto con el tubo de recolección.
- ✓ El dispositivo con la columna se cambió nuevamente a un tubo de recolección limpio y se le agregaron 600 μ L de Buffer “B5” (incluido en el kit) para después ser centrifugado a 10200 rpm, el sobrenadante se desecha y se volvió a acoplar el mismo tubo de recolección en el dispositivo con la columna, para una nueva centrifugación a 10200 rpm, desechando el tubo de recolección al final.

- ✓ Posteriormente, se cargaron en el dispositivo 50 μ L de “BE” (previamente calentado a 70°C para su uso) cuidando que el buffer agregado sea depositado directamente la membrana de sílica y se incubó a temperatura ambiente por un lapso de 1 minuto.
- ✓ Por último, pasado este tiempo, se acopló el dispositivo con la columna a un nuevo microtubo para la recolección del ADN purificado y concentrado de la membrana sílica, que se obtuvo con una última centrifugación a 10200 rpm.

6.3.2.3 Detección molecular y genotipificación del VPH mediante amplificación de ácidos nucleicos.

Una vez obtenido el ADN purificado, se procedió a las pruebas moleculares para la detección de los microorganismos. Para el VPH se eligió amplificar un segmento de la región genómica viral de 450pb que codifica para un fragmento de la proteína L1 mediante PCR.

Los cebadores degenerados MY09/MY11 fueron empleados en esta reacción, el protocolo de amplificación, las secuencias de los cebadores y los componentes de la mezcla en la reacción, se muestran en la tabla III.

El producto de esta reacción fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando bromuro de etidio para teñir. El control positivo usado fue ADN proveniente de muestras analizadas previamente por PCR por un laboratorio externo, como control negativo se utilizó agua grado molecular. El gen de la proteína β – Globina se utilizó como control interno de la PCR usando los cebadores GH20 y GH21 que amplifican un fragmento de 402 pb y se muestran en la tabla IV. Los resultados obtenidos de estos análisis se capturaron en una bitácora destinada para dicho fin.

6.3.2.4 Detección molecular de *Chlamydia trachomatis* mediante amplificación de ácidos nucleicos.

En este análisis se llevó a cabo la amplificación de una secuencia genómica conservada de 241 pares de bases *Chlamydia trachomatis*. El producto amplificado pertenece a un marco abierto de lectura 7.5 del plásmido críptico, y se flanquea con el par de cebadores KL1 y KL2. Las secuencias de los cebadores, el protocolo de amplificación y la mezcla de los componentes de la reacción se encuentran en la tabla V.

Para la validación de este análisis, el control positivo fue ADN de muestras reportadas positivas por PCR por un laboratorio externo, como control negativo se usó agua grado molecular, además, El gen de la proteína β – Globina fue utilizado como control interno de la PCR para esto se utilizarán los cebadores GH20 y GH21 con la misma metodología utilizada como en los análisis de VPH. El análisis de los productos se realizó con una electroforesis en gel de agarosa, en las mismas condiciones ya descritas anteriormente en el estudio de VPH.

Cebador	Secuencia
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC
GH21	GGA AAA TAG ACC AAT AGG CAG
Protocolo de amplificación – 32 Ciclos	
Paso de la reacción	Temperatura y Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C – 5 Minutos
32 Ciclos	
Desnaturalización del ciclo	94°C – 1 Minuto
Alineamiento de los cebadores	53°C – 1 Minuto
Elongación de la cadena	70°C – 1 Minuto
Paso final	
Elongación final de la cadena	70°C – 10 minutos
Mezcla de reacción de PCR	
Reactivo	Cantidad
2x Taq Master mix	12.5 µL
Cebador GH20 20 µM	1 µL
Cebador GH21 20 µM	1 µL
ADN Muestra	2 µL
Agua grado molecular	8.5 µL

Tabla VI - II. Especificaciones de la PCR empleada para la detección del gen de la proteína β – Globina en el ADN extraído a partir de los exudados cérvico-vaginales.

Cebador	Secuencia
MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG
Protocolo de amplificación – 32 Ciclos	
Paso de la reacción	Temperatura y Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C – 5 Minutos
32 Ciclos	
Desnaturalización del ciclo	94°C – 1 Minuto
Alineamiento de los cebadores	55°C – 1 Minuto
Elongación de la cadena	72°C – 1 Minuto
Paso final	
Elongación final de la cadena	72°C – 5 minutos
Mezcla de reacción de PCR	
Reactivo	Cantidad
2x Taq Master mix	12.5 µL
Cebador MY09 20 µM	1 µL
Cebador MY11 20 µM	1 µL
ADN Muestra	2 µL
Agua grado molecular	8.5 µL

Tabla VI - III. Especificaciones de la PCR empleada para la detección del VPH en el ADN extraído a partir de los exudados cérvico-vaginales.

Cebador	Secuencia
KL1	TCC GGA GCG AGT TAC GAA GA
KL2	AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT
Protocolo de amplificación – 32 Ciclos	
Paso de la reacción	Temperatura y Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C – 5 Minutos
32 Ciclos	
Desnaturalización del ciclo	95°C – 1 Minuto
Alineamiento de los cebadores	57.6°C – 1 Minuto
Elongación de la cadena	72°C – 1 Minuto
Paso final	
Elongación final de la cadena	72°C – 7 minutos
Mezcla de reacción de PCR	
Reactivo	Cantidad
2x Taq Master mix	12.5 µL
Cebador KL1 20 µM	1 µL
Cebador KL2 20 µM	1 µL
ADN Muestra	2 µL
Agua grado molecular	8.5 µL

Tabla VI - IV. Especificaciones de la PCR empleada para la detección de *Chlamydia trachomatis* en el ADN extraído a partir de los exudados cervico-vaginales.

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.4.1 Estadística Descriptiva

Se resumieron las variables cualitativas, mediante el cálculo de las frecuencias absolutas y relativas en % y los Intervalos de Confianza (IC) al 95%. Las variables cuantitativas se resumieron mediante el cálculo de medidas de tendencia central media y/o mediana y, medidas de dispersión desviación estándar y/o recorrido de la variable. Para el cálculo del Intervalo de Confianza se obtuvo el error típico de la media.

6.4.2 Estadística Inferencial

Para estudiar los posibles grupos definidos mediante las modalidades de variables cualitativas en la muestra, se aplicó la prueba Chi Cuadrada (corrección de Yate). Para el caso particular de tablas de contingencia de 2X2 se aplicó la prueba exacta de Fisher.

Con la finalidad de estudiar posibles diferencias entre grupos de ciertas variables cuantitativas, en primer lugar, se aplicó una prueba para estudiar si la variable se ajusta a la distribución normal o no (Kolmogorov-Smirnov). En aquellos donde la variable presentó distribución normal, para evaluar las posibles diferencias inter-grupos se utilizó la prueba t de Student o bien el Análisis de Varianzas de uno o más factores. Para solucionar el problema de las comparaciones múltiples se aplicó la corrección de Bonferroni.

Cuando las variables no presentaban distribución normal se usaron las pruebas de hipótesis no paramétricas (U Mann-Wihtney, Kruskal-Wallis), para las comparaciones múltiples se ajustó el valor de p por el método de Bonferroni.

Los cálculos se realizaron con el programa SPSS versión 17. Para todos los análisis se aplicaron los criterios de $\alpha \leq 0.05$, $1-\beta = 80\%$ y pruebas de dos colas.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 EVALUACIÓN DE LOS EXUDADOS CÉRVICO-VAGINALES DE LAS PACIENTES INFÉRTILES MEDIANTE LAS TÉCNICAS CITOLÓGICAS DE CIFAR-CF, GIEMSA Y PAPANICOLAOU.

El desarrollo de la parte experimental del proyecto comenzó con el análisis de las muestras de ECV de las pacientes, esto con la finalidad de detallar los hallazgos morfológicos y citopatológicos de dichos especímenes para establecer las bases del estado epitelial y microbiológico del tracto genitourinario de las pacientes. Primeramente, se recopilaron los datos demográficos y de antecedentes reproductivos de las pacientes con el objetivo de caracterizar la población del estudio. Después de esto, se llevaron a cabo los estudios citológicos con la técnica CIFAR - CF, así como con las de referencia para los diagnósticos presuntivos de los microorganismos en cuestión. La metodología de dichas técnicas se encuentra detallada en la sección de material y métodos de este documento.

Descripción general y de antecedentes reproductivos de la población estudiada.

En este trabajo de investigación se estudiaron 122 muestras de exudado cérvico – vaginal, pertenecientes a 60 pacientes que acudieron a la consulta para el tratamiento de la infertilidad.

La edad es un factor crucial en la capacidad reproductiva de la mujer, por tal motivo se evaluó la edad de las pacientes al momento del estudio, así como también el inicio de la vida sexual activa y la edad a la que tuvieron su menarca. La edad promedio de las pacientes al momento de iniciado el estudio fue de $35.96 \pm$ años, mientras que la edad del inicio de la vida sexual activa fue de $23.46 \pm$ años y la edad de la menarca fue de $12.61 \pm$ años. La

población presentó una distribución normal en los 3 parámetros antes mencionados comprobados por la prueba de normalidad de Kolmogorov – Smirnov (K – S) (Distribución normal = $P > 0.05$). En la **Tabla VII – I** se detallan los datos demográficos de las pacientes atendidas así como el resultado en las pruebas de normalidad.

Datos demográficos del grupo de mujeres con infertilidad estudiado					
	Media	Desviación estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo	(Kolmogorov – Smirnov)
Edad (años)	35.96	5.52	23	47	$P = 0.560$
Menarca (años)	12.61	1.43	8	15	$P = 0.087$
Inicio de Vida Sexual Activa (años)	23.46	5.21	16	41	$P = 0.376$

Tabla VII – I. Datos demográficos de las pacientes involucradas en el estudio.

Los datos concernientes al historial de infertilidad se encuentran detallados en la **Tabla VII – II** donde se muestra que la gran mayoría de las pacientes no tiene ningún hijo, cerca de la mitad han sido incapaces de concebir un embarazo, mientras que casi la tercera parte de estas pacientes experimenta abortos recurrentes. Además, casi la mitad de las pacientes mencionaron haberse sometidos a procedimientos de técnicas de reproducción asistida (TRA), sin embargo, solo en 1 caso se reportó éxito que resultó en un recién nacido vivo, por último, más de la mitad de las pacientes refirió haber utilizado estimulación ovárica hormonal (EOH) para regularizar sus ciclos menstruales y tratar de lograr un embarazo.

Datos históricos relacionados con infertilidad		
	Si N (%)	No N (%)
Hijos nacidos vivos	7 (11.7%)	53 (88.3%)
Embarazos previos	23 (38.3%)	37 (61.7%)
Abortos previos	18 (30%)	42 (70%)
TRA	26 (43.3%)	34 (56.7%)
TRA exitosa	1 (3.8%)	25 (96.2%)
EOH	35 (58.3%)	25 (41.7%)

Tabla VII – II. Datos históricos relacionados con infertilidad en el grupo de pacientes estudiado. N = Número de pacientes, % = Porcentaje de Pacientes

Resultados de los hallazgos citológicos, citopatológicos y microbiológicos en los exudados cérvico – vaginales con la CIFAR – CF.

Las 122 muestras recolectadas fueron analizadas por CIFAR – CF con la intención de encontrar signos citomorfológicos de infección tales como leucocitos, macrófagos, detritus celulares, cristales y eritrocitos, por otra parte también se investigó la presencia de estructuras microbiológicas como la cantidad de bacterias cocoides, bacilares y levaduras para evaluar la existencia de vaginosis bacteriana o micosis genital respectivamente.

En la primera sección del reporte citológico se indica de manera esencial la presencia y cantidad observada de elementos celulares relacionados con inflamación tales como leucocitos, macrófagos y eritrocitos, los cuales pueden ser diferenciados entre sí por su morfología además también se analizó la presencia de eritrocitos en dichas muestras.

En las 122 muestras analizadas, las células inflamatorias presentes con mayor frecuencia fueron los leucocitos presentándose en una cantidad de abundante a muy abundante en un 12.3% de los casos y encontrándose ausentes en aproximadamente una cuarta parte de estos, mientras que los macrófagos se encontraron en una cantidad moderada en el 4.9% de las muestras y los eritrocitos se encontraron presentes de manera anormal, es decir, de moderada a abundante en aproximadamente el 5% de los casos.

Por otra parte, algunas estructuras acelulares pueden encontrarse asociadas con la inflamación o infección, como lo son los detritus celulares o los cristales de sales orgánicas hallados en estas zonas anatómicas.

En este aspecto, las muestras estudiadas mostraron tener una presencia muy frecuente de detritus celulares, que se encontraba en cantidades abundantes en el 4.9% de los casos, mientras que de manera contraria, los cristales se observaron en un número muy bajo de muestras y de manera escasa. En la **Tabla VII – III** se muestran los detalles de los resultados en las observaciones de estos parámetros realizadas en las muestras de ECV.

Para evidenciar la capacidad resolutive que posee la CIFAR – CF y su uso para distinguir morfológicamente los elementos celulares y acelulares asociados a inflamación, se ilustran una serie de microfotografías donde se indican los hallazgos observados. En la **Figura 7.1** se pueden observar abundantes leucocitos, con su característico núcleo multilobulado, la **Figura 7.2** ilustra la presencia de macrófagos en la muestra morfológicamente distinguibles por tener un núcleo dentado por el centro y ser de mayor tamaño que los leucocitos, por otra parte la **Figura 7.3** deja ver la existencia de eritrocitos con su forma de disco bicóncavo y muy acidófilos, la **Figura 7.4** muestra detritus celulares, las cuales se describen como estructuras acidófilas que no poseen núcleo o pueden contener

rastros de este y por último, en la **Figura 7.5** se encuentran algunos cristales los cuales son mucho más refráctiles que los componentes celulares.

Elementos celulares y acelulares relacionados con inflamación					
	Leucocitos N (%)	Macrófagos N (%)	Eritrocitos N (%)	Detritus Celulares N (%)	Cristales N (%)
Ausente	34 (27.9%)	77 (63.1%)	80 (65.6%)	6 (4.9%)	112 (91.8%)
Escaso	53 (43.4%)	39 (32.0%)	35 (28.7%)	87 (71.3%)	10 (8.2%)
Moderado	20 (16.4%)	6 (4.9%)	6 (4.9%)	23 (18.9%)	-
Abundante	10 (8.2%)	-	1 (0.8%)	6 (4.9%)	-
Muy Abundante	5 (4.1%)	-	-	-	-
Total	122 (100.0%)	122 (100.0%)	122 (100.0%)	122 (100.0%)	122 (100.0%)

Tabla VII – III. Resultados de las observaciones de los elementos celulares y acelulares asociados a inflamación en los ECV de las pacientes infértiles. N = Número de pacientes, % = Porcentaje de pacientes

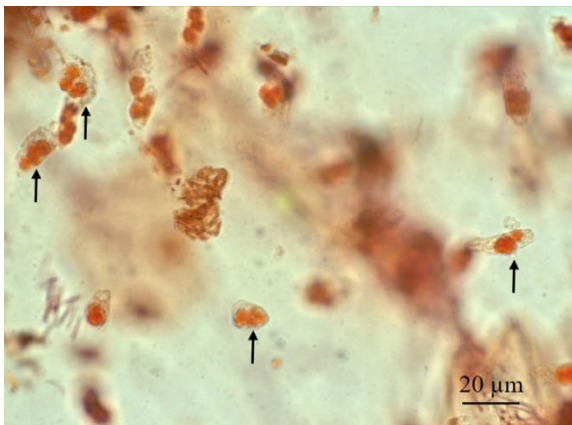


Figura 7.1. Leucocitos abundantes en ECV. Flechas: Leucocitos. Aumento: 1000X. Tinción: Rojo Neutro.



Figura 7.2. Macrófagos abundantes en ECV. Flechas: Macrófagos. Aumento: 1000X. Tinción: Rojo Neutro.

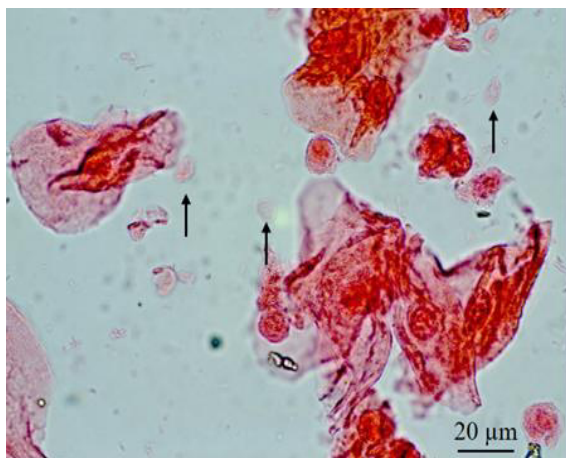


Figura 7.3. Eritrocitos en ECV. Flechas: Eritrocitos. Aumento: 1000X. Tinción: Eosina Y.

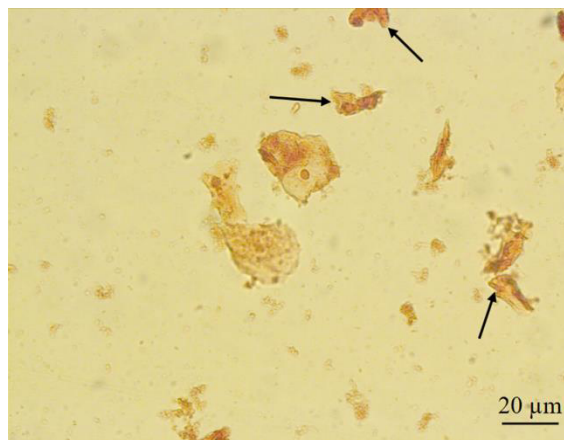


Figura 7.4. Detritus celulares en ECV. Flechas: Detritus celulares anucleados. Aumento: 1000X. Tinción: Rojo Neutro.

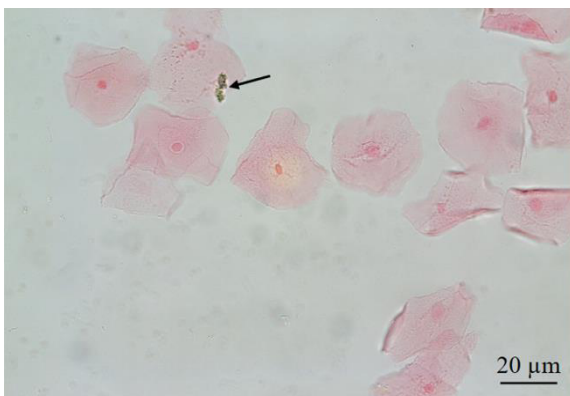


Figura 7.5. Cristales en ECV. Flechas: Cristales refringentes. Aumento: 1000X. Tinción: Eosina Y.

La segunda sección de las observaciones citológicas realizadas, se dedicaron al análisis de la presencia y abundancia de elementos microbiológicos, tales como estructuras bacterianas como bacilos (aquellos morfológicamente incompatibles con la flora de Döderlein) o cocos, así como también estructuras fúngicas descritas como levaduras o pseudohifas, en donde por parte de las bacterias cocoides, en el 2.5% de los casos se encontraban de manera abundante. En cuanto a las bacterias bacilares, se pudo observar que en el 17.2% de las pacientes se encontraban abundantes y muy abundantes y por último, las estructuras fúngicas se distinguieron de manera abundante y muy abundante en el 4.9%. En la **Tabla VII – IV** se detallan los resultados obtenidos en la parte microbiológica del análisis citológico.

Elementos microbiológicos asociados a infección			
	Cocos N (%)	Bacilos N (%)	Levaduras N (%)
Ausente	29 (23.8%)	10 (8.2%)	107 (87.7%)
Escaso	81 (66.4%)	66 (54.1%)	5 (4.1%)
Moderado	9 (7.4%)	25 (20.5%)	4 (3.3%)
Abundante	3 (2.5%)	10 (8.2%)	5 (4.1%)
Muy Abundante	-	11 (9.0%)	1 (0.8%)
Total	122 (100.0%)	122 (100.0%)	122 (100.0%)

Tabla VII – IV. Resultados microbiológicos obtenidos con el análisis citológico de los ECV de las pacientes con infertilidad. N = Número de pacientes, % = Porcentaje de pacientes

En la siguiente secuencia de imágenes se ilustran algunos elementos microbiológicos causando una infección genitourinaria en las pacientes estudiadas. En la **Figura 7.6** se muestra un ECV con abundantes bacterias en forma de cocos causando una infección genitourinaria en su fase aguda, en la **Figura 7.7** se pueden observar abundantes bacterias bacilares en relación con abundantes leucocitos y en la **Figura 7.8** ilustra la clara presencia de estructuras fúngicas como levaduras y pseudo-hifas.

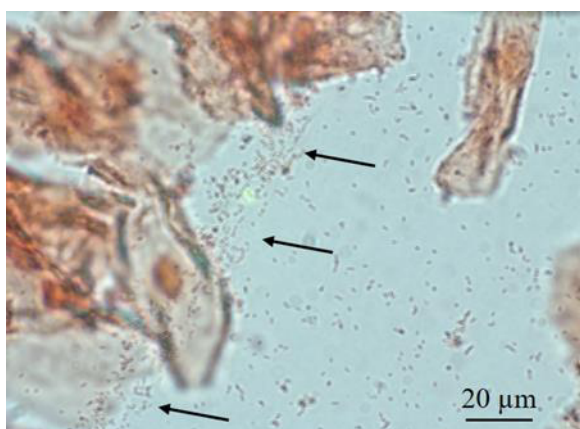


Figura 7.6 Abundantes bacterias cocoides en el ECV. Flechas: Bacterias cocos, Aumento: 1000X, Tinción: Eosina Y

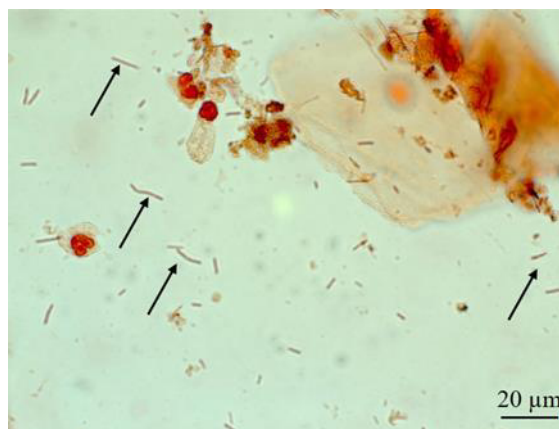


Figura 7.7 Abundantes bacterias bacilares en el ECV. Flechas: Bacterias bacilares, Aumento: 1000X, Tinción: Rojo neutro

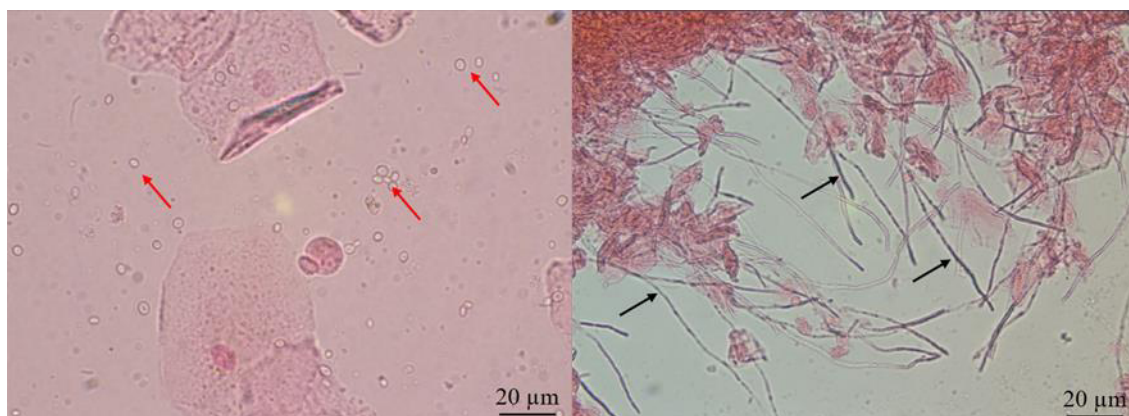


Figura 7.8. Estructuras fúngicas en el ECV. Flechas Rojas: Levaduras, Flechas negras: Pseudohifas. Aumento: 1000X, Tinción: Eosina Y

Resultados de los hallazgos citomorfológicos de las citologías cervicales convencionales realizadas con la tinción de Papanicolaou.

Como parte de los estudios citológicos realizados al grupo de pacientes estudiado se llevaron a cabo citologías convencionales con la tinción Policromática de Papanicolaou, las citologías fueron examinadas e interpretadas con la clasificación de Papanicolaou que evalúa propiamente los cambios celulares presentes en el ECV.

De las 122 muestras analizadas, un poco más de la mitad obtuvieron diagnóstico de Clase I, el resto de los resultados se dividieron entre el resultado Clase II con un 20.5% y la Clase III con un 26.2%. Es importante destacar que ninguna de las pacientes presentó diagnósticos de Clase IV ni Clase V. En la **Tabla VII – V** se detallan los resultados obtenidos con la citología cervical convencional y las **Figuras 7.9** a la **7.11** muestran micrografías tomadas de las observaciones citológicas con la técnica de Papanicolaou, donde se señalan los cambios morfológicos de las células y la categoría asignada por dichos cambios.

Resultados de la citología cervical convencional de Papanicolaou	
Diagnóstico	Muestras N (%)
Clase I	65 (53.3%)
Clase II	25 (20.5%)
Clase III	32 (26.2%)
Clase IV	0 (0%)
Clase V	0 (0%)
Total	122 (100.0%)

Tabla VII – V. Resultados del diagnóstico con la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou en las pacientes estudiadas. N = Número de Muestras analizadas, % = Porcentaje de muestras analizadas.

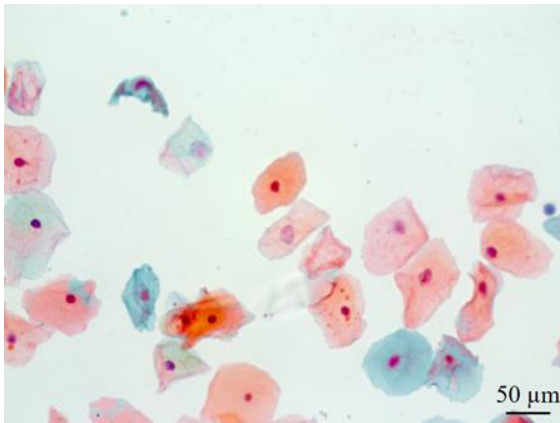


Figura 7.9. Papanicolaou Clase I. Se observan células sin atipia, ni signos de malignidad, aumento: 400X, tinción: Papanicolaou

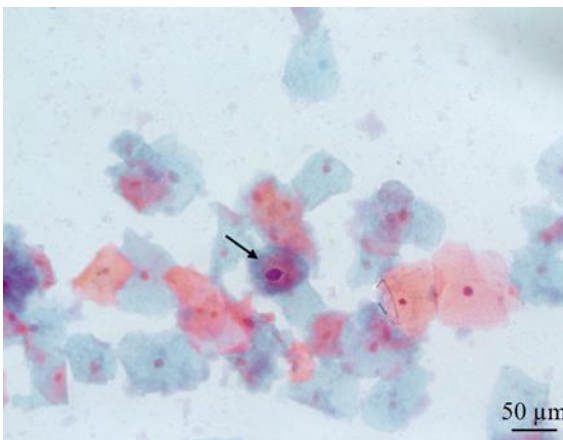


Figura 7.10. Papanicolaou de Clase II. Flecha: Célula escamosa atípica de significado incierto, citoplasma denso, núcleo agrandado e hiper Cromático. Aumento: 400X. Tinción: Papanicolaou

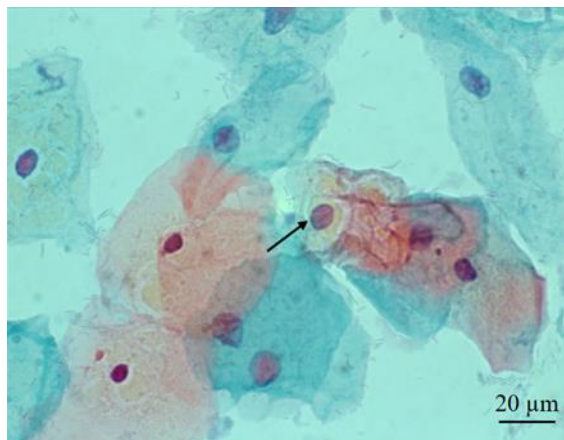


Figura 7.11. Papanicolaou de Clase III. Flecha: Célula escamosa sospechosa de displasia (coilocito) halo citoplasmático perinuclear, núcleo agrandado e hiper Cromático. Aumento: 1000X. Tinción: Papanicolaou

Resultados de las observaciones específicas para la detección presuntiva por criterios morfológicos del VPH y de *Chlamydia trachomatis* mediante CIFAR – CF, citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou y Citología con Tinción de Giemsa.

Como una parte especial del estudio citológico y para cumplir uno de los objetivos centrales de este proyecto, se realizó la búsqueda intencionada de evidencia morfológica que

demuestre la presencia del VPH y/o de *Chlamydia trachomatis* en las muestras de ECV en el grupo de pacientes estudiadas.

Para estos análisis se utilizaron las tres técnicas en cuestión con el fin de comparar la eficiencia de detección de estos microorganismos entre ellas basándose en los mismos criterios morfológicos en las tres, la demostración de coilocitosis (efecto citopático del VPH) por una parte y por la otra, las inclusiones intracitoplásmicas morfológicamente compatibles con *Chlamydia trachomatis* (IMCCT).

Las 122 muestras fueron analizadas por las tres técnicas de manera satisfactoria y exhaustiva, comenzando por la CIFAR - CF, siguiendo con la citología con tinción de Papanicolaou y terminando con la citología con tinción de Giemsa. Para la detección del VPH en las muestras, la técnica que arrojó más resultados positivos fue la citología con tinción de Giemsa con más de la tercera parte de las muestras analizadas, seguida de la CIFAR – CF y por último la citología con tinción de Papanicolaou.

La tinción de Giemsa también resultó ser la que mostró más resultados positivos para detectar *Chlamydia trachomatis*, seguido de la citología con Papanicolaou y finalmente la CIFAR – CF. En las **Figuras 7.12** y **7.13** se ilustran micrografías de las observaciones realizadas para la detección presuntiva de estos microorganismos en base a los criterios morfológicos que presentan las células infectadas con las tres tinciones utilizadas para los ECV y En la **Tabla VII – VI** se detallan los resultados obtenidos en los análisis citológicos en este aspecto.

Resultados de la detección presuntiva de VPH y <i>Chlamydia trachomatis</i> en los ECV según la técnica citológica		
	Muestras positivos para VPH N (%)	Muestras positivos para <i>Chlamydia trachomatis</i> N (%)
CIFAR – CF	44 (36.1%)	41 (33.6%)
PAPANICOLAOU	32 (26.2%)	47 (38.5%)
GIEMSA	48 (39.3%)	48 (39.3%)

Tabla VII – VI. Resultados de las observaciones en los ECV para la detección presuntiva bajo criterio morfológico para VPH y *Chlamydia trachomatis*. N = Número de muestras analizadas, % = Porcentaje de muestras analizadas

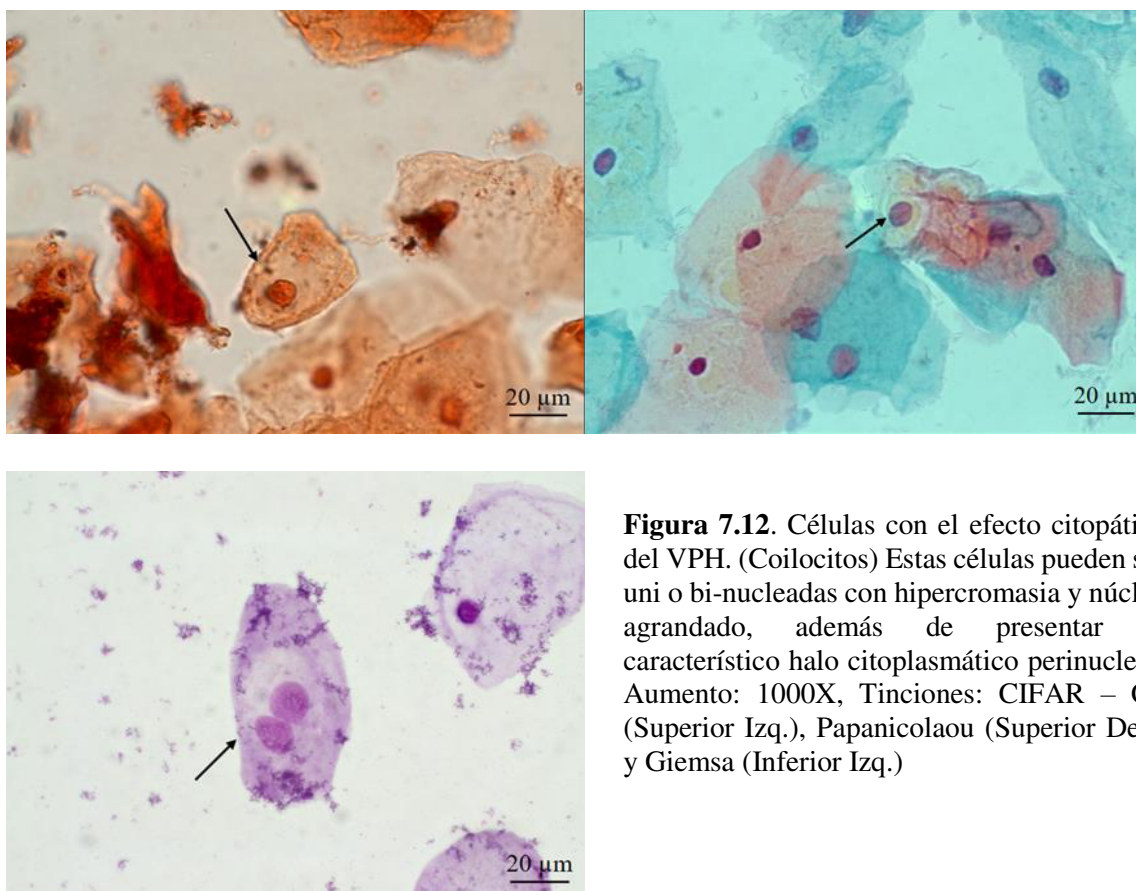


Figura 7.12. Células con el efecto citopático del VPH. (Coilocitos) Estas células pueden ser uni o bi-nucleadas con hiper cromasia y núcleo agrandado, además de presentar el característico halo citoplasmático perinuclear. Aumento: 1000X, Tinciones: CIFAR – CF (Superior Izq.), Papanicolaou (Superior Der.) y Giemsa (Inferior Izq.)

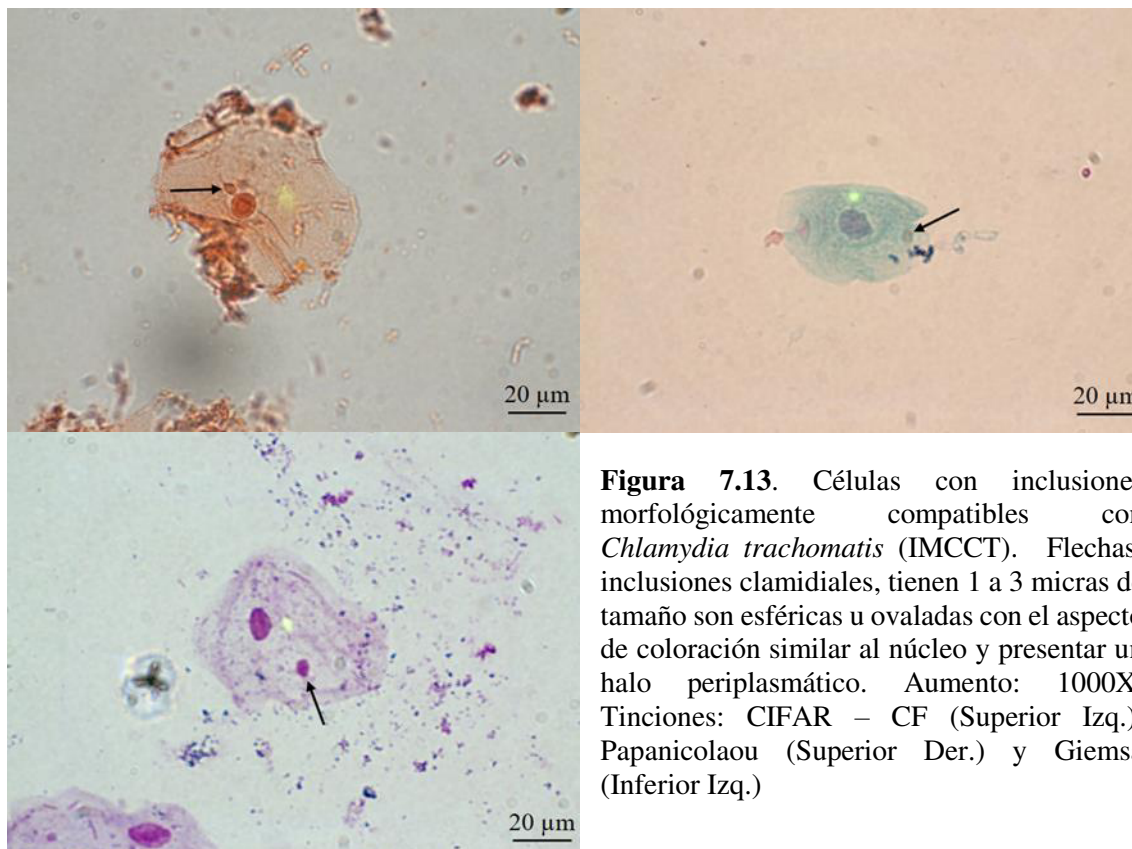


Figura 7.13. Células con inclusiones morfológicamente compatibles con *Chlamydia trachomatis* (IMCCT). Flechas: inclusiones clamidiales, tienen 1 a 3 micras de tamaño son esféricas u ovaladas con el aspecto de coloración similar al núcleo y presentar un halo periplasmático. Aumento: 1000X, Tinciones: CIFAR – CF (Superior Izq.), Papanicolaou (Superior Der.) y Giemsa (Inferior Izq.)

Resultados de las pruebas de asociación entre hallazgos citológicos y microbiológicos observados en los análisis de los ECV de las pacientes con infertilidad.

Una vez realizadas las citologías con las 3 técnicas, se procedió a realizar pruebas de estadística inferencial como la prueba de chi-cuadrada, para demostrar el grado de asociación que existe entre los hallazgos citológicos y microbiológicos reportados. Primeramente, se evaluó la presencia de células inflamatorias tales como los leucocitos y los macrófagos y la relación que tienen con otros signos citomorfológicos de inflamación encontrados, así como con la existencia de bacterias cocoides, bacilares y levaduras. En cuanto a los leucocitos, se pudo encontrar que tienen una estrecha relación con la cantidad de macrófagos ($P \leq 0.001$, *chi – cuadrada de Pearson*) observados, al igual que con los eritrocitos ($P \leq 0.001$), ya que en las muestras donde estos dos factores se encontraban elevados, los leucocitos se

encontraban también en cantidad abundante, Por otro lado, los leucocitos no presentaron tener relación significativa con otros signos citomorfológicos de infección como la aparición de detritus celulares ($P = 0.062$) o de cristales ($P = 0.348$), en la **Figura 7.14** se puede observar la asociación que existe entre la presencia de leucocitos con otros signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad.

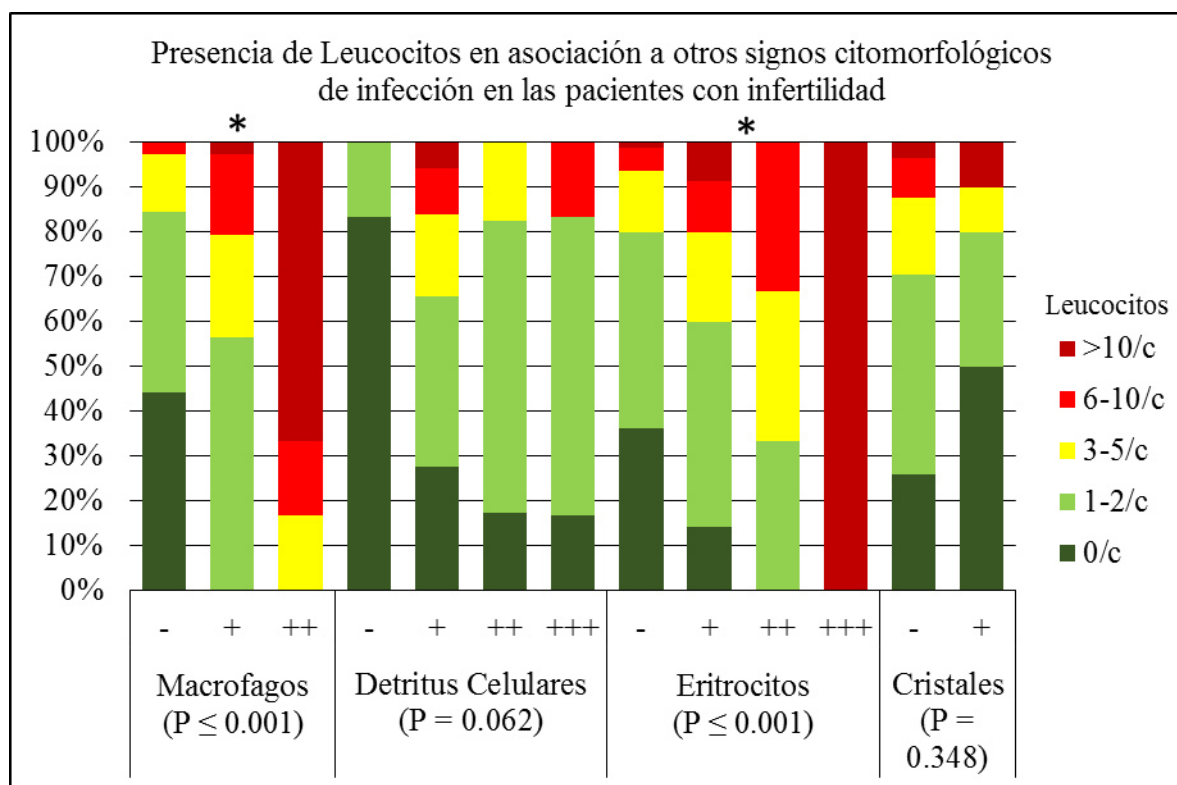


Figura 7.14. Gráfico de relación entre la presencia de leucocitos con otros signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi$ cuadrada de Pearson. Clave para factores en eje X: - : Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, ++++: Muy abundantes, #/c: Leucocitos/campo. (*) = $P < 0.05$.

Como parte de los mismos estudios de relación, se analizó el nivel de asociación entre la aparición de células leucocíticas con la presencia de estructuras microbiológicas observadas tales como bacterias u hongos para evaluar la respuesta inmune montada en contra de tales microorganismos y se encontró que los leucocitos se elevaban

significativamente cuando las muestras contenían mayor cantidad de bacterias bacilares ($P \leq 0.001$, *Chi cuadrada de Pearson*) y levaduras ($P = 0.022$), al contrario que contra la presencia de bacterias cocoides ($P = 0.091$) En la **Figura 7.15** se detalla la relación que tienen los leucocitos con los microorganismos anteriormente mencionados y la manera en cómo se comportan de manera conjunta.

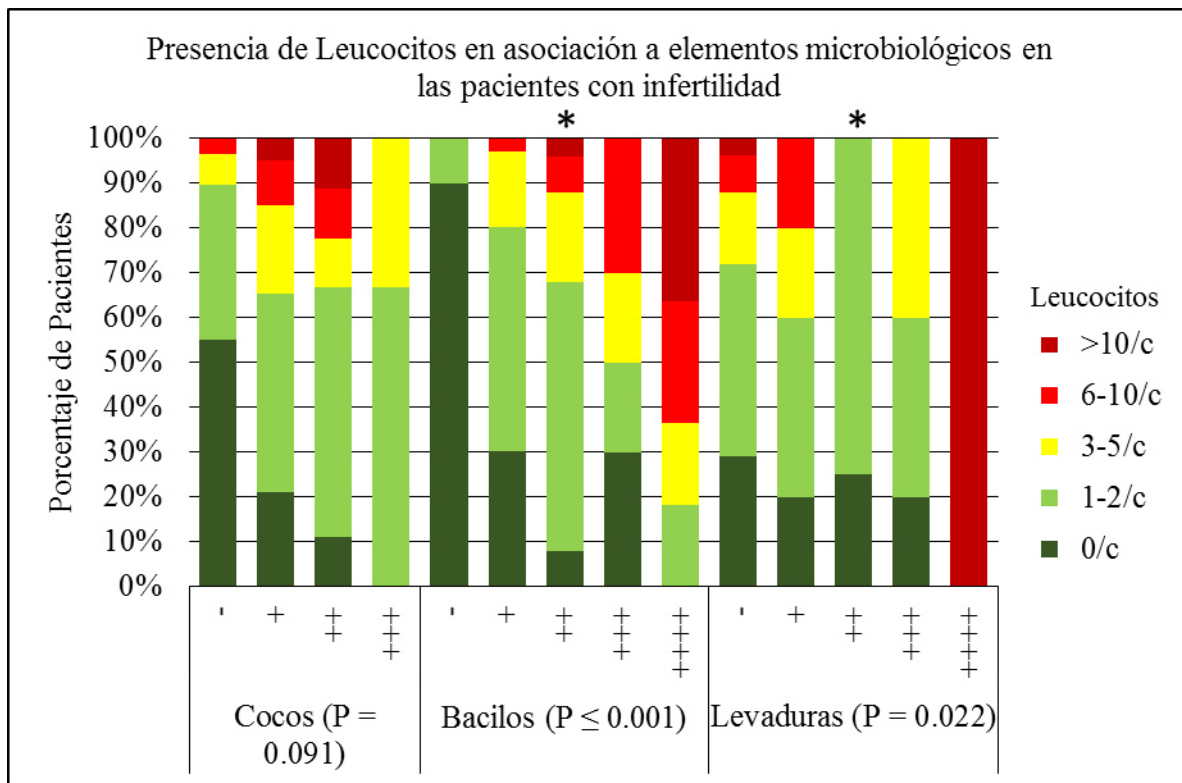


Figura 7.15. Gráfico de relación entre la presencia de leucocitos con elementos microbiológicos en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi\ cuadrada\ de\ Pearson$. Clave para factores en eje X: - : Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, +++++: Muy abundantes, #/c: Leucocitos/campo, (*) = $P < 0.05$.

Otro aspecto de la evaluación de la inflamación es la presencia de las células fagocíticas mejor llamadas macrófagos o histiocitos, por lo que también se analizaron las asociaciones que pudieran existir entre su aparición y los parámetros de signos citomorfológicos de infección (a excepción de los leucocitos, demostrado anteriormente) y los elementos

microbiológicos presentes en los ECV. Los macrófagos resultaron tener una fuerte relación con la presencia de detritus celulares ($P = 0.014$, *chi cuadrada de Pearson*) así como con la aparición de eritrocitos ($P \leq 0.001$), aunque no se encontró asociación con los cristales ($P = 0.379$). En la figura 7.16 se ilustra la relación que presentan los macrófagos con otros signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad.

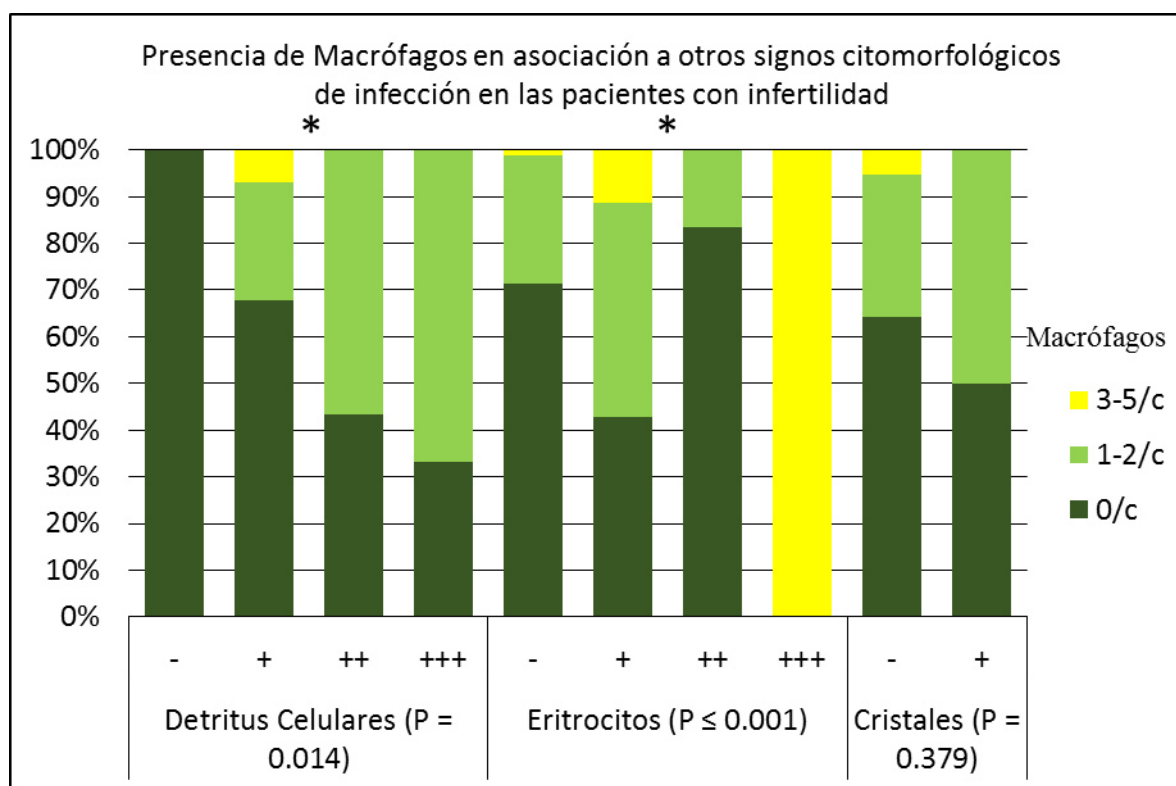


Figura 7.16. Gráfico de relación entre la presencia de macrófagos con otros signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi\ cuadrada\ de\ Pearson$. Clave para factores en eje X: -: Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, ++++: Muy abundantes, #/c: Macrófagos/campo. (*) = $P < 0.05$.

Por otro lado, al analizar la cantidad de macrófagos en las muestras contra la presencia de estructuras microbianas también se pudo encontrar relación, aunque solamente en el caso

de las bacterias bacilares ($P \leq 0.001$) sin encontrar asociación con la presencia de bacterias cocoides ($P = 0.895$) ni con las estructuras fúngicas de levadura ($p = 0.494$). Cabe destacar que en ninguna muestra se encontraron macrófagos en cantidades por encima de las células por campo en promedio. En la figura 7.17 se muestra el gráfico de asociación entre la presencia de macrófagos con elementos microbiológicos en las muestras estudiadas.

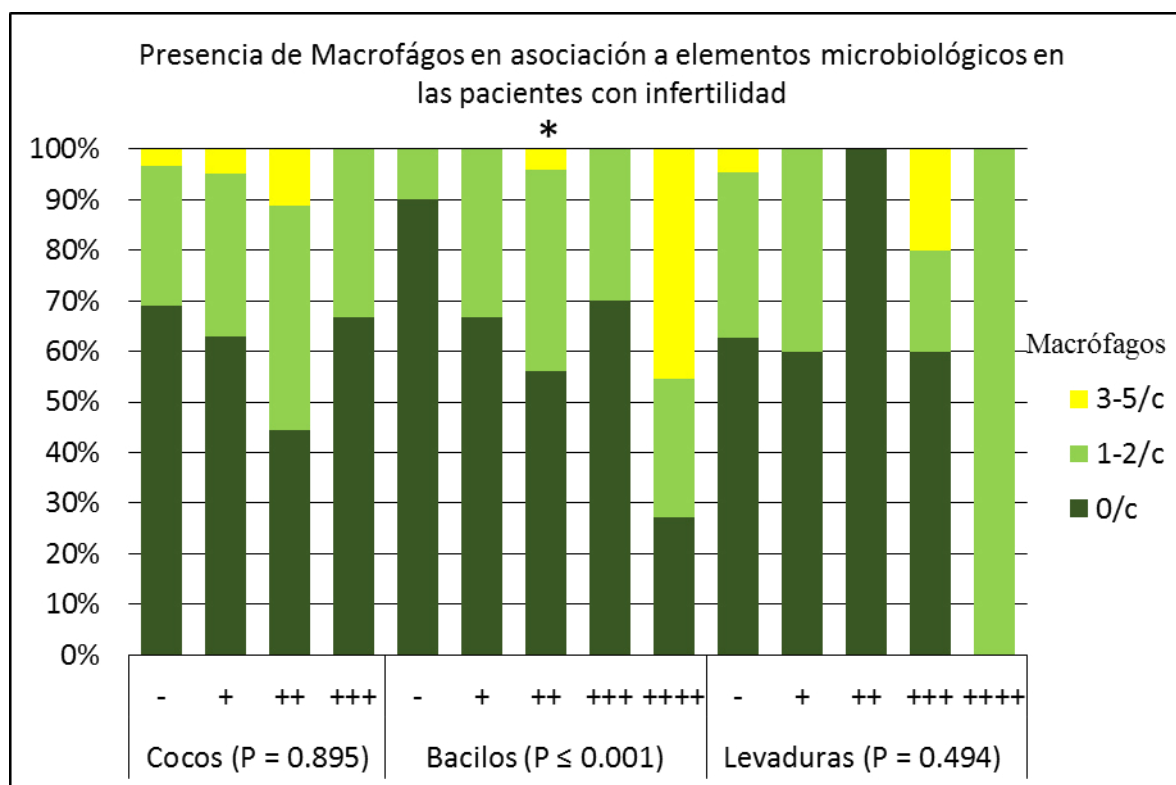


Figura 7.17. Gráfico de relación entre la presencia de macrófagos con estructuras microbiológicas presentes en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi$ cuadrada de Pearson. Clave para factores en eje X: -: Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, ++++: Muy abundantes, #/c: Macrófagos/campo. (*) = $P < 0.05$.

Una de las partes centrales de este estudio fue la identificación oportuna de las infecciones por VPH y *Chlamydia trachomatis*. Por lo que era de suma importancia realizar los análisis de las asociaciones que puedan establecerse entre la aparición de los indicios citológicos de

infección por estos microorganismos con los signos citomorfológicos de infección en general y con las estructuras microbiológicas presentes con el fin de establecer patrones de infección que puedan ser identificables o predictivos. Por el lado del VPH se encontró que la coilocitosis se asociaba fuertemente con la cantidad de leucocitos ($P = 0.014$, *chi cuadrado de Pearson*) así como también en los macrófagos ($P = 0.021$), y no se estableció una conexión con los detritus celulares ($P = 0.587$) cristales ($P = 0.787$) ni con la presencia de eritrocitos ($P = 0.604$). En la **Figura 7.18** se muestra el gráfico de asociación entre las observaciones de signos citomorfológicos de infección con la presencia de coilocitosis.

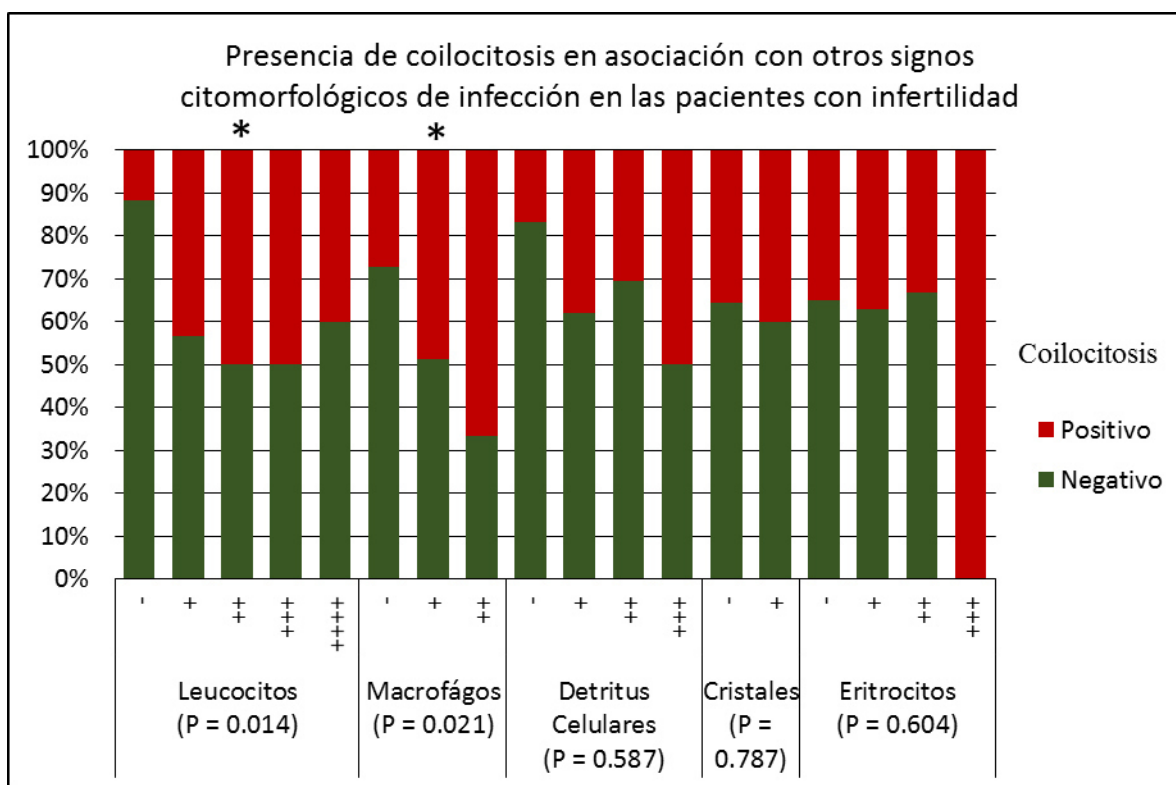


Figura 7.18. Gráfico de relación entre la presencia de signos citomorfológicos de infección con coilocitosis en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi\ cuadrada\ de\ Pearson$. Clave para factores en eje X: - : Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, ++++: Muy abundantes. (*) = $P < 0.05$.

En cuanto al análisis de asociación que se realizó entre la coilocitosis con la presencia de estructuras bacterianas, esta se encontró estar fuertemente relacionada solamente con la identificación de células con inclusiones morfológicamente compatibles con *Chlamydia trachomatis* ($P = 0.001$, chi cuadrada de Pearson), mientras que no se pudo establecer una asociación con la presencia de bacterias cocoides ($P = 0.327$), bacterias bacilares ($P = 0.087$) ni con las estructuras fúngicas con forma de levadura ($P = 0.392$). En la **Figura 7.19** se detalla el gráfico de asociación entre estas variables con la presencia de coilocitosis.

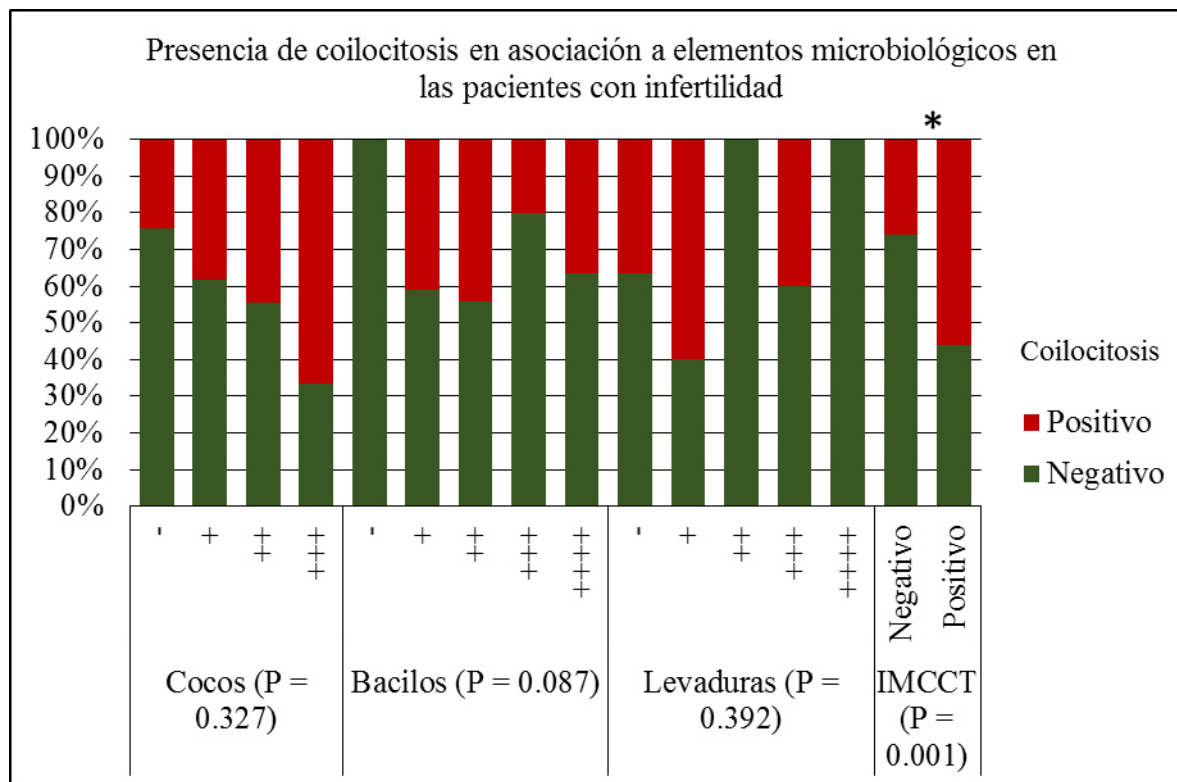


Figura 7.19. Gráfico de relación entre la presencia de estructuras microbiológicas con coilocitosis en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi$ cuadrada de Pearson. Clave para factores en eje X: - : Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, ++++: Muy abundantes. IMCCT: Inclusiones Morfológicamente Compatibles con *Chlamydia trachomatis*. (*) = $P < 0.05$.

Por último, para contemplar la infección por *Chlamydia trachomatis* se analizaron los mismos parámetros citológicos y microbiológicos con la presencia de células con IMCCT para observar las posibles relaciones que pudieran tener estos hallazgos. Primeramente se analizaron los signos citomorfológicos de infección y se pudo encontrar una relación directa entre la presencia de células con IMCCT y la existencia de células inflamatorias, tanto de leucocitos ($P \leq 0.001$, *chi cuadrada de Pearson*) así como de macrófagos ($P = 0.050$), además también se observó una fuerte asociación con la observación de detritus celulares ($P = 0.004$), mientras que los cristales ($P = 0.099$) y los eritrocitos ($P = 0.180$) no mostraron estar conectadas a la aparición de estas células. En la **Figura 7.20** se muestra el gráfico de asociación entre los parámetros mencionados con las células con IMCCT.

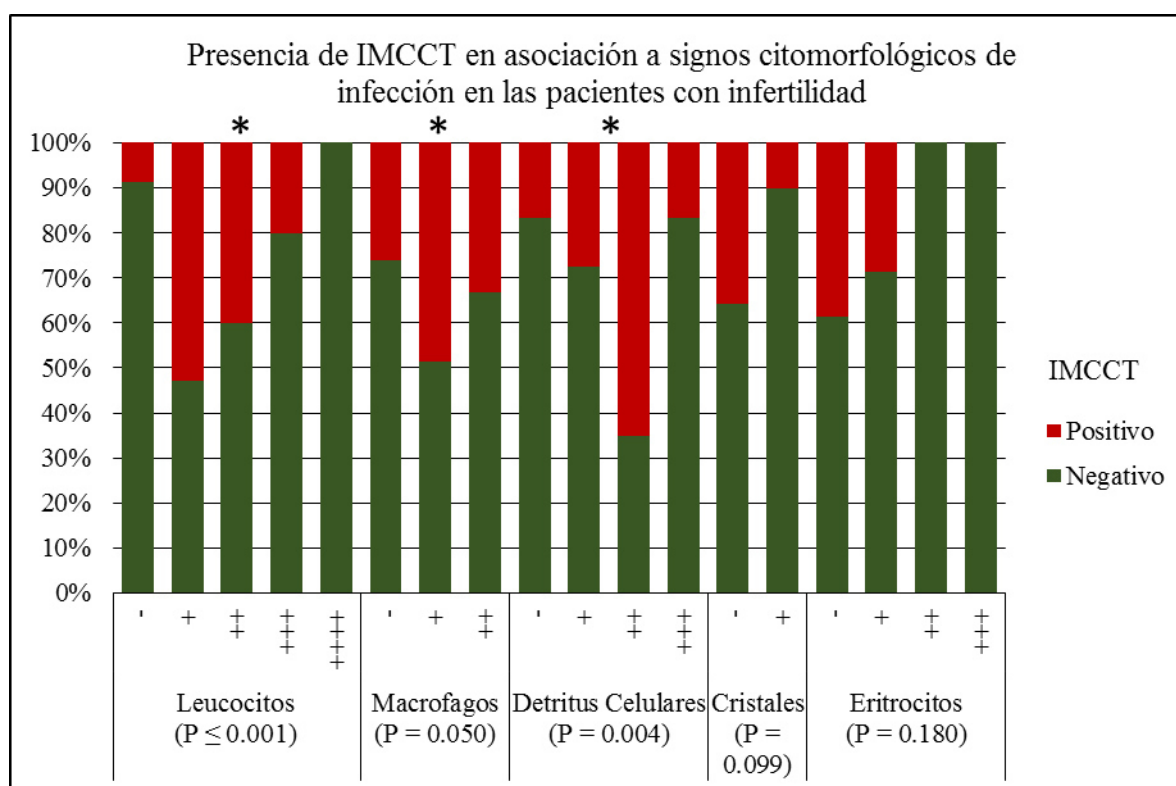


Figura 7.20. Gráfico de relación entre la presencia de células con IMCCT con signos citomorfológicos de infección en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi\ cuadrada\ de\ Pearson$. Clave para factores en eje X: - : Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, ++++: Muy abundantes. IMCCT: Inclusiones Morfológicamente Compatibles con *Chlamydia trachomatis*. (*) = $P < 0.05$

Por otro lado, también se estudió la relación que pudiera existir entre la presencia de células con IMCCT con las estructuras microbiológicas (exceptuando los coilocitos, previamente demostrados). Los resultados de las pruebas estadísticas no arrojaron ninguna asociación significativa entre las células con IMCCT y las bacterias cocoides ($P = 0.398$), bacterias bacilares ($P = 0.128$) y las estructuras fúngicas en forma de levadura ($P = 0.599$). En la **Figura 7.21** se ilustra el gráfico de asociación entre los hallazgos antes mencionados con las células con IMCCT en las muestras estudiadas.

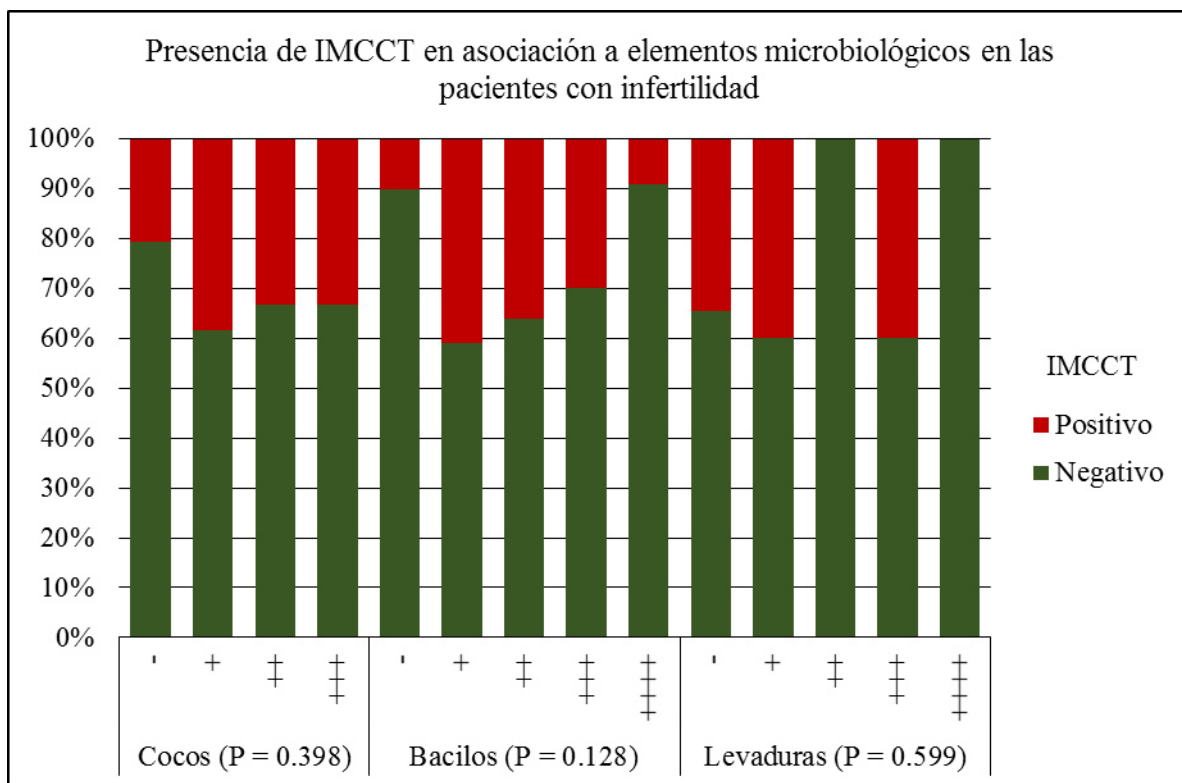


Figura 7.21. Gráfico de relación entre la presencia de células con IMCCT con estructuras microbiológicas en los ECV de las pacientes con infertilidad. $P = Chi\ cuadrada\ de\ Pearson$. Clave para factores en eje X: - : Ausente, +: Escasos, ++: Moderados, +++: Abundantes, ++++: Muy abundantes. IMCCT: Inclusiones Morfológicamente Compatibles con *Chlamydia trachomatis*. (*) = $P < 0.05$

7.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CONFIRMATORIAS PARA LA DETECCIÓN DEL VPH Y *Chlamydia trachomatis* EN LAS MUESTRAS DE EXUDADO CÉRVICO – VAGINAL DE LAS PACIENTES CON INFERTILIDAD.

Al haber analizado las 122 muestras de ECV con la CIFAR - CF, la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou y con tinción de Giemsa se realizó la búsqueda de identificar presuntivamente al VPH y *Chlamydia trachomatis*, esto basándose solamente en el criterio morfológico fundado en los cambios que estos microorganismos generan propiamente en las células del tracto reproductivo femenino inferior al infectarlas. Después de haber realizado estos análisis por las 3 técnicas, se llevó a cabo la detección confirmatoria en todas las muestras de ECV, inclusive en aquellas que no presentaran células sospechosas de infección, dichos procedimientos se aplicaron con la finalidad de conocer la prevalencia real de estos patógenos en este grupo de pacientes, y además para realizar posteriormente la caracterización del valor diagnóstico que tienen las citologías en la detección de dichos patógenos, es decir, saber el grado de eficacia y correlación que tienen estas técnicas con los procedimientos referenciados como los “estándar de oro”.

Resultados de las técnicas confirmatorias para la detección definitiva del VPH y *Chlamydia trachomatis* en los ECV de las pacientes con infertilidad.

Las técnicas empleadas para las pruebas confirmatorias fueron IFD para la detección de los antígenos de *Chlamydia trachomatis* directamente en los ECV y también se realizaron amplificaciones de ácidos nucleicos con la técnica de PCR para buscar ADN específico del VPH y de *Chlamydia trachomatis*, el total de las 122 muestras fueron procesadas satisfactoriamente en todas las técnicas empleadas. Durante la evaluación con la IFD se lograron observar los cuerpos de inclusión clamidiales fluorescentes en 19 (15.6%) de las

122 muestras analizadas, en la **Figura 7.22** se muestran micrografías de la microscopía de fluorescencia utilizada para este ensayo donde se pueden visualizar las inclusiones clamidiales en un tono verde brillante.

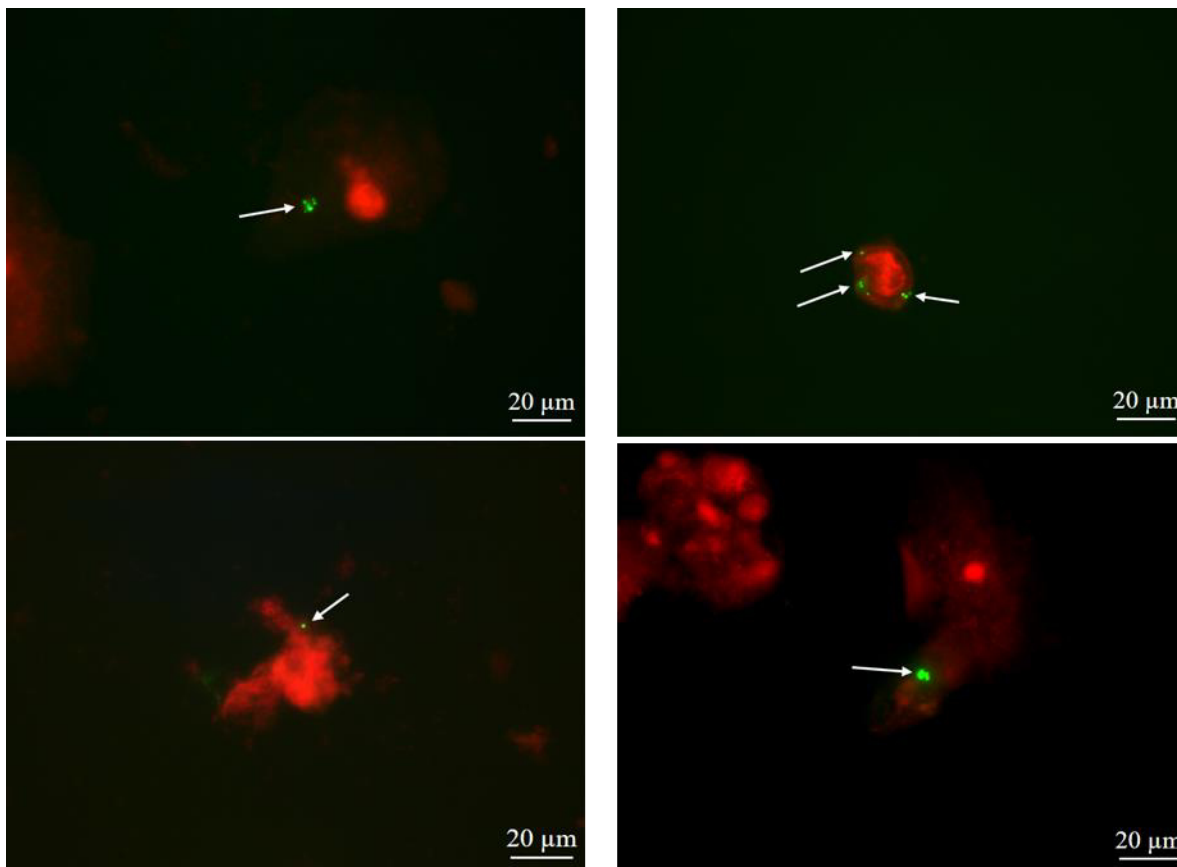


Figura 7.22. Micrografías de la técnica de IFD para la detección de *Chlamydia trachomatis*. Flechas: Cuerpos de inclusión clamidiales. Aumento: 1000x

Por otra parte, se realizaron las pruebas moleculares de detección de ADN de estos dos patógenos, para la validez de estos resultados, se demostró la buena calidad del ADN extraído de la muestra mediante una amplificación del gen de la β – Globina, al ser un gen endógeno conservado del ser humano, en la **Figura 7.23** se muestra un gel de agarosa que demuestra

la correcta amplificación de un fragmento de 402 pares de bases (pb) de este gen, lo que demuestra la validez de los estudios moleculares aplicados a dichas muestras.

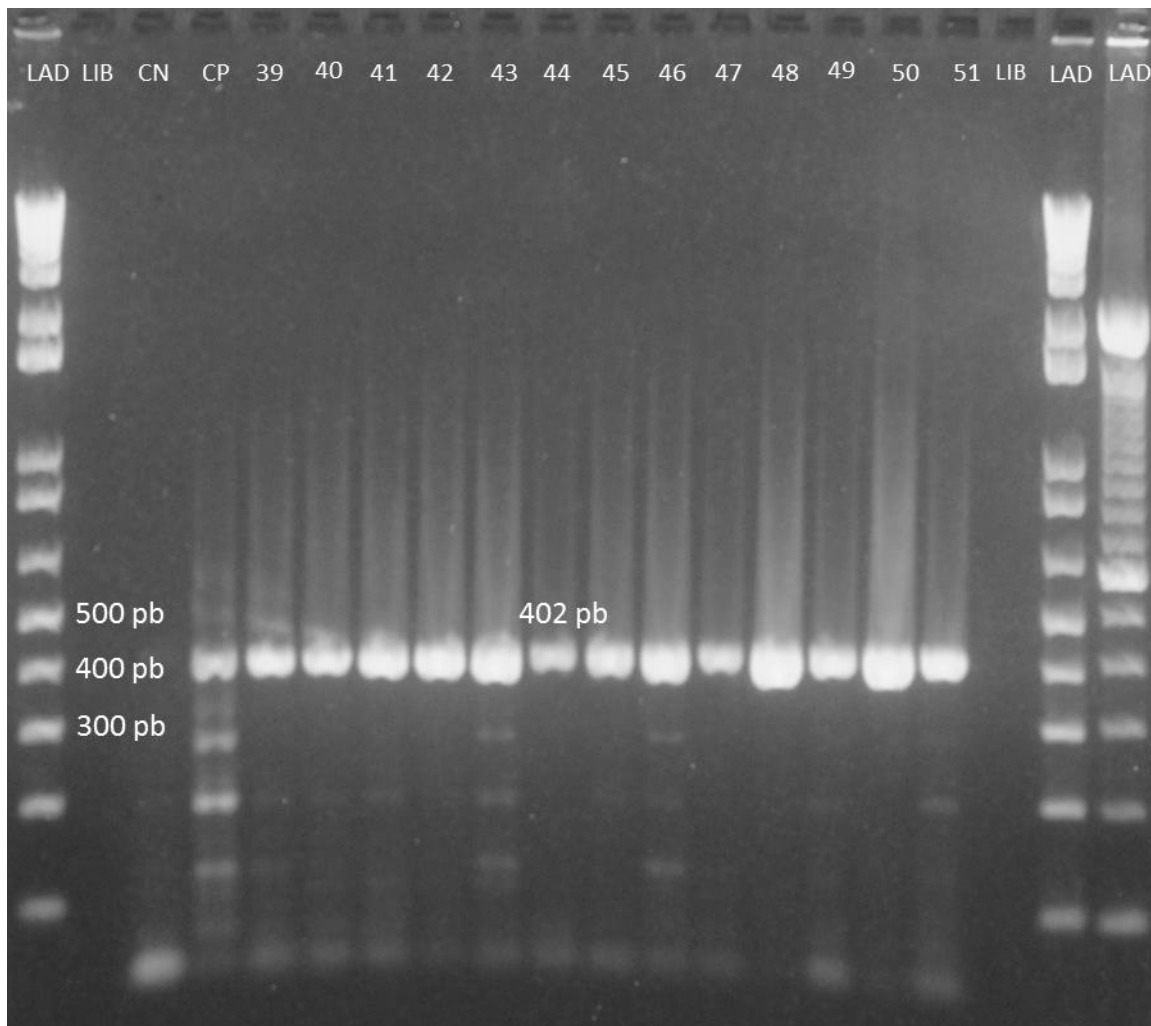


Figura 7.23. Gel electroforético de la amplificación del gen de la β – Globina de las muestras 39 a la 51. Clave: LAD = Marcador de peso molecular, LIB = Carril Libre, CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, #39 – 51 = Muestras, pb = Pares de bases.

Una vez realizada la validación de los extractos de ADN se procedió a amplificar el ADN específico para la detección de *Chlamydia trachomatis*, mediante dicha técnica se pudo determinar la presencia de ADN patógeno en 12 (9.8%) de las muestras analizadas, la **Figura 7.24** ilustra un gel electroforético con una amplificación de ácidos nucleicos específica para *Chlamydia trachomatis* donde se muestra una banda de ADN de 241 pb perteneciente al ADN del patógeno, lo que se interpreta como un resultado positivo en la presencia de *Chlamydia trachomatis*.

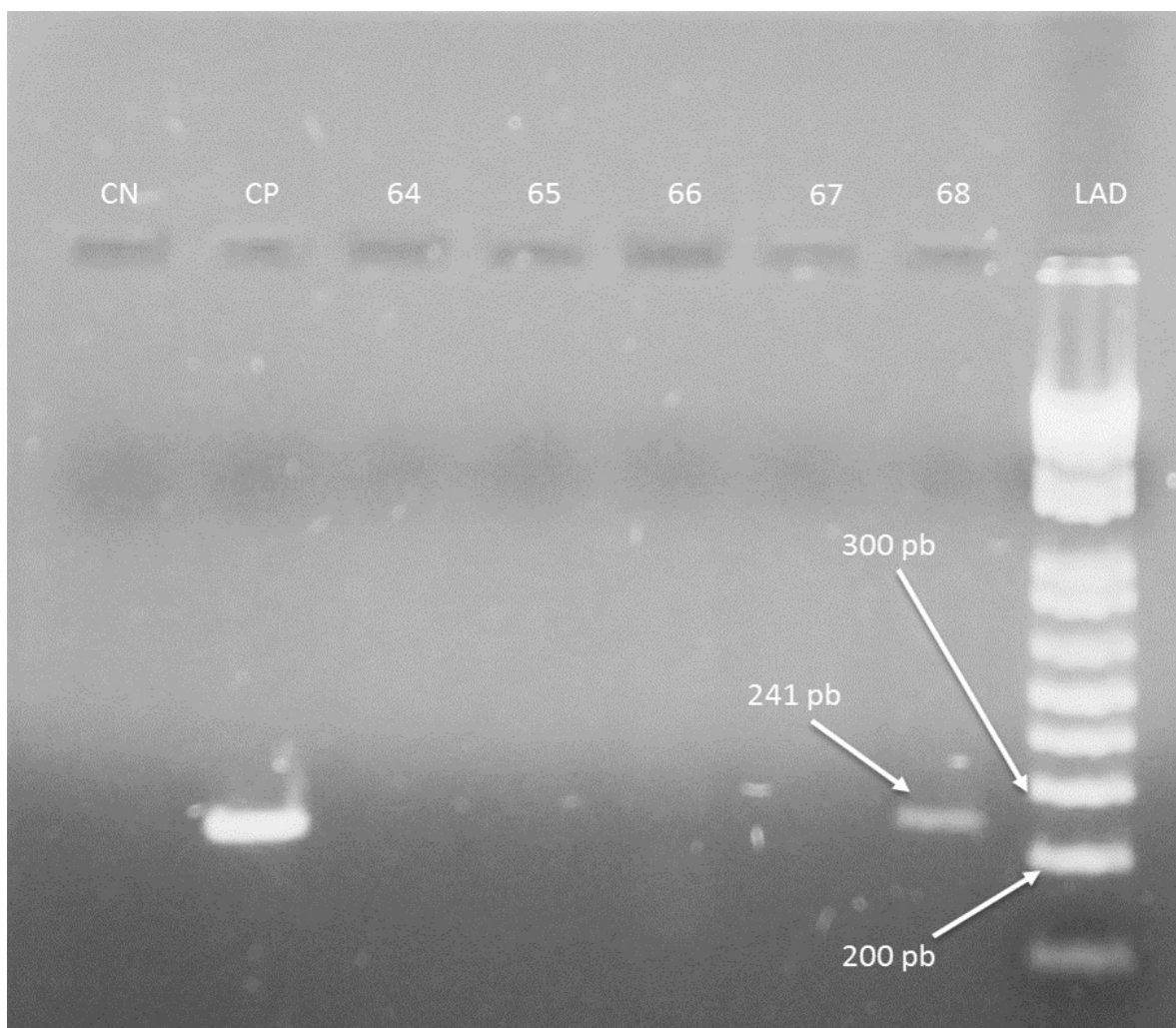


Figura 7.24. Gel electroforético de la amplificación por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis* de las muestras 64 a la 68. Clave: LAD = Marcador de peso molecular, LIB = Carril Libre, CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, #64 - 68 = Muestras, pb = Pares de bases.

Para la detección confirmatoria del VPH también se utilizó una amplificación de ácidos nucleicos, la cual mostró un resultado positivo en 25 (20.5%) muestras de las 122 analizadas, lo que representa el patógeno más común de aquellos que fueron investigados en este proyecto. Una vez analizados los resultados de ambas pruebas moleculares tanto para VPH como para *Chlamydia trachomatis*, se pudo encontrar que en 8 muestras evaluadas (6.6%), se encontraban ambos patógenos, causando una coinfección, así mismo se realizó un análisis de asociación entre la presencia de estos y se encontró que *Chlamydia trachomatis* es significativamente más frecuente en aquellas pacientes infectadas con VPH en comparación con las que no tienen la infección ($P \leq 0.001$, *exacta de Fisher*). En la **Figura 7.25** se observa un gel electroforético con la existencia de una banda de ADN de 450 pb perteneciente a un fragmento del ADN patógeno del VPH, lo cual se considera como un resultado positivo para la presencia de dicho microorganismo. La **Tabla VII – VII** detalla los resultados obtenidos de las tres técnicas confirmatorias realizadas para la detección de estos microorganismos.

Resultados de las pruebas de detección confirmatoria para VPH y <i>Chlamydia trachomatis</i>				
	IFD - <i>Chlamydia trachomatis</i> N (%)	PCR - <i>Chlamydia trachomatis</i> N (%)	PCR – Virus del Papiloma Humano N (%)	PCR – Coinfección VPH y CT N (%)
Positivo	19 (15.6%)	12 (9.8%)	25 (20.5%)	8 (6.6%)
Negativo	103 (84.4%)	110 (90.2%)	97 (79.5%)	114 (93.4%)
Total	122 (100.0%)	122 (100.0%)	122 (100.0%)	122 (100.0%)

Tabla VII - VII. Resultados de las pruebas confirmatorias para la detección de VPH y *Chlamydia trachomatis* en los ECV de las pacientes con infertilidad. N = Número de pacientes, % = Porcentaje de pacientes.

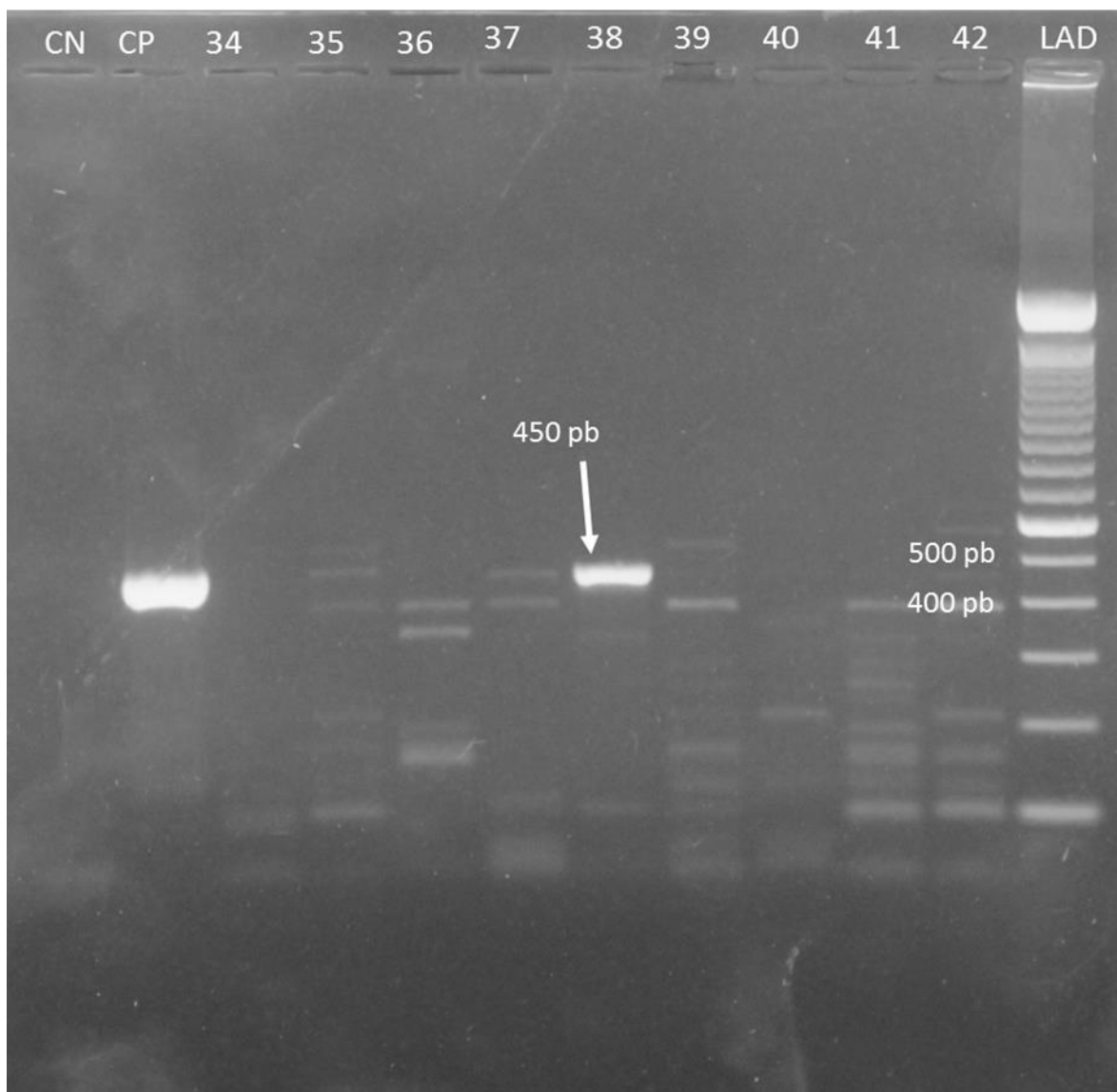


Figura 7.25. Gel electroforético de la amplificación de la PCR para la detección del VPH de las muestras 34 a 42. Clave: LAD = Marcador de peso molecular, LIB = Carril Libre, CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, #34 - 42 = Muestras, pb = Pares de bases.

7.3 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LAS CITOLOGÍAS (CIFAR – CF, PAPANICOLAOU Y GIEMSA) PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN GENITOURINARIA POR EL VPH Y *Chlamydia trachomatis*.

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas de detección preliminar (citologías) con las pruebas de confirmación (moleculares, PCR), es posible realizar los cálculos para conocer los parámetros estadísticos de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos Positivo y Negativo para conocer el valor diagnóstico que tienen las citologías para detectar oportunamente las infecciones causadas por estos dos patógenos.

Resultados de las pruebas estadísticas de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de las citologías para la detección de la infección genitourinaria (IGU) por VPH y *Chlamydia trachomatis*.

Para conocer los parámetros estadísticos del valor diagnóstico de una prueba, se tienen que comparar los resultados obtenidos en dicha prueba contra los que se registren con la prueba de referencia o “estándar de oro” utilizada en las mismas muestras, para esto se ha elegido utilizar los resultados de las pruebas moleculares, es decir, las de la amplificación de ácidos nucleicos por PCR. Primeramente, se evaluó el valor diagnóstico de la CIFAR – CF para detectar la IGU por VPH y *Chlamydia trachomatis*. En cuanto a la infección por VPH, la CIFAR – CF obtuvo valores de sensibilidad y especificidad muy aceptables, al igual que los valores predictivos, sobre todo en el negativo (92.38%), lo que representa un parámetro muy a favor para la utilización de esta técnica con intenciones de monitoreo de las

infecciones. En la **Tabla VII – VIII** se detallan la comparación de resultados de la detección del VPH entre las dos técnicas, es decir, la CIFAR – CF y la PCR.

Comparación de Resultados entre CIFAR – VPH y PCR – VPH				
		Detección confirmatoria PCR - VPH		
		Negativo	Positivo	Total
Detección presuntiva CIFAR - VPH	Negativo	70	8	78
	Positivo	27	17	44
Total		97	25	122
Valor diagnóstico de CIFAR – CF para detección de VPH				
Sensibilidad		75.75%		
Especificidad		78.22%		
Valor Predictivo Positivo		51.92%		
Valor Predictivo Negativo		92.38%		

Tabla VII – VIII. Comparativa entre los resultados y pruebas estadísticas del valor diagnóstico de CIFAR – CF contra la PCR para la detección de VPH

Por otra parte, para la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou, la detección de los cambios morfológicos sospechosos de la infección por el VPH fue un tanto similar, dando parámetros de sensibilidad equiparables, y en cuanto a la especificidad, esta técnica presento una mejora muy significativa (85.08%), por otra parte, los valores predictivos tanto positivo como negativo también fueron muy aceptables. En la **Tabla VII –**

IX se detallan los valores estadísticos de la citología con Papanicolaou y los resultados de esta comparados contra la técnica de PCR para la detección del VPH.

Comparación de Resultados entre PAP – VPH y PCR – VPH				
		Detección confirmatoria PCR – VPH		
		Negativo	Positivo	Total
Detección presuntiva PAP - VPH	Negativo	80	10	90
	Positivo	17	15	32
Total		97	25	122
Valor diagnóstico del PAP para detección de VPH				
Sensibilidad		71.42%		
Especificidad		85.08%		
Valor Predictivo Positivo		59.52%		
Valor Predictivo Negativo		90.65%		

Tabla VII – IX. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico del Papanicolaou y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de VPH.

En este mismo aspecto, se realizaron las evaluaciones de la presencia de coilocitosis en los ECV de las pacientes con infertilidad mediante la técnica de citología cervical con tinción de Giemsa, la cual mostró los parámetros de sensibilidad y especificidad más bajos de los 3 tipos de citologías así como también en relación a los valores predictivos. En la **Tabla VII – X** se muestran los valores diagnósticos de esta prueba, así como los resultados comparados contra la técnica de PCR para la detección de VPH.

Comparación de Resultados entre GIEMSA – VPH y PCR – VPH				
Detección confirmatoria PCR – VPH				
		Negativo	Positivo	Total
Detección presuntiva GIEMSA - VPH	Negativo	61	13	74
	Positivo	36	12	48
Total		97	25	122
Valor diagnóstico de GIEMSA para detección de VPH				
Sensibilidad		65.78%		
Especificidad		72.93%		
Valor Predictivo Positivo		40.98%		
Valor Predictivo Negativo		88.10%		

Tabla VII – X. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la citología cervical con tinción de Giemsa y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de VPH.

Por otra parte, con la CIFAR – CF también se analizaron las muestras de ECV para la detección de las IMCCT con el fin de diagnosticar presuntivamente la presencia de *Chlamydia trachomatis*, los parámetros estadísticos de valor diagnóstico también se analizaron y se compararon contra la técnica de PCR, referenciada como el “estándar de oro”. Los valores intrínsecos a la prueba, es decir, la sensibilidad y especificidad en la prueba fueron muy satisfactorios, y en cuanto a los valores predictivos, el positivo estuvo en 27.90% y el negativo en 98.21%, lo que da un buen valor a la prueba para utilizarla en el monitoreo de la infección causada por *Chlamydia trachomatis*. En la **Tabla VII – XI** se muestra la

comparación de resultados entre las técnicas de CIFAR – CF contra la PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis* y obtener los parámetros estadísticos de valor diagnóstico.

Comparación de Resultados entre CIFAR – <i>Chlamydia trachomatis</i> y PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>				
		Detección confirmatoria PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>		
		Negativo	Positivo	Total
Detección presuntiva CIFAR – <i>Chlamydia trachomatis</i>	Negativo	79	2	81
	Positivo	31	10	41
Total		110	12	122
Valor diagnóstico de CIFAR – CF para detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>				
Sensibilidad		85.71%		
Especificidad		78.01%		
Valor Predictivo Positivo		27.90%		
Valor Predictivo Negativo		98.21%		

Tabla VII – XI. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la CIFAR y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

También en este sentido, se evaluó la presencia presuntiva de IMCCT en las citologías con tinción de Papanicolaou, con la cual se obtuvieron unos valores de Sensibilidad y Especificidad adecuados, y un valor predictivo positivo más bajo que con la técnica de CIFAR – CF, pero equiparándose en el valor predictivo negativo. En la **Tabla VII – XII** se observan los valores diagnósticos y los resultados de esta técnica citológica en comparación con la PCR en cuanto a la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Comparación de Resultados entre PAP – <i>Chlamydia trachomatis</i> y PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>				
Detección confirmatoria PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>				
		Negativo	Positivo	Total
Detección presuntiva PAP – <i>Chlamydia trachomatis</i>	Negativo	73	2	75
	Positivo	37	10	47
Total		110	12	122
Valor diagnóstico de PAP para detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>				
Sensibilidad			85.71%	
Especificidad			74.82%	
Valor Predictivo Positivo			24.48%	
Valor Predictivo Negativo			98.21%	

Tabla VII – XII. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la citología con tinción de Papanicolaou y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Para culminar con las pruebas de validación diagnóstica de las citologías para la detección de VPH y *Chlamydia trachomatis*, se analizaron los ECV mediante la técnica de citología cervical con tinción de Giemsa para identificar la presencia sugestiva de este último microorganismo, los resultados al igual que en todas las anteriores pruebas, se compararon con los resultados de las pruebas moleculares (PCR). Los valores de Sensibilidad y Especificidad fueron muy satisfactorios, reduciéndose en este último en comparación con la CIFAR – CF, el valor predictivo positivo (VPP) fue relativamente bajo (24.00%) y el valor predictivo negativo (VPN) resulto ser muy bueno (98.21%) por lo también esta citología representa una buena técnica de monitoreo para este tipo de infecciones. La **Tabla VII –**

XIII refleja los valores diagnósticos obtenidos y la comparación de resultados de esta técnica con las pruebas moleculares, utilizada como referencia en los análisis para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Comparación de Resultados entre GIEMSA – <i>Chlamydia trachomatis</i> y PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>				
Detección confirmatoria PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>				
		Negativo	Positivo	Total
Detección presuntiva GIEMSA – <i>Chlamydia trachomatis</i>	Negativo	72	2	74
	Positivo	38	10	48
Total		110	12	122
Valor diagnóstico de GIEMSA para detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>				
Sensibilidad			85.71%	
Especificidad			74.32%	
Valor Predictivo Positivo			24.00%	
Valor Predictivo Negativo			98.21%	

Tabla VII – XIII. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la citología con tinción de Giemsa y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Al ser considerada la PCR como el “estándar de oro” en los análisis de la determinación de la presencia de *Chlamydia trachomatis* en las muestras de ECV, la IFD fue tomada en cuenta también para los análisis de valor diagnóstico, y los valores de Sensibilidad y Especificidad fueron bastante buenos, al igual que los parámetros de los valores predictivos, tanto el positivo como el negativo. En la **Tabla VII – XIV** se muestran los valores

estadísticos de valor diagnóstico de la IFD y sus resultados comparados contra la PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Comparación de Resultados entre IFD – <i>Chlamydia trachomatis</i> y PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>				
Detección confirmatoria PCR – <i>Chlamydia trachomatis</i>				
		Negativo	Positivo	Total
Detección presuntiva GIEMSA – <i>Chlamydia trachomatis</i>	Negativo	99	4	103
	Positivo	11	8	19
Total		110	12	122
Valor diagnóstico de IFD para detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>				
Sensibilidad			75.00%	
Especificidad			90.90%	
Valor Predictivo Positivo			52.17%	
Valor Predictivo Negativo			96.49%	

Tabla VII – XIV. Pruebas estadísticas del valor diagnóstico de la IFD y los resultados de esta técnica contra los obtenidos por PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Una vez que fueron calculados todos los valores diagnósticos de las técnicas que se evaluaron para la detección presuntiva de estos dos microorganismos se realizó la integración de todos estos parámetros con la finalidad de comparar las técnicas y evaluar su capacidad de identificar exitosamente una infección genitourinaria de estos dos patógenos, en donde se pudo observar que la mejor técnica en cuestión de sensibilidad y VPN para la detección de VPH en este estudio fue la CIFAR – CF y en términos de Especificidad y VPN fue la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou mientras que para la detección de *Chlamydia trachomatis* los resultados más favorables en todos los parámetros fueron

obtenidos por la CIFAR – CF. En la **Tabla VII – XV** se muestra el conjunto de los valores diagnósticos de todas las pruebas citológicas, tanto para detectar VPH, así como también *Chlamydia trachomatis*.

Valores diagnósticos de todas las técnicas citológicas para la detección de VPH				
	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CIFAR – CF	75.75%	78.22%	51.92%	92.38%
PAPANICOLAOU	71.42%	85.08%	59.52%	90.65%
GIEMSA	65.78%	72.93%	40.98%	88.18%
Valores diagnósticos de todas las técnicas citológicas para la detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>				
	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CIFAR – CF	85.71%	78.01%	27.90%	98.21%
PAPANICOLAOU	85.71%	74.82%	24.48%	98.21%
GIEMSA	85.71%	74.32%	24.00%	98.21%

Tabla VII – XV. Conjunto de los valores diagnósticos de las técnicas citológicas analizadas para la detección del VPH y *Chlamydia trachomatis*

7.4 RESULTADOS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS DATOS DEMOGRÁFICOS Y ANTECEDENTES DE INFERTILIDAD DE LA POBLACIÓN Y LOS HALLAZGOS CITOLÓGICOS CON LA PRESENCIA DEL VPH Y/O *Chlamydia trachomatis*.

En este apartado, se muestran los resultados de las pruebas de asociación generados a partir de la comparación de los datos demográficos e históricas de infertilidad, así como

también de los hallazgos citológicos encontrados en los análisis con las diferentes técnicas con los resultados obtenidos por las pruebas moleculares sobre la presencia del VPH y de *Chlamydia trachomatis*. Esto se realizó para encontrar aquellos factores que se encuentren relacionados con dichas infecciones en las pacientes con infertilidad.

Resultados de la relación entre los datos demográficos y antecedentes de infertilidad con la presencia de VPH y/o *Chlamydia trachomatis*.

Para conocer la asociación entre la presencia de estos microorganismos con los datos descriptivos de la población en estudio, se llevaron a cabo pruebas estadísticas de comparación de medias. Como previamente se había mencionado, los datos demográficos mostraron tener distribuciones normales, por lo que se procedió a utilizar pruebas de T de Student para la comparación de medias de dichos datos entre las muestras analizadas en función de la presencia de VPH, es decir, las que obtuvieron un resultado positivo en la prueba de PCR para VPH contra las que resultaron negativas para este mismo patógeno. Las pacientes infectadas con VPH mostraron un promedio de edad al momento del estudio menor (31.76 años) que el de las pacientes no infectadas (36.58) y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.001$, *T de student*), es decir, las pacientes infectadas con VPH acuden más jóvenes a una consulta por infertilidad, así mismo, estas pacientes infectadas registraron una menor edad en el inicio de la vida sexual activa (IVSA) contra las no infectadas (21.08 años vs. 24.37 años, $P \leq 0.001$, *t de student*), y finalmente en la edad de la menarca las infectadas no mostraron diferencias contra las no infectadas (12.36 años vs. 12.70, $P = 0.237$, *t de student*). En la **Figura 7.26** se muestran los datos generales de las pacientes en función de su positividad para VPH y el resultado de la prueba estadística.

En cuanto a los datos históricos de infertilidad de las pacientes estudiadas, se pudo observar que las pacientes que se tenían embarazos previos exhibían menor presencia de VPH que aquellas no han tenido embarazos previos ($P \leq 0.001$, *exacta de Fisher*), en el caso de las pacientes con abortos previos, esto se presentaba de la misma manera siendo menor el porcentaje de pacientes infectadas con VPH en aquellas que presentaban este padecimiento. ($P = 0.037$).

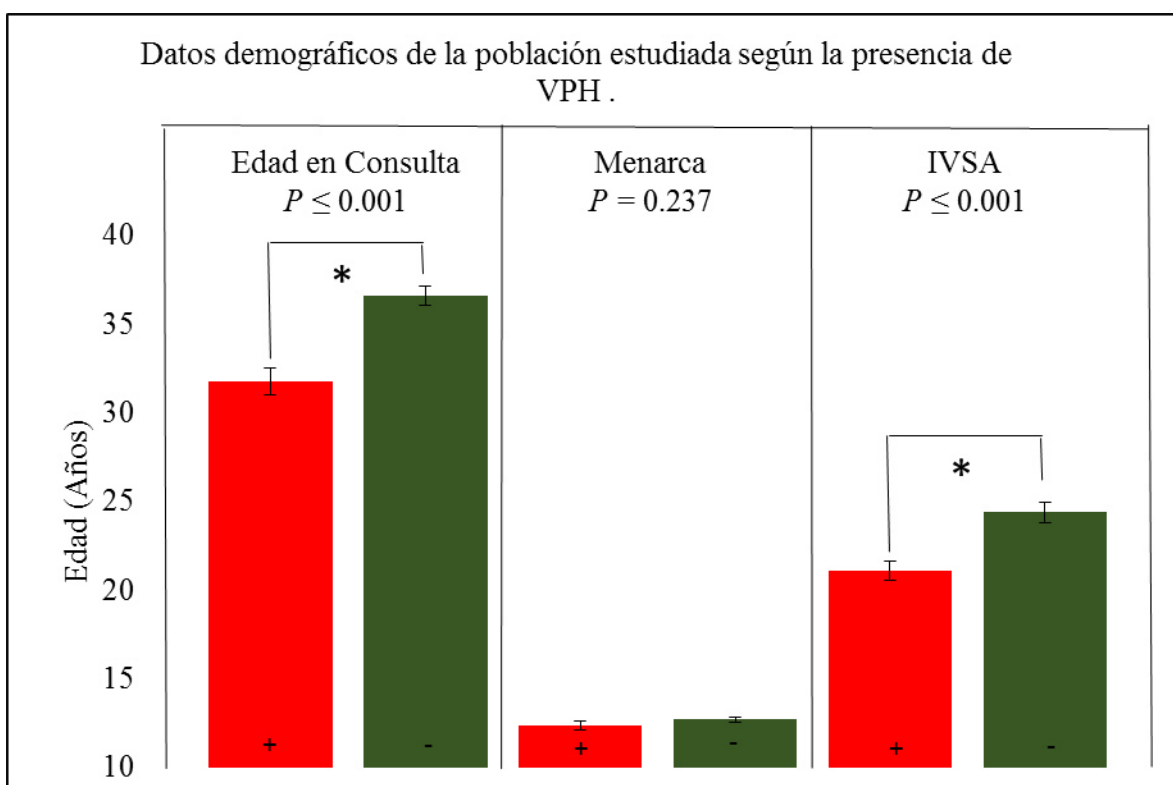


Figura 7.26. Promedios de los datos generales de las pacientes infectadas y no infectadas con VPH y resultado de las pruebas estadísticas. Clave: (+) = Pacientes VPH positivas, (-) = Pacientes VPH negativas, IVSA = Inicio de Vida Sexual Activa, $P = T$ de student, (*) = $P < 0.05$. Las barras de error corresponden al error típico de la media.

Por otra parte las pacientes que reportaban haber acudido a técnicas de reproducción asistida y las que habían recibido estimulación ovárica también resultaron con menor frecuencia del virus, en comparación con las pacientes que no practicaban este tipo de terapias ($P = 0.013$, $P = 0.001$ respectivamente, *exacta de Fisher*) y por último, en las

pacientes que reportaban tener hijos nacidos vivos no hubo diferencia significativa con aquellas que dijeron no tenerlos ($P = 0.458$). En la **Figura 7.27** se muestra un gráfico de asociación entre los datos históricos de infertilidad con la presencia de VPH en las muestras de ECV de las pacientes estudiadas.

Los datos anteriores, también se evaluaron para buscar asociaciones con la infección causada por *Chlamydia trachomatis* (CT). En este caso, la edad de la menarca se encuentra relacionada con la infección, las pacientes que resultaron positivas para la infección por *Chlamydia trachomatis* mostraban tener un promedio de edad más bajo en el momento de su primera menstruación, comparadas con las no infectadas (11.6 años vs 12.73 años, $P = 0.011$, *t de student*). En este caso la edad de las pacientes al momento del estudio, ni el inicio de vida sexual activa jugaban roles importantes en la frecuencia de infección por *Chlamydia trachomatis* ($P = 0.094$ y $P = 0.198$ respectivamente, *t de Student*). Por otra parte, en cuánto a los datos históricos de infertilidad, las pacientes que acuden a técnicas de reproducción asistida y las que reciben estimulación ovárica hormonal presentan una menor frecuencia de padecer una infección por *Chlamydia trachomatis* ($P = 0.004$ y $P = 0.003$, *exacta de Fisher*). No se pudieron encontrar relaciones entre la presencia de *Chlamydia trachomatis* y los embarazos previos ($P = 0.231$) o el tener o no hijos ($P = 0.931$), igualmente para los abortos ($P = 0.502$), en la **Figura 7.28 y 7.29** se muestran los gráficos de comparación de las medias de los datos demográficos de la población y el de asociación entre los antecedentes de infertilidad y la infección por *Chlamydia trachomatis* respectivamente.

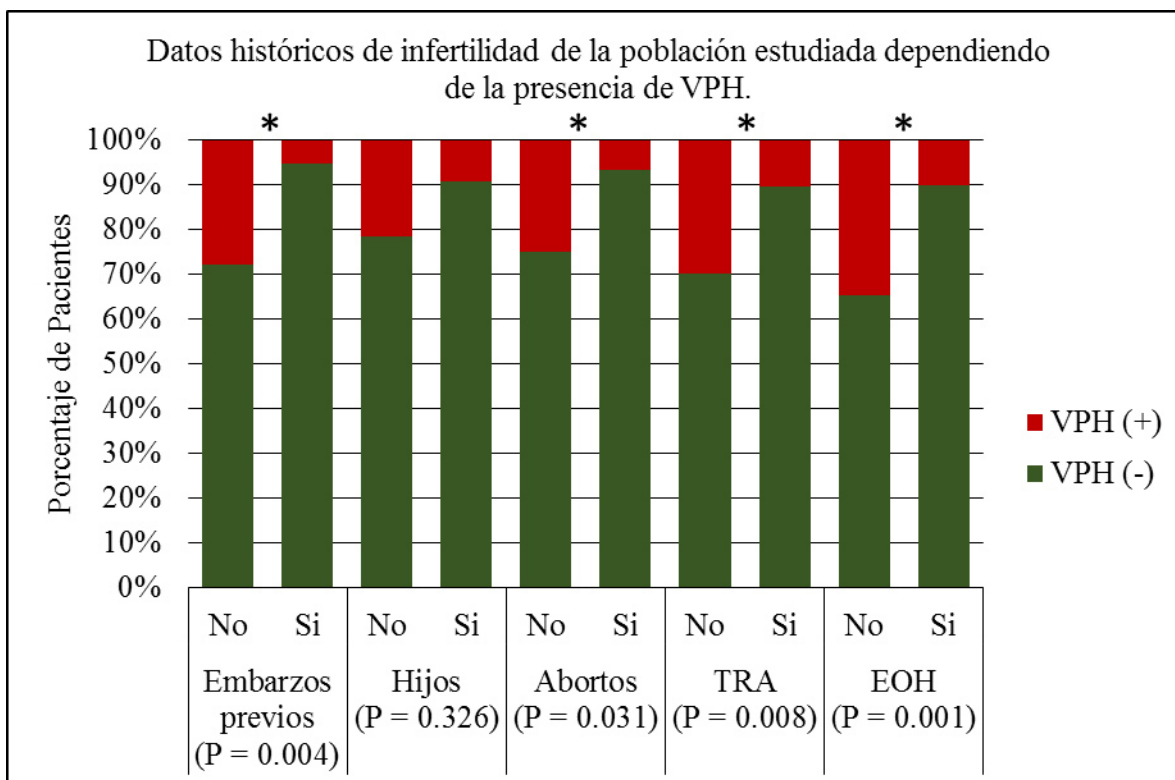


Figura 7.27. Gráfico de asociación entre los datos históricos de infertilidad con la presencia de VPH. Clave: (+) = Pacientes VPH positivas, (-) = Pacientes VPH negativas, TRA = Técnicas de Reproducción Asistida, EOH = Estimulación Ovárica Hormonal, $P = \text{exacta de Fisher} (*) = P < 0.05$.

Otro grupo de muestras analizado en este aspecto fueron aquellas muestras que resultaron positivas tanto para la presencia del VPH como para *Chlamydia trachomatis*, es decir, las que mostraban evidencia de padecer una coinfección, esto con la finalidad de conocer el grado de relación que existe entre los datos generales e históricos de infertilidad con la coinfección por ambos patógenos. En las pacientes de estos casos, los datos generales mostraron estar fuertemente relacionados con la situación de la infección ya que estas pacientes, resultaron ser significativamente más jóvenes al momento del estudio, así como por presentar su primera menstruación a edad más temprana y además comenzar su vida sexual a una edad menor que las pacientes que no presentaban la coinfección por estos

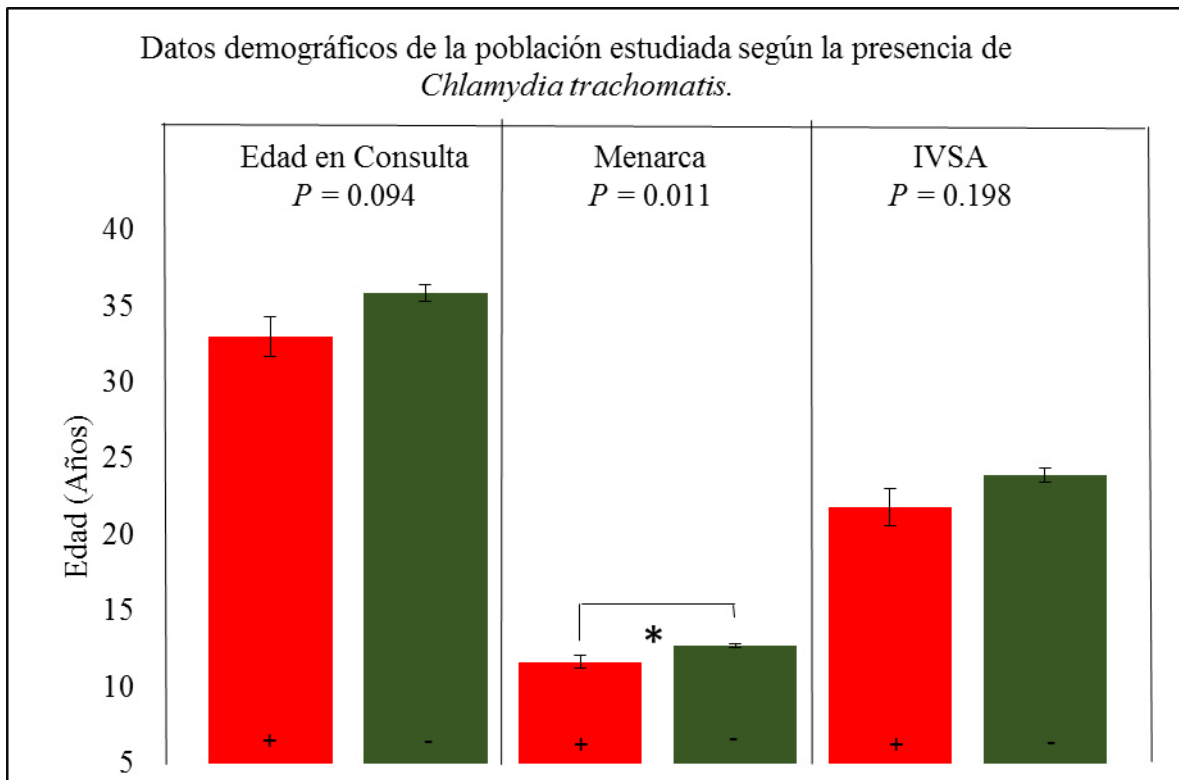


Figura 7.28. Promedios de los datos generales de las pacientes infectadas y no infectadas con *Chlamydia trachomatis* (CT) y resultado de las pruebas estadísticas. Clave: (+) = Pacientes CT positivas, (-) = Pacientes CT negativas, IVSA = Inicio de Vida Sexual Activa, $P = t$ de student. (*) = $P < 0.05$. Las barras de error corresponden al error típico de la media.

patógenos ($P \leq 0.001$, $P = 0.006$ y $P = 0.001$, respectivamente, *t de student*). En cuanto a los datos históricos de infertilidad, se vio que este grupo de pacientes coinfectadas es mucho menos frecuente que acudan a técnicas de reproducción asistida o recibir estimulación ovárica hormonal ($P = 0.005$ y $P = 0.001$, respectivamente, *exacta de Fisher*) y en otros datos como los embarazos previos, el tener hijos o no y los abortos no mostraron asociación o relación con la coinfección por estos dos gérmenes ($P = 0.222$, $P = 0.722$ y $P = 0.411$, respectivamente, *exacta de Fisher*).

En las **Figuras 7.30 y 7.31** se muestra la comparación entre los datos generales de la población dependiendo de la situación de coinfección y el gráfico de asociación de los datos históricos de infertilidad con la presencia o ausencia de la coinfección por estos dos microorganismos, respectivamente.

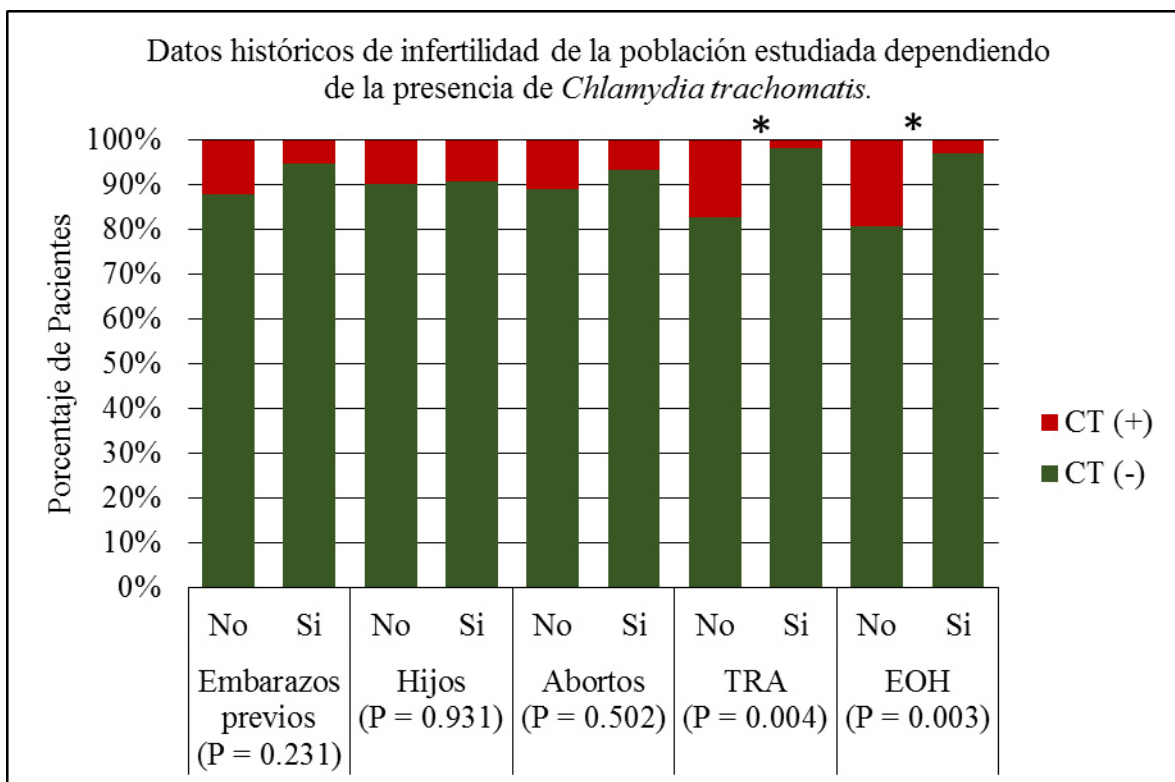


Figura 7.29. Gráfico de asociación entre los datos históricos de infertilidad con la presencia de *Chlamydia trachomatis*. Clave: (+) = Pacientes CT positivas, (-) = Pacientes CT negativas, TRA = Técnicas de Reproducción Asistida, EOH = Estimulación Ovárica Hormonal, *P* = exacta de Fisher, (*) = $P < 0.05$.

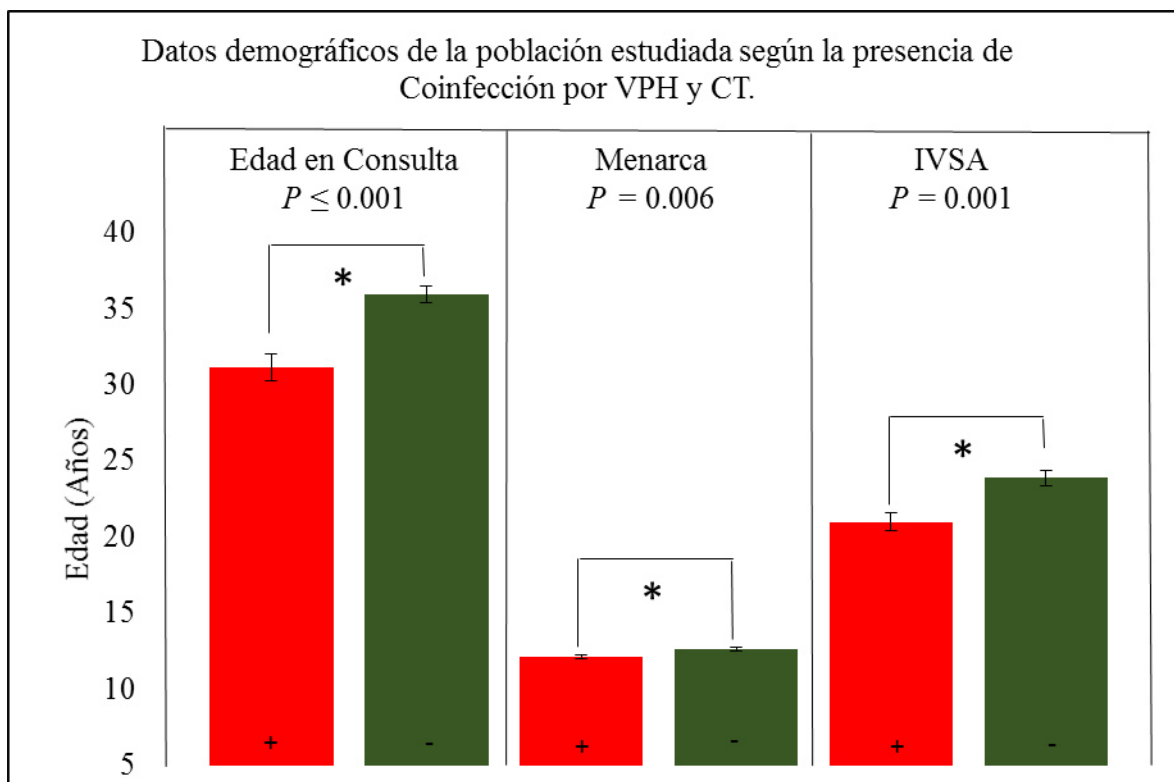


Figura 7.30. Promedios de los datos generales de las pacientes coinfectadas y no coinfectadas con VPH y CT y el resultado de las pruebas estadísticas. Clave: (+) = Pacientes VPH y CT positivas, (-) = Pacientes VPH y CT negativas, IVSA = Inicio de Vida Sexual Activa, $P = t \text{ de student}$, (*) = $P < 0.05$. Las barras de error corresponden al error típico de la media.

Resultados de la relación entre los hallazgos citológicos observados y la presencia del VPH y/o *Chlamydia trachomatis* en los ECV de las pacientes con infertilidad.

En este apartado se realizaron los análisis estadísticos de asociación entre los resultados de los hallazgos observados en las citologías por las 3 técnicas empleadas y los resultados moleculares de la detección de VPH y de *Chlamydia trachomatis*.

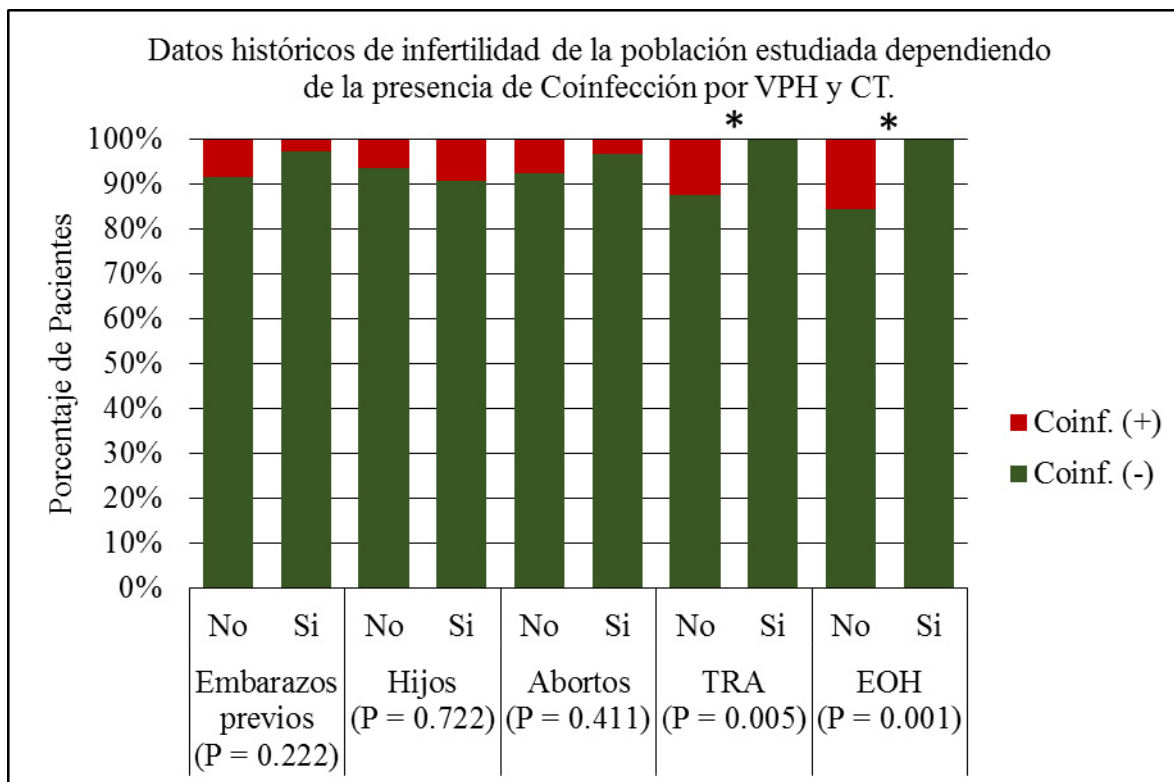


Figura 7.31. Gráfico de asociación entre los datos históricos de infertilidad con la coinfección de VPH y CT. Clave: (+) = Pacientes VPH y CT positivas, (-) = Pacientes VPH y CT negativas, TRA = Técnicas de Reproducción Asistida, EOH = Estimulación Ovárica Hormonal, $P = exacta\ de\ Fisher$. (*) = $P < 0.05$.

Para esto, se utilizaron las pruebas estadísticas con la U de Mann-Whitney, esto debido a que se utilizó el sistema de semi-cuantificación con rangos. Las distribuciones de estos datos resultaron ser no-paramétricas en todos los casos, tanto en los signos citomorfológicos de infección como en la evaluación de elementos microbiológicos. Por otro lado, también se estudió la relación entre los resultados de la citología de Papanicolaou con las pruebas moleculares de detección de ambos patógenos y en estos casos se realizaron pruebas de asociación con la exacta de Fisher.

En los análisis realizados al grupo de muestras positivas para la presencia del VPH se pudo encontrar que existía una presencia disminuida de células epiteliales con bacterias adheridas a su superficie en comparación con las muestras negativas ($P = 0.095$, *U de Mann-*

Whitney), sin embargo, esto no alcanzó el límite mínimo de significación estadística ($P = 0.05$) por lo que solamente se puede catalogar como una tendencia ($P = 0.05 - 0.10$), pero hubo un par de hallazgos que sí pudieron ser observados con mayor abundancia significativamente en las muestras positivas, tales como la coilocitosis ($P \leq 0.001$), es decir, el efecto citopático de la infección por VPH en las células, así como también la presencia de bacterias cocoides agrupadas en placas en los ECV, comparándolas contra aquellas que resultaron negativas para la infección por VPH por pruebas moleculares, en la **Figura 7.32** se ilustra la comparación de los rangos promedios de los hallazgos citológicos significativos observados en estas muestras con el resultado de las pruebas estadísticas.

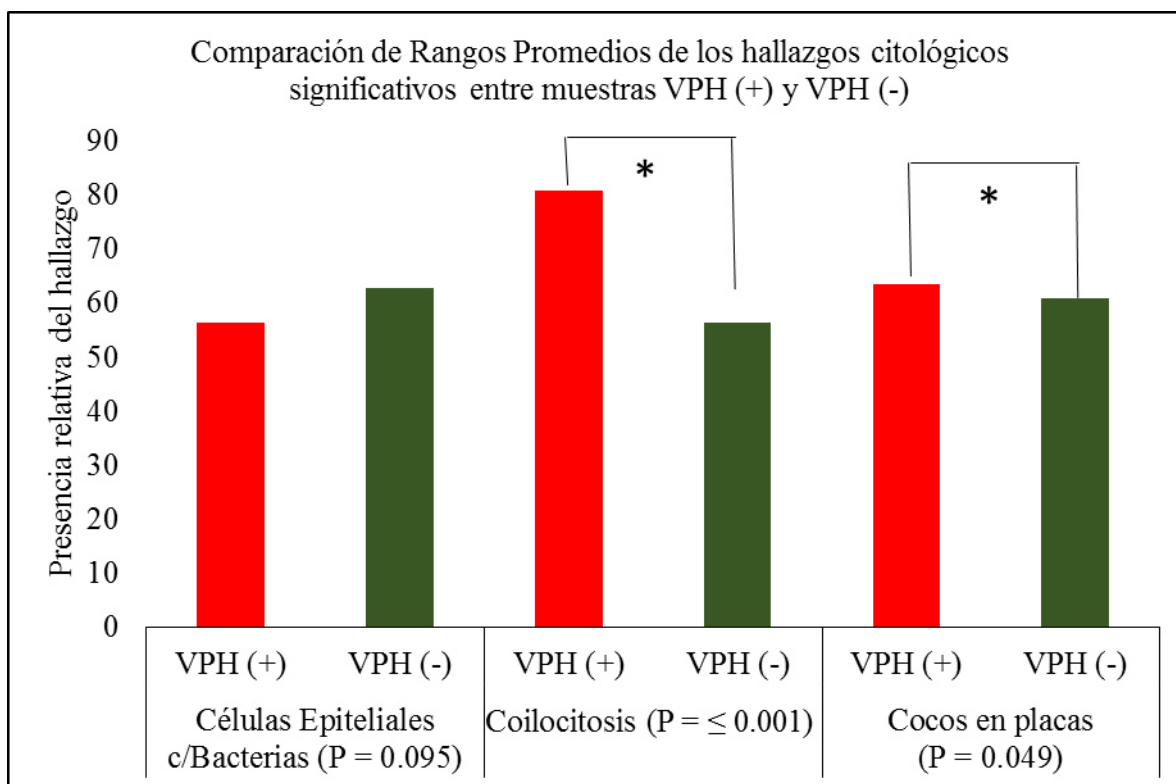


Figura 7.32. Comparación de los Rangos Promedios de los hallazgos citológicos significativos entre las muestras VPH (+) y VPH (-). Clave: (+) = Pacientes VPH positivas, (-) = Pacientes VPH negativas, $P = U$ de Mann Whitney, (*) = $P < 0.05$.

Además, estas muestras positivas para VPH también presentaron una fuerte asociación con el diagnóstico de Papanicolaou Clase I ($P \leq 0.001$, *exacta de Fisher*), ya que se observó que la frecuencia de este último, bajaba drásticamente en el grupo de muestras infectadas, así mismo, el diagnóstico de Papanicolaou Clase III se elevaba significativamente en este mismo grupo ($P \leq 0.001$, *exacta de Fisher*) en comparación de las muestras donde no se encontraba la presencia del VPH. En la **Figura 7.33** se muestra el gráfico de asociación entre los diagnósticos de Papanicolaou dependiendo de los resultados moleculares para la detección de VPH respectivamente.

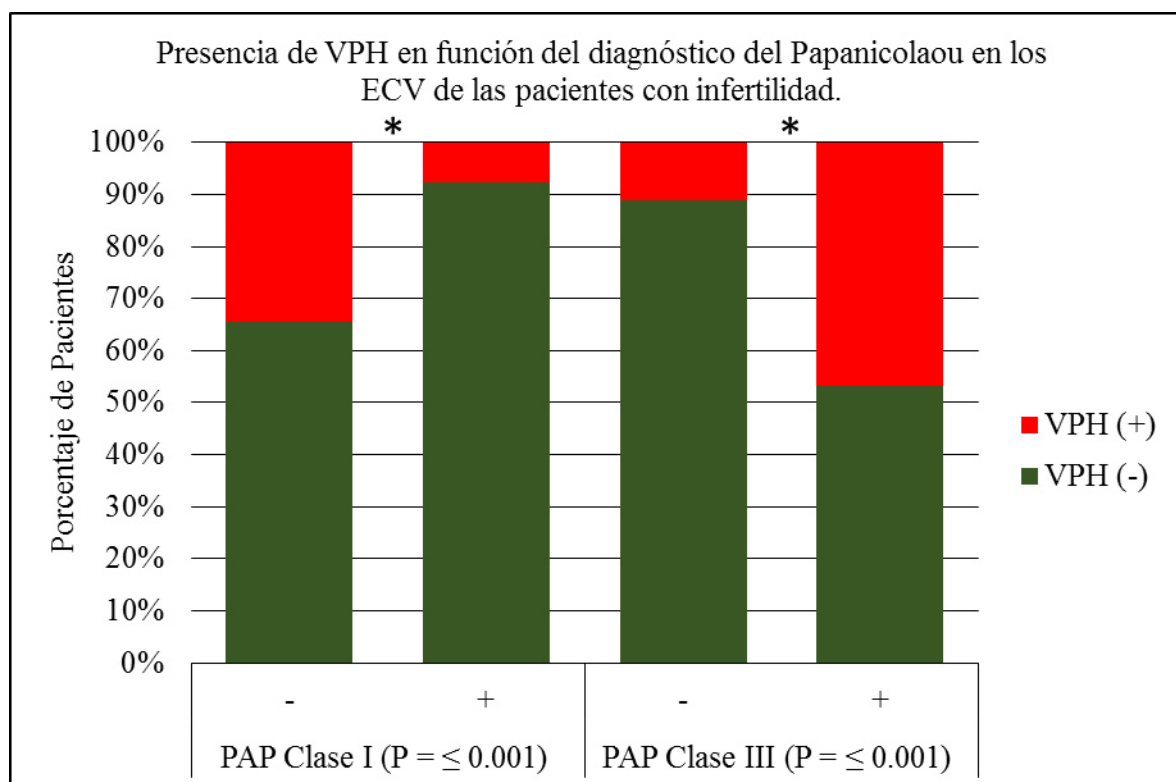


Figura 7.33. Gráfico de asociación entre el resultado del Papanicolaou e infección por VPH. Clave: (+) = Papanicolaou Positivo, (-) = Papanicolaou negativo, $P = exacta de Fisher$. (*) = $P = < 0.05$

En el grupo de las muestras que presentaron un resultado positivo para la detección de *Chlamydia trachomatis* por pruebas moleculares, se pudieron observar diversos hallazgos citomorfológicos de infección relacionados a la infección tales como los detritus celulares ($P = 0.059$, *U de Mann-Whitney*), los cuales mostraban una tendencia a elevarse en las muestras positivas para este patógeno sin embargo, no se pudo establecer una asociación directa, al contrario en el caso de la observación de bacterias bacilares unidas a células epiteliales ($P = 0.054$), donde se mostraba una tendencia a la baja en estas muestras. La coilocitosis ($P = 0.021$) en cambio, si demostró una dependencia directa ya que se encontraba significativamente elevada en las muestras de las pacientes positivas comparadas contra las negativas, de igual manera, las IMCCT ($P \leq 0.001$) también fueron frecuentes en este grupo de muestras. En la **Figura 7.34** se muestra una comparación entre los rangos promedio de los hallazgos significativos asociados a la infección por *Chlamydia trachomatis*.

Finalizando los análisis de relación entre los hallazgos citológicos y los resultados de las pruebas moleculares, se evaluó al grupo de muestras que resultaron positivas para ambos patógenos, es decir, aquellas coinfectadas de VPH y *Chlamydia trachomatis*. En estas muestras coinfectadas, uno de los signos citomorfológicos observados al alza significativamente fueron los detritus celulares, por otra parte, también se pudo distinguir una disminución significativa en la identificación de bacterias bacilares adheridas a células epiteliales, así como un aumento drástico en la observación de IMCCT. Por otro lado, los resultados de Papanicolaou mostraron una asociación directa entre la positividad para la coinfección y la disminución en la frecuencia del diagnóstico de Papanicolaou Clase I. En las **Figuras 7.35 y 7.36** se muestran la comparación entre los rangos promedio de los hallazgos significativos de las muestras coinfectadas comparadas contra las no coinfectadas,

y el gráfico de asociación entre el diagnóstico de Papanicolaou Clase I y las muestras positivas y negativas para la coinfección de estos dos patógenos.

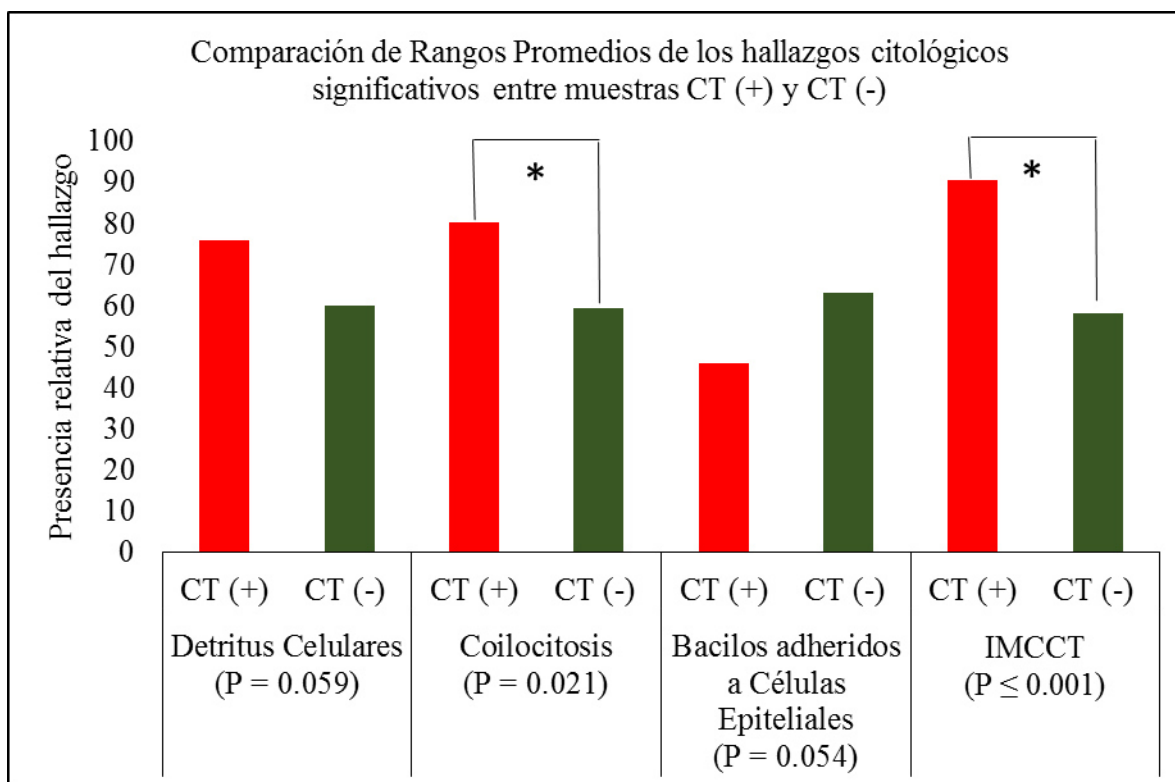


Figura 7.34. Comparación de los Rangos Promedios de los hallazgos citológicos significativos entre las muestras CT (+) y CT (-). Clave: (+) = Pacientes CT positivas, (-) = Pacientes CT negativas, $P = U$ de Mann Whitney, (*) = $P < 0.05$.

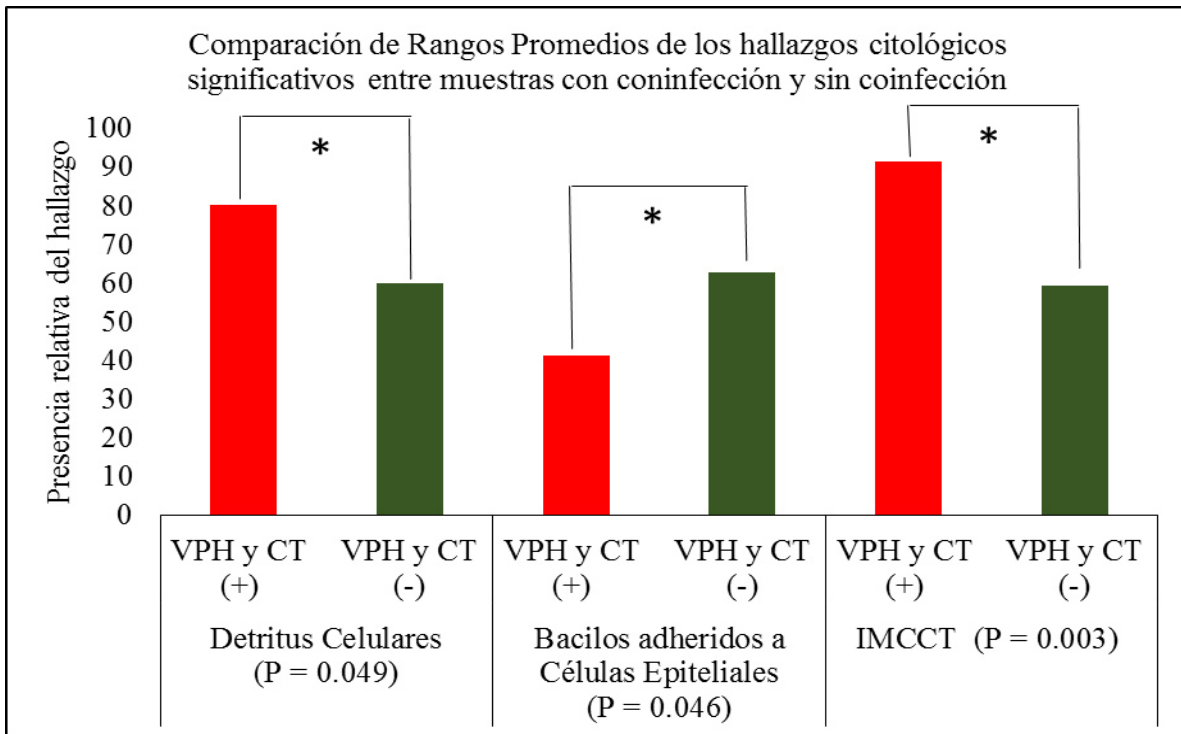


Figura 7.35. Comparación de los Rangos Promedios de los hallazgos citológicos significativos entre las muestras VPH y CT (+) y VPH y CT (-). Clave: (+) = Pacientes VPH y CT positivas, (-) = Pacientes VPH y CT negativas, $P = U$ de Mann Whitney, (*) = $P < 0.05$

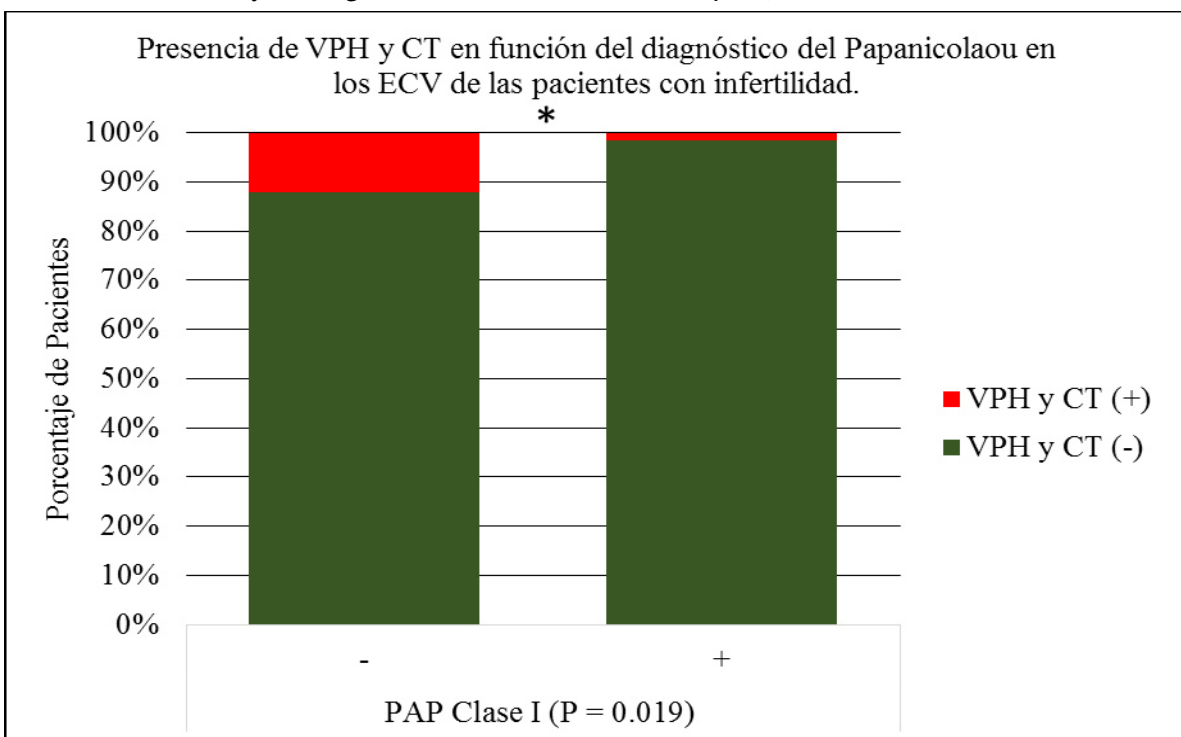


Figura 7.36. Gráfico de asociación entre el resultado del Papanicolaou y la coinfección por VPH y CT. Clave: (+) = Papanicolaou Positivo, (-) = Papanicolaou negativo, $P = exacta$ de Fisher, (*) = $P < 0.05$.

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

En la actualidad, la infertilidad ha cobrado importancia como un problema de salud pública a nivel mundial, repercutiendo en la calidad de vida tanto física como mental de las y los pacientes que la padecen. La mayoría de las veces, el personal clínico se enfoca en, tratar de solucionar los problemas de infertilidad mediante tratamientos empíricos como las técnicas de reproducción asistida o estimulación hormonal, dichos procesos son de muy alto costo y no aseguran el éxito de la concepción ni un recién nacido vivo sano, por lo que observar el problema desde una perspectiva causal para determinar los orígenes puede ser lo mejor para las pacientes.

En este sentido, una de las principales causas del desarrollo de la infertilidad tanto masculina como femenina son las ITS (National Collaborating Centre For Women's and Children's Health, 2013), las cuales cuentan con múltiples factores asociados que pueden incrementar la probabilidad de adquirirlas tales como el bajo nivel socioeconómico, múltiples parejas sexuales o el inicio de la vida sexual a temprana edad (Gates, *et al.* 2015) lo que causa que este tipo de infecciones se encuentren ampliamente distribuidos en la población de edad reproductiva.

En el contexto de la infertilidad femenina, dichas infecciones se relacionan fuertemente con el factor útero-tubárico-peritoneal debido a que la gran mayoría de estos procesos desarrollan una inflamación crónica y sostenida que afecta el funcionamiento correcto del tracto reproductivo superior (Brugo-Olmedo *et al.* 2003).

Se ha visto que a nivel mundial son ocho agentes etiológicos principales los transmitidos por vía sexual, aunque ciertamente, todos estos microorganismos tienen diferencias en cuanto a su infectividad y las patologías que generan en el ser humano. (Fuchs

& Brockmeyer, 2014). De estos ocho microorganismos, el VPH y *Chlamydia trachomatis* han ganado gran interés en el campo de la medicina reproductiva, principalmente por estar altamente esparcidos en la población mundial al ser el primer y segundo lugar en frecuencias a lo largo de varios países (CDC, 2014; Kenyon, *et al.* 2014) por lo que representan un peligro muy tangible hacia la salud reproductiva tanto masculina como femenina.

El VPH primordialmente se ha catalogado como el agente causal del desarrollo de cáncer cérvico uterino (Muñoz, *et al.* 2006), aunque últimamente también se ha encontrado que en algunas poblaciones sobre todo de los países subdesarrollados incluidos entre ellos México se asocia fuertemente a la aparición de problemas reproductivos tanto en el hombre como en la mujer (Souho, *et al.* 2015), aunque actualmente se desconocen las causas exactas de dichas relaciones o la manera en la que el virus repercute en el funcionamiento de los tractos reproductivos.

En cuanto a *Chlamydia trachomatis*, se conoce ampliamente la relación entre la infección persistente y el desarrollo de la enfermedad inflamatoria pélvica, que repercute directamente en infertilidad por factor tubárico o uterino (Briceag, *et al.* 2015). También estudios recientes han relacionado a la bacteria con el VPH en el desarrollo de cáncer, estableciendo una especie de sinergismo en el desarrollo de la patología (Koskela, *et al.* 2000).

Tomando como base lo anteriormente descrito, cada vez se ha vuelto más común que se relacionen estos dos microorganismos cuando se investiga una infección de transmisión sexual, y al ver la relación que ambos patógenos poseen para generar alteraciones reproductivas, es importante que en los pacientes con infertilidad se analice la presencia de estos, con la finalidad de identificar la posible causa de dicha condición y tomar acciones que lleven al mejoramiento de la salud reproductiva de los pacientes.

Uno de los principales problemas de estas infecciones es que suelen cursar como asintomáticas (Malhotra, *et al.* 2013; Moscicki, 2007), es decir, no presentan molestias o evidencias físicas de la presencia de la infección, esto se incrementa estadísticamente en las pacientes del sexo femenino, las cuales terminan siendo las más afectadas por las secuelas de estas infecciones, desarrollando inflamación constante y cáncer cervical por una parte (Sanjose, *et al.* 2010) y por la otra, enfermedad inflamatoria pélvica, lo que origina una serie de patologías como salpingitis, endometritis y obstrucción tubárica, que conducen a la condición de infertilidad (Agrawal, *et al.* 2009).

Debido a la naturaleza asintomática de estas infecciones en las mujeres, el diagnóstico basado en los hallazgos clínicos es poco o nada útil en este tipo de patologías, por lo que se debe recurrir a técnicas de laboratorio especializadas que apoyen en la detección de estos microorganismos para el correcto diagnóstico y manejo de las pacientes infectadas (Fuchs & Brockmeyer, 2014), sin embargo a veces estos estudios especializados pueden tener un alto costo para los pacientes y ciertamente, la población con mayor problema en este tipo de infecciones se encuentra en una baja situación socio-económica (Gaydos & Hardick, 2014).

Las citologías son técnicas muy utilizadas en el campo clínico, principalmente para conocer el contenido celular y acelular que pueda encontrarse en una determinada zona corporal que tenga consistencia líquida o semi-líquida como los epitelios mucosos tal como el cérvix y vagina (Alves de Sousa, *et al.* 2011), cavidades corporales como la pleura (Rossi, *et al.* 2015) o el líquido peritoneal e inclusive líquidos corporales internos como el líquido sinovial (Furman, *et al.* 2015) o el líquido cefalorraquídeo (Kleine, 2015).

El tipo de muestras más utilizado para estudiar las ITS en el tracto genital femenino son los cepillados cervicales o exudados cérvico-vaginales, porque representan dos de las zonas más frecuentes infectadas por este tipo de patógenos (Barouti, *et al.* 2013; Maria, *et al.*

2014), además otra de las ventajas que presenta es que es relativamente simple para los ginecólogos acceder a estas zonas anatómicas, inclusive se han reportado buenos resultados en detección de microorganismos cuando las muestras son tomadas por la misma paciente (Vanderpool, *et al.* 2014) lo que hace ver su fiabilidad y representatividad.

Con el empleo de los exudados cérvico-vaginal, las citologías han sido utilizadas principalmente para evaluar los signos citomorfológicos sospechosos de infección e inflamación y además identificar de ser posible el agente causal de esta. Tradicionalmente se realiza la tinción de Gram, la cual permite distinguir microorganismos patógenos tales como estreptococos del grupo B causantes de una Vaginosis Bacteriana (Adriaanse, *et al.* 1995) o no patógenos como la microflora normal vaginal, dominada principalmente por lactobacilos (Donders, *et al.* 1996) y recientemente también se ha investigado su utilidad para la detección de microorganismos intracelulares como *Chlamydia trachomatis* aunque no demostró ser una técnica aceptable por si sola (Myziuk, *et al.* 2001).

En el caso especial de los métodos de diagnóstico para las infecciones genitourinarias por el Virus del Papiloma Humano y *Chlamydia trachomatis* existen variantes citológicas, inmunológicas, así como moleculares y su aplicación en la clínica depende de la situación particular de cada paciente.

En cuanto a la infección por VPH, la técnica que vino a cambiar el estudio de la citología cervical, fue la citología cervical convencional con la tinción de Papanicolaou, la cual a partir de su implementación hace ya más de cinco décadas, la mortalidad global por cáncer cervical bajó estrepitosamente en un 45% a nivel mundial (Rosa & Mohammadi, 2007), sin embargo la sensibilidad para la detección de anomalías causadas por el virus es baja por sí misma principalmente por problemas en la toma de muestra o procesamiento, lo que habitualmente se incrementa realizando estudios repetitivos a las pacientes, o cambiando

la metodología utilizando la citología en base líquida o capa fina, que elimina en forma significativa las muestras inadecuadas, esto no incrementa la especificidad (Sheary & Dayan, 2005), sin embargo este último método también reduce la capacidad de observar procesos inflamatorios de otra índole como la causada por microorganismos mediante la depleción de componentes celulares como leucocitos, eritrocitos y bacterias. Por otro lado, las pruebas inmunológicas que principalmente detectan anticuerpos sintetizados naturalmente contra las proteínas virales no son de mucha utilidad, debido a que no todas las pacientes desarrollan seropositividad y no presentan una buena correlación con la presencia del ADN del VPH (Wilson *et al.* 2013). Sin duda, el mejor método de detección para la infección por VPH es la amplificación de ácidos nucleicos por medio de la PCR, debido a sus propiedades moleculares, es el método más sensible y específico que se encuentra disponible hasta el momento ya que puede detectar entre 5 y 100 moléculas de ADN viral (Shikova, *et al.* 2009). Sin embargo, su uso ideal es para la identificación de los VPH de alto riesgo cancerígeno con la finalidad de darles seguimiento a las pacientes que los posean, ya que inclusive si la prueba molecular emite un resultado positivo, esto no concluye que la paciente vaya a desarrollar lesiones; es por lo anterior, que se las pruebas ideales de monitoreo son aquellas que pueden distinguir las anomalías celulares, es decir, la citología y si en esta, se observan células sospechosas, se procede a las pruebas moleculares para obtener la evidencia e información completa para avanzar en el tratamiento y cuidado de la paciente. (Mayrand, *et al.* 2007).

Para la detección de *Chlamydia trachomatis* en el tracto genitourinario femenino se han logrado desarrollar también una serie de métodos que tienen distintas propiedades y características.

Uno de los primeros métodos de estudio que se emplearon para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* fue la citología con la tinción de Giemsa, en donde es posible

observar las IMCCT perinucleares de las células infectadas (Yoneda *et al.* 1975), sin embargo esta técnica, al igual que el Papanicolaou con el VPH tiene problemas de sensibilidad y especificidad, debido a la complejidad de la toma de muestra, observación e identificación de las inclusiones (Rafiei Tabatabaei *et al.* 2012). Otra opción muy utilizada ampliamente a nivel clínico, son las pruebas inmunológicas que detectan antígeno o anticuerpos, aunque se ha debatido mucho sobre la utilidad de estas en el diagnóstico debido a que existen muchas variantes de las metodologías y los anticuerpos utilizados para la detección, siendo unas más efectivas que otras. (Chernesky, *et al.* 1998), las proteínas antigénicas más empleadas en este tipo de ensayos son la proteína mayor de membrana externa, sin embargo, se han llegado a reportar reacciones cruzadas en algunas pruebas con *Chlamydia pneumoniae* y *Parachlamydia acathamoebae* aunque algunos kits comerciales se han logrado mantener con parámetros de sensibilidad y especificidad adecuados para su fin (Baud, *et al.* 2010). Anteriormente el cultivo celular para la determinación de *Chlamydia trachomatis* era catalogado como el “estándar de oro” aunque ciertamente presentaba muchas complicaciones para los laboratorios clínicos lograr implementarlo como técnica diagnóstica además de ser muy caro, de lenta respuesta y necesitar de condiciones especiales (Hajikhani, *et al.* 2013), por lo que recientemente con el advenimiento de las técnicas moleculares, estas se han ganado el puesto debido a su alta sensibilidad y especificidad para detectar la presencia de la bacteria en los especímenes cervicales de manera rápida y concreta (Loeffelholz, *et al.* 1992), sin embargo, con el uso de estos métodos no se puede discernir la intensidad de la inflamación ni conocer el estado histopatológico de la paciente ni saber si la infección se encuentra en una fase aguda, latente o persistente, ni mucho menos asociarla con otros microorganismos que probablemente se encuentren coinfectando estas zonas.

Uno de los principales problemas con las técnicas moleculares es su baja disponibilidad para los pacientes, especialmente de los países en vías de desarrollo como México. Esto se debe esencialmente a que los equipos y reactivos utilizados en este tipo de ensayos son de alto costo y la gran mayoría de los sectores afectados por estas infecciones tienen un desarrollo socio-económico bajo (Ortayli *et al.* 2014). Las ITS, particularmente las causadas por VPH y *Chlamydia trachomatis* son muy comunes, por lo que es necesario métodos confiables para el muestreo de población en masa, que sean favorables desde el punto de vista costo-efectividad para la prevención de enfermedades con secuelas que conlleven a un gasto mayor para el sector salud. Diversos estudios han mostrado que para este tipo de infecciones las citologías cervicales, son muy útiles al actuar como un filtro que evalúa y descarta aquellos casos que no necesiten el uso de una prueba molecular más específica, por lo que se ha logrado concebir una sinergia diagnóstica entre estas dos técnicas (Malhotra *et al.* 2013; Mayrand *et al.* 2007).

Debido al alto impacto que causan las infecciones genitourinarias causadas por el VPH y *Chlamydia trachomatis* en las pacientes con problemas reproductivos o infertilidad, y en vista de las deficiencias que presentan las técnicas citológicas de rutina en el rastreo de estas infecciones, nuestro grupo de trabajo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León desarrolló una herramienta de análisis citológico para el monitoreo de ITS tales como el VPH y *Chlamydia trachomatis*, especialmente aplicada en muestras de pacientes con infertilidad, pero extrapolable a población en general (Alvarez Cuevas, 2012; Ramos Gonzalez *et al.* 2011).

La meta del presente estudio, fue la validación sistemática y caracterización de los parámetros de valor diagnóstico (Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos) que esta nueva técnica citológica presenta para la detección de las infecciones causadas por VPH y

Chlamydia trachomatis en las pacientes con infertilidad, con la finalidad de compararla en este sentido contra las citologías utilizadas cotidianamente. Además, otro de los objetivos, fue estudiar los datos generales de la población, así como los signos citológicos que se asocien a la presencia de estos microorganismos para la búsqueda de patrones que hagan sospechar de este tipo de infecciones en esta población en particular.

Uno de los aspectos importantes a considerar para lograr una validación correcta de un estudio diagnóstico es la selección de los participantes y el tipo de muestra, basándonos en datos de estudios anteriores publicados por Zuo y colaboradores (Zuo *et al.* 2011) y por De Haro-Cruz y colaboradores (De Haro-Cruz *et al.* 2011) realizados en mujeres infértiles que investigaron la presencia de VPH y *Chlamydia trachomatis* respectivamente, se pudo determinar que el número de muestras mínimo para dar validez y representatividad al estudio era de 98, en el presente trabajo se lograron recolectar 122 muestras de pacientes con infertilidad. De manera similar a otros estudios sobre la presencia de ITS causada VPH y *Chlamydia trachomatis* en mujeres infértiles (De Haro-Cruz *et al.* 2011; Perino *et al.* 2011) decidimos utilizar muestras de cepillado cervical y exudado cérvico – vaginal para el estudio de la presencia de estos microorganismos y el análisis citológico pertinente.

Las pacientes incluidas en este estudio presentaron un promedio de edad de 35.96 años al momento de la consulta por infertilidad, valores promedios de edad similares al obtenido ha sido anteriormente reportado en otros estudios realizados con grupos de pacientes infértiles (Hajikhani *et al.* 2013; Lei, *et al.* 2015). Generalmente se acepta que estas pacientes tienen edades elevadas debido a que cuando se presentan estos problemas estas pacientes no le dan la suficiente importancia, además que es difícil enfrentar la situación psicológica y romper los tabús sociales (Suneeta *et al.* 2012), aunque cabe destacar que existen otros estudios con pacientes infértiles realizados en países de muy bajo desarrollo, donde las

condiciones higiénicas y de sanitación públicas son muy deficientes donde se reportan edades de 27 o 28 años como promedio (Nnadi, *et al* 2014) lo que hace de esto una condición importante en el desarrollo de la infertilidad.

Por otro lado, un estudio reciente, muestra una cierta tendencia a que mientras mayor sea la edad en la que se presenta la menarca, mayores son las probabilidades de padecer condición de infertilidad (Guldbrandsen *et al.* 2014), dicho estudio considera la edad de 13 años como normal se contrapone al resultado obtenido de nuestra población ya que se obtuvo una media de 12.61 años en este aspecto con pacientes con infertilidad, sin embargo no se consideraron mujeres con infertilidad no tratada o con tratamiento sin éxito, además de que el factor masculino tampoco se involucró, por lo que puede no ser el mismo comportamiento en la población analizada en el presente estudio.

Al igual que en el nuestro estudio, en otros diversos trabajos que se han realizado en poblaciones de mujeres infértiles, el inicio de la vida sexual es un dato importante para predecir el riesgo que las pacientes tienen de adquirir una infección de transmisión sexual, en este sentido, estudios recientes han demostrado que mientras menor sea la edad del inicio de vida sexual activa, las mujeres serán más propensas a desarrollar problemas de salud reproductiva en el futuro (Magnusson & Trost, 2006), así como también tienen una mayor probabilidad de adquirir una ITS (Li *et al.* 2014).

Las mujeres que desarrollan problemas de infertilidad, suelen tener datos muy específicos en el aspecto reproductivo, la mayoría de estas poblaciones presenta un número bajo de mujeres que cuentan con hijos nacidos vivos como resultado de un embarazo exitoso lo cual ronda entre un 10 y 25% en este grupo de pacientes, (Kessler *et al.* 2013) las mujeres estudiadas en este proyecto presentaron un valor de 11.7%, el cual es muy similar a los reportes previos en este tipo de poblaciones.

En el grupo de estudio se observó una dominancia de la infertilidad de tipo primaria, es decir aquellas que no han logrado tener ningún embarazo previamente (Evers, 2002) con un 61.7% de las pacientes, mientras que en el 38.3% de estas se manifiesta infertilidad secundaria, las cuales han estado previamente embarazadas pero ahora no pueden (Evers, 2002), en otros estudios en pacientes infértiles como el de Al-hassan y colaboradores se muestra un predominio de la infertilidad secundaria (Al-hassan, *et al.* 2014), este dato en especial suele variar mucho dependiendo de la situación en particular de la población estudiada, en la nuestra, más de la mitad de las pacientes eran de reciente consulta y tratamiento, por lo que es más probable que no hayan tenido concepciones previas. El porcentaje de abortos espontáneos también es un dato recurrente en dichas pacientes ya que crece significativamente hasta en 45% según reportes previos (Barco Díaz, *et al.* 2013) en nuestro estudio el 30% de las pacientes reportaron este hecho, un número relativamente más bajo probablemente debido a la poca tasa de embarazo que presentaron nuestras pacientes. Naturalmente al estar expuestas a esta dificultad en la concepción y el embarazo a término, estas pacientes recurren más frecuentemente a TRA como estimulación ovárica o fertilización *in vitro*, sin embargo, suelen tener poco éxito en estos tratamientos, nuestro grupo de trabajo mostró que un 43.3% de las pacientes había recibido una TRA previamente, un número levemente menor que el 52.6% reportado por Kessler y colaboradores en su estudio con pacientes infértiles Estadounidenses, esta diferencia se da principalmente por las diferencia en el estatus socioeconómico entre una población y otra, ya que se ha demostrado que las parejas que tienen mayores ingresos, gastan más en este tipo de tratamientos (Smith *et al.* 2011). Al resumir todo lo anterior y analizar este conjunto de características y afecciones particulares, podemos decir con certeza que la población de estudio en este proyecto pertenece a un grupo de mujeres con problemas reproductivos, es decir, infértiles.

Como se mencionó anteriormente, las citologías del tracto reproductivo femenino inferior son muy útiles cuando se busca investigar la presencia de signos de inflamación que puede estar causada por infecciones transmitidas por vía sexual, por lo que el análisis de los resultados en este contexto es muy importante para encontrar factores que se asocian a las ITS que provocan o se relacionan con la infertilidad.

La inflamación es un proceso biológico que regula los efectos tisulares que ocurren cuando existe un reto inmunológico, tales como vasodilatación, hiperemia, edema, infiltrado celular inflamatorio o colagenólisis que se llevan a cabo bajo una fina red de conexiones moleculares (Boots, 2015). Uno de los signos de inflamación más comunes durante las infecciones microbiológicas es la elevación de células inflamatorias, tales como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos o linfocitos, proceso mejor conocido como “Leucocitosis”, el cual ha sido ampliamente relacionado con la presencia de patógenos de transmisión sexual (Fuchs & Brockmeyer, 2014). Las citologías cervicales han sido ampliamente utilizadas para inspeccionar la situación inflamatoria de la zona urogenital de las pacientes, ya que ayuda a discernir en base a la morfología, el infiltrado celular inflamatorio presente y se ha encontrado que existe una buena correlación entre estas observaciones con infecciones activas en las pacientes analizadas (Kelly & Black, 1990). En este aspecto, al momento de la evaluación citológica de los ECV del grupo de mujeres estudiado se encontraron niveles elevados de leucocitos polimorfonucleares en el 12.3% de las muestras, el cual es una cifra alta si la comparamos contra el 5% que se reporta comúnmente en población abierta (Kelly & Black, 1990) pero por el contrario, queda por debajo cuando se equipara con investigaciones realizadas en pacientes infértiles donde este proceso se observa entre un 20 – 30 % (Al-Jaroudi & Hussain, 2010; Nnadi *et al.* 2014), aunque cabe destacar que estos reportes son en pacientes de medio oriente y del norte de África, donde tradicionalmente

existen menos recursos de salud para estas pacientes por lo que son más propensas a desarrollar infecciones, y que además, en el presente no existen reportes de este tipo de información en pacientes infértiles mexicanas. Pasando a otra estirpe celular de la línea inflamatoria tenemos los macrófagos, los cuales son los encargados de diversas funciones como el reconocimiento antigénico, proliferación celular inflamatoria, actividad fagocítica y microbicida de los antígenos además de la reparación del tejido infectado (Zhang & Wang, 2014), típicamente este tipo celular se encuentra muy escaso en los exudados cérvico – vaginales ya que los leucocitos PMN tienen una dominancia en el control de la infección, existen reportes en pacientes infértiles donde se observaron aumentados los niveles de estas células inflamatorias en aproximadamente el 7% de las pacientes (Wah, *et al.* 1990), en nuestro estudio, los macrófagos fueron observados en cantidad elevada en el 4.9% de los casos, el cual es un valor muy similar al anteriormente reportado en este tipo de pacientes. Otros de los parámetros que indican la presencia de una respuesta inflamatoria en el tracto reproductivo femenino son los eritrocitos que se relacionan con eritema y fragilidad capilar y los detritus o restos celulares que se asocian a la erosión cervical, en conjunto estos son signos potenciales de anormalidad cervical (Casey, *et al.* 2011; Rivera, *et al.* 1996). En este sentido, Guerra Infante y colaboradores estudiaron la frecuencia de anormalidades cervicales en mujeres infértiles encontrando friabilidad cervical, eritema y erosión cervical en el 8.7%, 5.5% y 9.1% respectivamente (Guerra-Infante *et al.* 2003), en nuestras observaciones, la presencia de eritrocitos se detectó en el 5.7% de los casos, mientras que el análisis de los detritus celulares arrojaron una presencia elevada de estos en el 4.9% de las pacientes, encontrando una cierta relación con la existencia de las anormalidades mencionadas, sin embargo, dichas observaciones no son suficiente evidencia para aseverar la presencia o

ausencia definitiva de estas anormalidades, por lo que necesitan ser confirmadas mediante la observación ginecológica en el momento de la toma de la muestra.

Además de los elementos celulares y acelulares asociados a inflamación, existe otro factor determinante que se evalúa para conocer si dicha inflamación está causada por la infección de patógenos microbiológicos o tiene otro origen, ya que se ha encontrado una estrecha relación entre la presencia de estos gérmenes con la generación de una respuesta inmune, la cual es apreciable en las citologías (Barouti *et al.* 2013) mediante la observación detallada y cuantitativa de estructuras bacterianas y fúngicas. En condiciones normales, la mucosa vaginal y cervical posee una noble microbiota dominante en lactobacilos que le provee de diversas características particulares a esta zona que le confieren protección a infecciones y un ambiente saludable para la buena reproducción e interacción celular (Mastromarino *et al.* 2014), cuando existe una disrupción en el equilibrio de las especies que componen esta microflora se produce un proceso llamado Vaginosis bacteriana, donde los lactobacilos dejan de reproducirse y dan paso al crecimiento de bacterias anaerobias (Brotman, *et al.* 2010). Se ha visto que este cambio trae consigo una serie de complicaciones como la producción de una respuesta inmune, cambios en los niveles de citocinas o alteración del ambiente endocrino e inmunomodulador al momento de la implantación y desarrollo embrionario (Borovkova *et al.* 2011), así como también se le ha encontrado relacionado con el desarrollo de enfermedad inflamatoria pélvica y por lo tanto infertilidad por factor tubárico (Taylor, *et al.* 2013). Existen reportes recientes que estiman la prevalencia de la Vaginosis Bacteriana en un 19% en poblaciones de mujeres infértiles (van Oostrum, *et al.* 2013). En el análisis citológico realizado en nuestro grupo de estudio, esta entidad pudo ser identificada en el 19.7% de las pacientes tomando como criterio la cantidad abundante de bacterias no típicas de microflora, lo que representa una similitud muy estrecha entre nuestra población y

los resultados reportados previamente en poblaciones de mujeres infértiles. Por otro lado, en las infecciones fúngicas del tracto genital femenino especies del género *Candida* son las más frecuentemente aisladas, inclusive en las pacientes infértiles (Verghese *et al.* 2001) aunque no se ha encontrado una relación clara entre estas condiciones. Existen trabajos de investigación realizados recientemente con mujeres infértiles, donde se ha encontrado una prevalencia que va desde el 5% hasta el 12%, dependiendo del método de detección y de la población estudiada (Almobarak *et al.* 2013; Casari, *et al.* 2010; Verghese *et al.* 2001), de manera similar a estos reportes, en nuestro grupo de estudio las citologías mostraron la prevalencia de estructuras fúngicas como levaduras y pseudohifas fue de un 4.9% de las muestras en cantidad suficiente para representar una infección fúngica, sin embargo se requieren estudios moleculares para distinguir la especie y el género de estos microorganismos.

Un tercer indicador citológico que se asocia a inflamación o a infecciones son los cambios que se producen en la arquitectura citoplasmática y nuclear de las células nativas del tejido que se analiza, proceso llamado metaplasia, estos cambios están relacionados como una respuesta hacia estrés celular, tal como la inflamación ya que alteran el metabolismo celular normal y se revierte cuando se retira ese estímulo agresor (Abbas & Robbins y Cotran, 2007). Cuando dicho estímulo agresor continúa durante un tiempo prolongado, las células sufren una modificación irreversible en su ADN, causando alteraciones en el proceso de maduración y modificando su morfología y función normales, este proceso se conoce como displasia (Abbas & Robbins y Cotran, 2007) y puede causar hiperplasias o neoplasias, provocando lesiones preneoplásicas o precancerosas.

Una herramienta muy utilizada para identificar los cambios celulares metaplásicos, displásicos y neoplásicos es la clasificación establecida por Papanicolaou que se basa en la

morfología citoplasmática y nuclear para establecer parámetros distintivos de estos procesos (Papanicolaou, 1954). Dicha clasificación cuenta con 5 diferentes rangos que van desde células normales, a displasia severa con cambios definitivos que indican malignidad, este método es empleado para la descripción citológica de las muestras, más que para realizar una correlación histopatológica de las lesiones (Rosa & Mohammadi, 2007), por lo tanto fue la indicada para usarse en este trabajo.

Respecto a la primera categoría (Clase I), que indica normalidad en las células sin signos de metaplasia, en diversos trabajos de investigación realizados en pacientes con infertilidad se han reportado rangos que van desde un 36% hasta un 68% de las pacientes (Al-Jaroudi & Hussain, 2010; Nnadi *et al.* 2014). En nuestro grupo de trabajo este resultado se observó en el 53.3% de las muestras, en la segunda categoría (Clase II) donde se identifican procesos metaplásicos causados por inflamación inespecífica, diversos reportes indican una frecuencia que va desde el 22.8% hasta un 36.6% de las pacientes infértiles (Al-Jaroudi & Hussain, 2010; Nnadi *et al.* 2014) mientras que en nuestro estudio se pudo distinguir en el 20.5% de las pacientes. En cuanto a la tercera categoría (Clase III), que engloba los cambios metaplásicos atribuibles a la infección por VPH y las lesiones intraepiteliales de bajo grado, Nnadi y colaboradores en pacientes Nigerianas infértiles reportaron estos hallazgos en un 22.6% de las muestras (Nnadi *et al.* 2014); sin embargo otros reportes en poblaciones similares mencionan una frecuencia más baja de esta entidad, tal como Al Jaroudi y colaboradores y Almobarak y colaboradores que observaron esto en un 2.9% y 6.5% respectivamente (Al-Jaroudi & Hussain, 2010; Almobarak *et al.* 2013). En nuestro grupo de estudio estos hallazgos se lograron distinguir en un 26.2% de los casos, de manera similar al trabajo de Nnadi y colaboradores nosotros tampoco empleamos una comparación con población saludable pareada por edad, a comparación de los trabajos de Al Jaroudi y

Almobarak, donde si lo hacen, estas diferencias en los resultados también pueden deberse a fallas en la especificidad de la interpretación al momento del análisis o defectos en la preservación o procesamiento de la muestra.

Como se mencionó anteriormente, la inflamación es un proceso biológico complejo que comprende diversas etapas y desarrolla una gama amplia de reacciones, interacciones y conexiones fisiológicas a nivel celular y molecular. Una de las asociaciones más estudiada es la estrecha relación funcional que poseen las células del sistema inmunitario (mayoritariamente, Leucocitos PMN y macrófagos), ya que se ha observado que mantienen una comunicación constante mediante la secreción de citocinas y quimiocinas, que conllevan a la resolución de una infección (Ethuin *et al.* 2004). Existen estudios que muestran la sincronía funcional de estas, elevándose en cantidad y actividad para responder en conjunto a un reto inmunológico (Newson *et al.* 2015; Wang, *et al.* 2008). En nuestro estudio, también se encontró esta asociación, ya que se observó una relación directamente proporcional entre la cantidad de macrófagos y la de los PMN en las muestras de las pacientes, de manera similar, la abundancia de los eritrocitos observados en los ECV mostraba una dependencia directa de la cantidad de PMN y de macrófagos, es decir se encontraba estrechamente relacionado al grado de inflamación presente en las muestras. Esto también se encuentra perfectamente descrito en diversos trabajos que contemplan las hemorragias presentes en episodios de inflamación debidas a fenómenos como la extravasación eritrocítica o la fragilidad capilar (Del Zoppo, 1997; Zander, 1937).

La inflamación se ha visto frecuentemente relacionada con las infecciones por microorganismos, hablando específicamente de aquellas que infectan al tracto reproductivo femenino, reportes muestran la fuerte correlación que existe entre la elevada cantidad de células inflamatorias cuando algún patógeno se encuentra presente en el epitelio vaginal o

cervical (Barouti *et al.* 2013; Kelly & Black, 1990). En nuestro estudio, también se logró encontrar una asociación directa entre la cantidad de bacterias de morfología bacilar y de levaduras en relación a la cantidad de PMN, estableciendo un vínculo entre la presencia de microorganismos y la inflamación observada.

En conjunto, todos los resultados citológicos obtenidos del grupo de pacientes estudiado, nos permiten afirmar que las pacientes que padecen infertilidad se encuentran frecuentemente afectadas por infecciones del tracto reproductivo, además que constantemente cursan con signos inflamatorios asociados a patógenos, dichas características han sido encontradas en otras poblaciones de mujeres infértiles del mundo (Al-Jaroudi & Hussain, 2010; Almobarak *et al.* 2013; Nnadi *et al.* 2014). Por lo que de acuerdo a nuestros hallazgos recomendamos ampliamente el empleo de las revisiones rutinarias de las mujeres pertenecientes a este sector poblacional a nivel clínico y de laboratorio, y en este sentido, desarrollar un monitoreo del estado de salud reproductivo eficiente con vías de mejorar la calidad de vida en estas pacientes.

En nuestro país, los principales problemas a los que se enfrenta el sistema de salud son la falta de recursos económicos que impide proveer de servicios de salud a toda la población, esto aunado al poco interés de la población para acudir a revisiones periódicas, ya sea por falta de conocimiento de estas infecciones o por dificultades financieras provoca que las tasas de incidencia y prevalencia de las infecciones de transmisión sexual sigan elevadas (Magaña-Contreras *et al.* 2015).

Como se mencionó anteriormente en este documento, las ITS que afectan a las mujeres, muchas veces suelen pasar desapercibidas debido a su naturaleza asintomática, provocando que muchos casos de infección progresen a desarrollar consecuencias más graves e inclusive

mortales, como es el caso del cáncer cérvico-uterino (Fuchs & Brockmeyer, 2014; Malhotra *et al.* 2013).

En vías de mejorar la detección oportuna de este tipo de infecciones, se necesitan métodos de laboratorio de monitoreo que ayuden al personal a identificar con mayor rapidez y facilidad los signos y síntomas provocados por estas, además de percibir las alteraciones macro y microscópicas de los órganos o tejidos involucrados.

En este sentido, cualquier método de detección nuevos que se cataloguen como “diagnósticos” ya sean citológicos como es nuestro caso, inmunológicos o moleculares, deben ser validados o comprobados por un método establecido y certificado previamente, de preferencia aquel que haya mostrado el mayor valor diagnóstico (Estándar de oro), es decir, se utilizan las mismas muestras obtenidas para los análisis con ambos métodos y se interpretan los resultados para evaluar la correlación entre ellos para determinar la fiabilidad de la prueba que se propone. (Heideman *et al.* 2011; Salazar-Piña *et al.* 2016).

Para lograr una validación estadística de la CIFAR – CF para la detección de VPH y *Chlamydia trachomatis*, al igual que en muchos estudios en los que se realiza la validación para la detección de estos patógenos se suelen utilizar como métodos de referencia aquellos basados en técnicas moleculares, como la amplificación de ácidos nucleicos por la PCR, ya que por su alta sensibilidad y especificidad está considerado como el “estándar de oro” para la detección de estos dos microorganismos. (Ferrecio *et al.* 2003; Marashi, *et al.* 2014).

En el caso de la detección de VPH por medio de PCR, el par de cebadores más utilizados globalmente son llamados MY09 y MY11 que flanquean una secuencia de 450 pares de bases de una región hipervariable perteneciente a la proteína L1 del Virus (Aedo A *et al.* 2007; Shikova *et al.* 2009). Además de los buenos rendimientos que presenta esta técnica, una de las grandes utilidades de amplificar con este sistema es la adaptabilidad que

su producto posee para la técnica de genotipificación por medio de polimorfismos en los fragmentos de restricción (Santiago, *et al.* 2006). Por otra parte, para la identificación molecular por PCR de *Chlamydia trachomatis* se han utilizado una gran variedad de cebadores que muestran tener buenos rendimientos en los valores diagnósticos en la clínica (Loeffelholz *et al.* 1992), uno de los pares de cebadores más empleados son los KL1 y KL2 que amplifican un marco abierto de lectura del plásmido críptico que se encuentra básicamente en todas las subespecies de *Chlamydia trachomatis* ya que provee a la prueba un valor muy alto de sensibilidad y especificidad en las condiciones adecuadas (Santos, *et al.* 2003). Otro método que anteriormente se utilizaba como confirmatorio para *Chlamydia trachomatis* es la identificación de la bacteria mediante IFD que emplea anticuerpos específicos complementarios a la proteína mayor de membrana externa de 14 serotipos de *Chlamydia trachomatis* (Marashi *et al.* 2014) pero ha sido desplazada por los métodos moleculares ya que estos últimos poseen mayor sensibilidad y especificidad (Nelson & Helfand, 2008).

Desde que se inició el uso de técnicas moleculares que emplean el ADN, se requirió de análisis que asegurarán la calidad, y que la cantidad de esta molécula fuera la adecuada para llevar a cabo los estudios con un nivel de confianza aceptable y además para controlar que los reactivos utilizados posean buena calidad. La mayoría de los trabajos de investigación utilizan para estos fines la amplificación de un gen control, es decir, uno que se conoce que siempre estará presente si hay ADN, en el caso del humano, el más empleado es el gen que transcribe la cadena β de la proteína Globina (Saiki *et al.* 1988), por lo que se decidió trabajar con este sistema. En el presente trabajo, las 122 muestras analizadas molecularmente para la presencia del VPH y de *Chlamydia trachomatis* mostraron un resultado positivo para la

presencia del gen control de β – Globina, lo que le provee de validez a dichos estudios realizados.

Como ya se ha mencionado antes, el VPH es uno de los patógenos de transmisión sexual más frecuentes a nivel mundial, inclusive se estima que el 80% de las mujeres sexualmente activas contraerán la infección alguna vez en su vida (Vinodhini, *et al.* 2012). Por otra parte, estudios muestran que las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* también presentan una frecuencia elevada alrededor del mundo, siendo la infección bacteriana de transmisión sexual más común globalmente (Hajikhani *et al.* 2013).

Estas infecciones se encuentran distribuidas ampliamente por todo el orbe y la prevalencia es muy variable dependiendo de la zona geográfica, la población de estudio y el método analítico que se haya empleado, por lo que se ha optado por evaluar y comparar nuestro trabajo con otros que hayan utilizado poblaciones y condiciones similares y que fuesen desarrollados en nuestro país o zona geográfica cercana.

En relación al VPH, diversos trabajos epidemiológicos realizados en población abierta en mujeres que acuden a consulta ginecológica de rutina se han encontrado prevalencias que van desde el 9% hasta 18% (López Rivera *et al.* 2012; Magaña-Contreras *et al.* 2015), mientras que en otro trabajo realizado por Conde Ferrález y colaboradores, donde estudiaron este patógeno en pacientes que sufrían abortos espontáneos recurrentes la frecuencia se elevaba hasta 24.4% (Conde Ferrález, *et al.* 2013), nuestro trabajo fue realizado en mujeres con infertilidad causada por factores variables, uno de los cuales son los abortos espontáneos y se logró identificar VPH en el 20.5% de las pacientes, en este sentido, el trabajo de Conde Ferrález es el más similar al nuestro, ya que fue realizado en nuestro país aunque solo involucra a pacientes infértiles por abortos recurrentes, además fue llevado a cabo con pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social que es una institución de salud pública a

diferencia de nuestro trabajo donde se revisaron pacientes del sector privado por lo que es comprensible la disminución en la prevalencia en nuestro trabajo, ya que se ha visto que el bajo estatus socioeconómico se asocia con la infección por VPH (Lazcano Ponce *et al.* 2001), además de la variabilidad inherente a la zona geográfica.

En cuestión de la infección causada por *Chlamydia trachomatis*, existen reportes que investigan la presencia de esta bacteria en población femenina Mexicana. En uno de ellos, realizado hace 20 años con pacientes asintomáticas de zonas rurales y suburbanas del territorio nacional, empleando la técnica de IFD se determinó que la frecuencia de este patógeno se encontraba en un 7.3% siendo prácticamente la misma cifra en las dos poblaciones (Acosta Cázares, *et al.* 1996). Otro estudio más reciente realizado con pacientes asintomáticas de 15 a 21 años de edad provenientes de una zona urbana Mexicana, utilizando métodos moleculares se encontró una prevalencia del 8% (Gutierrez, *et al.* 2006), mientras que Magaña-Contreras y colaboradores en 2015, estudiaron en una población abierta del sur del país la presencia de diversos agente de transmisión sexual mediante análisis molecular, entre ellos *Chlamydia trachomatis*; la cual resultó estar presente en el 1.5% de las pacientes (Magaña-Contreras *et al.* 2015). De Haro– Cruz y Colaboradores realizaron un estudio de genotipificación de este patógeno en pacientes infértiles mexicanas, en el cual se observó una prevalencia del 15.8% (De Haro-Cruz *et al.* 2011), siendo este último el que más se aproxima a nuestras condiciones de trabajo, debido a la nacionalidad de las pacientes, metodología y población estudiada. Los resultados obtenidos de nuestra investigación mostraron un 9.8% en la prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, representando un valor significativamente menor al reportado anteriormente en una población infértil, esta diferencia puede estar causada por los cambios en las características de la población estudiado la zona geográfica del país, ya que De Haro–Cruz estudió pacientes de la capital del país donde la densidad

poblacional y la urbanización es mayor que en Monterrey, y se ha demostrado que este es un factor de riesgo para contraer la infección por *Chlamydia trachomatis* (van Bergen *et al.* 2005); además las pacientes empleadas en dicho estudio son pertenecientes a instituciones de salud pública, en cambio las pacientes de nuestro trabajo son de orden privado, lo que conlleva una diferencia en el estatus socioeconómico, donde se ha visto que afecta de manera significativa este tipo de infecciones, siendo la población con niveles bajos la más propensa a desarrollar esta infección (Crichton *et al.* 2015).

Como ya antes se ha mencionado, la coinfecciones causadas por VPH y *Chlamydia trachomatis* en el tracto urogenital femenino se han considerado últimamente como de riesgo alto para el desarrollo de cáncer cervical por algunos autores (Koskela, *et al.* 2000; Smith *et al.* 2002), por lo que es de suma importancia evaluar a las pacientes en este sentido. Ahora bien, no existen en la actualidad reportes sobre la prevalencia o las consecuencias en cuestión de problemas reproductivos en la mujer causados por la coinfección de estos dos patógenos, por lo que nuestro trabajo se considera como un primer vistazo en este aspecto, revelando que la prevalencia de las coinfección se encuentra en un 6.6% de nuestro grupo de estudio, siendo un tanto mayor que el reportado en mujeres asintomáticas de Italia por Panatto y colaboradores que encontraron un 2.7% en su estudio (Panatto, *et al.* 2015). Esto se debe posiblemente por las características de la población, ya que hemos visto que las mujeres que padecen de problemas de fertilidad presentan una mayor frecuencia de estas infecciones en comparación con las mujeres asintomáticas de población abierta.

De manera similar a otros trabajos que estudian estas coinfecciones (Finan, *et al.* 2002; Tamim, *et al.* 2002), nuestro grupo de estudio mostró que la presencia de *Chlamydia trachomatis* es significativamente más frecuente en las pacientes infectadas por VPH, en comparación con aquellas que no lo están.

En el rubro epidemiológico, estas infecciones se consideran de alta prevalencia a nivel mundial y más aún en poblaciones de mujeres infértiles (De Haro-Cruz, *et al.*, 2011; Souho, *et al.*, 2015), los trabajos antes mencionados recalcan la importante presencia que tienen en nuestro país, y esto se debe, principalmente a que los programas de monitoreo actuales no han logrado ser eficientes en términos de valor diagnóstico para la correcta identificación de las lesiones o anomalías causadas por dichas patologías.

Uno de los principales problemas en este sentido, es que los métodos utilizados para la detección y el monitoreo del VPH como lo es la citología cervical convencional con tinción de Papanicolaou, así como para estudiar la presencia de *Chlamydia trachomatis* que es la citología cervical con tinción de Giemsa, ambas poseen niveles bajos en la capacidad para identificar a los casos positivos (Sensibilidad) así como también para descartar los casos negativos (Especificidad) (Gray & Walzer, 2004; Taylor Robinson, 1997). Los valores predictivos positivo y negativo también son indicadores importantes, por que indican la probabilidad de que un resultado ya sea positivo o negativo, identifique o descarte respectivamente la enfermedad buscada en una población en específico (Hafner & Schaefer, 2014).

Es por estos motivos que nos hemos dedicado a desarrollar una técnica citológica en fresco con fines de monitoreo para estas dos infecciones, entre otras propiedades, esta técnica es rápida, fácil de realizar, no necesita fijación ni procesamiento prolongado, por lo que puede ser útil para establecer un diagnóstico presuntivo en tiempo real durante la consulta de los pacientes, por tal motivo hemos decidido estudiar su valor diagnóstico comparándola contra las técnicas rutinarias de Papanicolaou y Giemsa, utilizando como “estándar de oro” el análisis molecular de dichas muestras.

En este sentido, para detectar la presencia del VPH en las muestras de ECV de las pacientes infértiles, la CIFAR- CF logró obtener un valor de sensibilidad bastante aceptable de 75% superando los obtenidos por las citologías de Papanicolaou y Giemsa, 71% y 65% respectivamente, mientras que la mejor especificidad obtenida fue con la citología de Papanicolaou con un 85%, seguida de la CIFAR - CF con 78% y por último la citología de Giemsa con un 73%. En cuanto a los valores predictivos, el mejor valor predictivo positivo fue encontrado con la citología de Papanicolaou con un 60%, CIFAR – CF obtuvo un 52% mientras que Giemsa un 41%, para el valor predictivo negativo, CIFAR – CF fue la mejor en el rubro, logrando un 92%, seguida del Papanicolaou con 90% y con 88% el Giemsa.

Por otra parte, para determinar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en las muestras de ECV de las pacientes infértiles, la CIFAR – CF resultó tener una sensibilidad similar con las otras dos citologías la cual es de 85%, pero obtuvo una especificidad superior que estas con un 78%. En los valores predictivos positivo y negativo también la CIFAR – CF reflejo los mejores valores comparados contra las otras dos técnicas con 27.90% y 98.21% respectivamente.

Como se puede observar, para la detección de VPH y *Chlamydia trachomatis* en los ECV de mujeres infértiles, la CIFAR – CF resultó ser la técnica más eficiente en cuestión de sensibilidad en comparación con las otras dos citologías llevadas a cabo en este estudio, inclusive mayor que el 56.4% reportada en un estudio realizado por Mayrand y colaboradores en el 2007 con una población de aproximadamente 10,000 muestras de población abierta (Mayrand, *et al.* 2007). Este valor puede encontrarse elevado debido a el procesamiento especial de las muestras en la CIFAR – CF, la cual lleva un paso de centrifugación en frio, concentrando así todo el material celular e incrementando la posibilidad de observar células anómalas o con morfología sospechosa de este tipo de infecciones, inclusive se ha visto que

en otros trabajos donde utilizan citologías en medios líquidos, agregar un paso de centrifugación incrementa sustancialmente la sensibilidad (Argon, *et al.* 2013; Verma, *et al.* 2013); además, también se ha observado que en las citologías realizadas en medios líquidos son más sensibles que las realizadas por frotis, debido a que existe una mejor representación de la toma de la muestra, al resuspender todo el contenido celular en el medio líquido (Singh *et al.* 2015).

En términos de especificidad, la CIFAR – CF resultó ser menos eficiente que la citología de Papanicolaou pero mejor que la de Giemsa para identificar la presencia de VPH, aunque para el estudio de *Chlamydia trachomatis* la CIFAR – CF obtuvo el mejor rendimiento de las 3; sin embargo, en general, todas las citologías realizadas en este trabajo resultaron tener bajos valores en especificidad comparándolas contra lo reportado anteriormente por otros grupos de trabajo (Mayrand, *et al.* 2007; Mittal, *et al.* 1993). Es probable que estos resultados se deban a los errores en la interpretación de las observaciones realizadas ocasionando falsos positivos, una razón que nos hace pensar en esto son las aberraciones esféricas que existen en una citología en fresco por la acumulación de células en un punto focal y dificulta su visualización, otro motivo es la generación de artefactos por precipitación del colorante, un rol muy importante lo lleva a cabo el analista que lleva a cabo la interpretación debido a que es muy sugestiva y atendida al criterio propio de este, por lo que también es considerado como una fuente de error inherente al estudio (Cuzick, 2002). En este aspecto se ha visto que las diferencias intra e interobservador suelen ser bajas, pero suficientes para corroborar que el criterio en la interpretación por parte de los analistas juega un rol crucial en este tipo de análisis (Klinkhammer, *et al.* 1989; Moore, *et al.* 2009). En el caso especial de la identificación de las IMCCT, existen estructuras muy similares a estas, las cuales se encuentran presentes en las células epiteliales mucosas llamadas micronúcleos,

que son material cromosómico que no se incorporó de manera correcta en el núcleo durante la división celular (Grover, *et al.* 2012). Esto puede ocasionar problemas al momento de discernir entre estas y las IMCCT e inclusive estas estructuras se han visto elevadas cuando existe una infección por VPH y/o por *Chlamydia trachomatis*, por lo que fácilmente puede ser confundida si no se realiza un análisis morfológico detallado en estas estructuras para su diferenciación (Cassel, *et al.* 2014; Dimitrijevic, *et al.* 2006).

La sensibilidad de un test diagnóstico es muy importante cuando se trata de descartar pacientes sanos, mientras que la especificidad se utiliza para identificar a los pacientes que se encuentren presentando la enfermedad (Hafner & Schaefer, 2014), por otra parte los valores predictivos positivo y negativo indican la probabilidad de estar enfermo o sano si el resultado arroja un resultado positivo y negativo respectivamente (Gunnarsson & Lanke, 2002). Dicho esto, se puede obviar que la mejor prueba diagnóstica es aquella que sea sensible y específica al mismo tiempo, sin embargo, esto pocas veces es posible en pruebas de monitoreo, debido a la alta demanda de estudios por realizar y el grado de especialización que requieren estos métodos eficaces, por lo que en los métodos de monitoreo la mayoría no poseen valores altos en estos parámetros diagnósticos. En este sentido, los parámetros considerados como más importantes en un método de monitoreo y detección oportuna como la CIFAR - CF son la sensibilidad, y el valor predictivo negativo porque son los indicadores que ayudan al descarte de pacientes que no se encuentran enfermos, es decir, mientras más sensible sea una prueba, mejor será para eliminar a los falsos negativos y por consecuente, ayudará a direccionar los resultados positivos a pruebas con una especificidad adecuada para el diagnóstico confirmatorio del patógeno causal, y por el contrario, si una prueba de monitoreo es muy buena en especificidad (lo que también incrementará el valor predictivo positivo) pero carece de sensibilidad, no ayudará a esto debido a que identificará un número

muy reducido de casos positivos, aunque estos sean muy fiables, escapándose así muchos casos que puedan estar positivos pero que no se han identificado debido a la baja sensibilidad.

En este contexto, la CIFAR – CF obtuvo los mejores valores de sensibilidad y valor predictivo negativo para la detección de los dos patógenos entre las citologías empleadas, sin embargo, la especificidad y el valor predictivo positivo resultaron estar muy por debajo del valor diagnóstico óptimo para pruebas clínicas, por lo tanto, en base a la evidencia obtenida en este estudio, la CIFAR – CF debe considerarse una prueba estrictamente de monitoreo y detección presuntiva y no debe utilizarse como un método confirmatorio, para ninguno de los dos patógenos, por otra parte, para los fines de monitoreo, resultó ser mejor que las citologías empleadas convencionalmente.

Como anteriormente se ha mencionado, las infecciones causadas por el VPH y por *Chlamydia trachomatis* son mundialmente conocidas, y presentan una elevada prevalencia sobre todo en los países en vías de desarrollo, además se han encontrado también algunos factores de riesgo para que predisponen a este tipo de infecciones. En este sentido, las pacientes con infertilidad fueron evaluadas para encontrar factores de riesgo demográficos y de antecedentes de problemas reproductivos que se relacionaran con la presencia del VPH y/o *Chlamydia trachomatis*.

En las últimas décadas, en estudios realizados en mujeres asintomáticas sin restricciones de edad se ha podido comprobar que la prevalencia del VPH depende significativamente de la edad que posea la paciente, siendo las jóvenes la que mayor índice de prevalencia de esta infección presenta (Melkert, *et al.* 1993; Venezuela, *et al.* 2012), al parecer, en la población de mujeres infértiles, esta característica prevalece ya que también fue observada una diferencia en nuestro grupo de estudio, donde la media de edad de las pacientes infectadas fue significativamente menor que aquellas no infectadas, sin embargo,

no existen reportes de este tipo de datos que se hayan realizado en poblaciones similares a la nuestra que puedan corroborar esta información de manera más confiable. Otro factor de riesgo que también se ha visto muy relacionado con la presencia del VPH es la edad del inicio de vida sexual, Vinodhini y colaboradores en 2012 realizaron un metanálisis donde incluían información de 120 estudios realizados en la mayoría de las regiones del mundo, y en el análisis de los datos, se pudo observar que conforme menor era la edad de las pacientes al inicio de su vida sexual, mayor es la probabilidad de infectarse por VPH. (Vinodhini, *et al.* 2012), este comportamiento también fue observado en nuestro grupo de trabajo, donde la edad del inicio de la vida sexual fue significativamente menor cuando las pacientes se encontraban infectadas, en comparación de aquellas que no lo estaban, igualmente en este sentido, no existen trabajos que contengan esta información realizados en una población de mujeres infértiles.

En cuestión de los datos de antecedentes de infertilidad, nuestro estudio demostró una mayor presencia de VPH en aquellas pacientes que reportaban no haberse embarazado anteriormente contras las que si lo habían logrado, esto se puede correlacionar si vemos los casos como parejas, ya que se ha observado que en los pacientes masculinos infectados con VPH los valores espermáticos ideales para la fecundación se ven afectados en diversas características (Souho, *et al.* 2015), así mismo, el grupo de mujeres que no lograban embarazarse por consiguiente también eran las que reportaban no haber sufrido de abortos. Por otra parte, los grupos de pacientes que no asistían a técnicas de reproducción asistida ni estimulación ovárica hormonal, presentaban mayores índices de positividad para el VPH, esto puede ser comprensible desde el punto de vista clínico, donde los terapeutas al observar anomalías o resultados positivos a la infección, tratar de resolver esto, antes de someter a la paciente a tratamientos empíricos de embarazo (Noventa, *et al.* 2014).

Por otra parte, de los factores de riesgo estudiados para la infección por *Chlamydia trachomatis* en nuestra población, solamente se pudo encontrar una asociación con el dato de Menarca, siendo significativamente menor la edad de las pacientes a la que esto se presentaba en aquellas que se encontraban infectadas, comparadas contra las no infectadas. Estos datos se contraponen con los mencionados por Blythe y colaboradores, donde no encontraron una asociación con este dato (Blythe, *et al.* 1988), sin embargo, este estudio se realizó con en una población de mujeres adolescentes, las cuales se ha visto que presentan una mayor prevalencia en esta infección, especialmente aquellas menores a 20 años (Peipert, 2003), por lo que se necesitan estudios posteriores que corroboren estos datos en grupos de pacientes infértiles. Mientras que en los datos de antecedentes de infertilidad, al igual que con la infección por VPH, se observó que las pacientes que no acudían a las técnicas de reproducción asistida ni estimulación ovárica hormonal tenían significativamente una mayor presencia de *Chlamydia trachomatis* en comparación contra las que si acudían a este tipo de terapias.

Posteriormente, se pudo comprobar que en las pacientes que se encontraban coinfectadas con VPH y *Chlamydia trachomatis* las diferencias en la edad, menarca y edad al inicio de la vida sexual activa se mostraban potenciadas, es decir, en este grupo las diferencias eran más marcadas. En un trabajo de Panatto y colaboradores en 2015 también observaron que la edad de las pacientes coinfectadas con estos dos patógenos era significativamente menor que aquellas que no lo estaban (Panatto, *et al.* 2015) .

Además de los factores demográficos y de antecedentes de infertilidad, en este estudio también se investigaron los hallazgos citopatológicos en búsqueda de aquellos que presentarán una asociación con las infecciones causadas por estos dos microorganismos con

el fin de establecer un diagnóstico presuntivo más sólido al observar dichos hallazgos en la CIFAR – CF.

Una de las observaciones citológicas más distintivas en los casos VPH positivos, fue la presencia de coilocitos, es decir, células que presentaban el efecto citopático del VPH, dichas células se encontraban en mayor cantidad relativa en las pacientes infectadas con VPH en comparación con las que no tenían la infección, estos datos se correlacionan con las observaciones de las citologías convencionales de Papanicolaou, ya que en aquellas pacientes que mostraban tener una citología normal, la frecuencia de la infección por VPH era significativamente menor, y a la inversa, cuando se reportaba un Papanicolaou anormal (Clase III), la frecuencia de VPH era significativamente mayor, esto es similar a lo reportado anteriormente por otros autores, donde se indica que en las citologías anormales la prevalencia de VPH es hasta tres veces mayor en comparación con las pacientes que resultan normales en los análisis citológicos (Mu-Shwe, *et al.* 2014; Yuce, *et al.* 2012). Por otra parte, también se encontró una asociación entre la presencia de infección por VPH y la abundante cantidad de bacterias cocoides causando una vaginosis, específicamente la observación de un mayor número de placas de dichas bacterias, en otros estudios también se han encontrado tendencias entre la aparición de Vaginosis bacteriana junto con la infección por VPH (Lu *et al.* 2015).

En las observaciones realizadas en los casos donde la infección por *Chlamydia trachomatis* se encontraba positiva, se logró identificar un incremento significativo en las células coilocíticas en comparación con las pacientes sanas, estos datos se pueden correlacionar con otros estudios recientes los cuales indican que en pacientes infectadas por *Chlamydia trachomatis* son más frecuentes las citologías anormales en comparación con las pacientes no infectadas (Oliveira, *et al.* 2008), además, como ya se mencionó estas pacientes

infectadas por *Chlamydia trachomatis* mostraban significativamente mayor frecuencia de infección por VPH, lo que provoca la elevación en de dichas células anormales. Otras observaciones también reflejaron un aumento de IMCCT y una tendencia a la alza en los detritus celulares en las pacientes infectadas con *Chlamydia trachomatis* que se vuelve significativa cuando existe la coinfección de VPH y *Chlamydia trachomatis*. En este sentido, Guerra Infante y colaboradores estudiaron pacientes infértiles en las cuales encontró que la erosión cervical se desarrollaba 2.7 veces más frecuentemente cuando la infección por *Chlamydia trachomatis* (Guerra-Infante, *et al.* 2003; Tosun, *et al.* 2008) y dicho proceso se correlaciona con los avistamientos incrementados de detritus celulares en las muestras.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

Primera: Se lograron incluir en este estudio 122 Muestras, un número muestral superior a la necesaria para obtener resultados estadísticamente satisfactorios (N=98).

Segunda: Los datos demográficos y antecedentes reproductivos obtenidos de la población estudiada, son equiparables a los reportados en otras poblaciones de mujeres infértiles.

Tercera: Se observó menor prevalencia de infecciones por VPH y/o CT en comparación con otras poblaciones de mujeres mexicanas infértiles, además, para nuestro conocimiento, es la primera vez que se realiza la búsqueda de la coinfección por estos patógenos en mujeres infértiles.

Cuarta: Existen factores demográficos, antecedentes reproductivos y datos citopatológicos asociables a las infecciones por VPH y/o CT en la población estudiada.

Quinta: Se comprobó que la CIFAR – CF tiene mayor sensibilidad que el PAP y mayor sensibilidad y especificidad que el Giemsa para detectar presuntivamente VPH en las mujeres infértiles.

Sexta: Para la detección presuntiva de *Chlamydia trachomatis*, la CIFAR – CF, obtuvo mayor sensibilidad y especificidad comparada contra el PAP y la citología de Giemsa.

PERSPECTIVAS

10. PERSPECTIVAS

El propósito de este proyecto fue principalmente encontrar el valor diagnóstico que tiene un método citológico propuesto por nuestro grupo de trabajo para el estudio de los ECV de la población de mujeres infértiles que acuden a consulta ginecológica.

En vías de conocer esto, pudimos obtener información valiosa sobre la situación epidemiológica de estas infecciones en la población estudiada, además, el estudio citopatológico de las muestras obtenidas nos permitió conocer aquellos hallazgos que se relacionaban con la presencia de dichos patógenos.

Sin embargo, durante el desarrollo de este proyecto nos encontramos con ciertas dificultades sobre todo en lo concerniente al proceso citológico de las muestras, ya que estas tenían una gran variabilidad en sus componentes y a veces esto dificultaba su observación.

Para mejorar la técnica citológica, en vías de elevar el valor de sensibilidad y especificidad para lograr posicionarla como un método más seguro en el monitoreo de las infecciones del tracto genitourinario femenino, nos hemos planteado una serie de perspectivas que se muestran a continuación:

Primera: Optimizar los tiempos de preservación y procesamiento de muestras.

Segunda: Buscar nuevas condiciones de procesamiento (tiempos de coloración y centrifugación) que brinden una mejor interpretación de los resultados citológicos.

Tercera: Establecer una concentración específica de células para el análisis citológico, con el fin de eliminar aberraciones esféricas (doble foco).

Cuarta: Emplear un mayor número de muestras para elucidar las tendencias mostradas en los análisis de correlación y lograr una validación más sostenible.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, K., & Robbins y Cotran, F. (2007). *Patología Estructural y Funcional* (7a Edición).
- Acosta Cázares, B., Ruiz Maya, L., & Escobedo de la Peña, J. (1996). Prevalence and Risk Factors for Chlamydia trachomatis Infection in Low - Income Rural and Suburban Populations of Mexico. *Sexually Transmitted Diseases*, 283 – 288.
- Adamson, G. D., & Baker, V. L. (2003). Subfertility: causes, treatment and outcome. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 17(2), 169–85. <http://doi.org/10.1053/ybeog.2003.358>
- Adriaanse, A. H., Muytjens, H. L., Kollée, L. A., Nijhuis, J. G., & Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1995). Significance of Gram's stain in rapid intrapartum screening for maternal carriage of group B streptococcus. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 3(3), 110–5. <http://doi.org/10.1155/S1064744995000421>
- Aedo A, S., Melo A, A., García, P., Guzmán G, P., Capurro V, I., & Roa S, J. C. (2007). Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Revista Medica de Chile*, 135(2), 167–173. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872007000200004>
- Agrawal, T., Vats, V., Salhan, S., & Mittal, A. (2009). The mucosal immune response to Chlamydia trachomatis infection of the reproductive tract in women. *Journal of Reproductive Immunology*, 83, 173–178. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2009.07.013>
- Alhassan, A., Ziblim, A. R., & Muntaka, S. (2014). A survey on depression among infertile women in Ghana. *BMC Women's Health*, 14(1), 42. <http://doi.org/10.1186/1472-6874-14-42>
- Al-Jaroudi, D., & Hussain, T. Z. (2010). Prevalence of abnormal cervical cytology among subfertile Saudi women. *Annals of Saudi Medicine*, 30(5), 397–400.
- Almobarak, A. O., Elhoweris, M. H., Nour, H. M., Ahmed, M. A. A. M., Omer, A.-F. A., & Ahmed, M. H. (2013). Frequency and patterns of abnormal Pap smears in Sudanese women with infertility: What are the perspectives? *Journal of Cytology / Indian Academy of Cytologists*, 30(2), 100–3. <http://doi.org/10.4103/0970-9371.112651>
- Al-Moushaly, A. (2013). Considerations on male infertility in genital infections with Chlamydia Trachomatis (CT). *Journal of Medicine and Life*, 6(3), 283–286.
- Alvarez Cuevas, S. (2012). *Implementación de un modelo murino para la infección endometrial por Chlamydia trachomatis y Ureaplasma urealyticum*.
- Alves de Sousa, N. L., Figueiredo Alves, R. R., Rodrigues Martins, M., da Silva Barros, N. K., Alves Ribeiro, A., Zeferino, L. C., ... Rabelo-Santos, S. H. (2011). Cytologic Effects of Human Papillomavirus Infection and the Severity of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Frequency Study. *Diagnostic Cytopathology*, 40(10), 871–875.

- Argon, A., Uyaroglu, M. A., Nart, D., Veral, A., & Kitapcioglu, G. (2013). The effectiveness of the liquid-based preparation method in cerebrospinal fluid cytology. *Acta Cytologica*, 57(3), 266–270. <http://doi.org/10.1159/000346716>
- Bahamondes, L., & Makuch, M. Y. (2014). Infertility care and the introduction of new reproductive technologies in poor resource settings. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(87), 1–7.
- Barco Díaz, V., Quintero Caballero, C., Reyes Pérez, A., & Álvarez Figueredo, Z. (2013). El modelo de la adaptación ante la infertilidad de la pareja. *Revista Cubana de Enfermería*, 29(2), 63–76. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03192013000200002&lng=es&nrm=iso&tln g=es
- Barouti, E., Farzaneh, F., Sene, A. A., Tajik, Z., & Jafari, B. (2013). The pathogenic microorganisms in papanicolaou vaginal smears and correlation with inflammation. *Journal of Family & Reproductive Health*, 7(1), 23–27. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4064746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Baud, D., Goy, G., Jatou, K., Osterheld, M.-C., Blumer, S., Borel, N., ... Greub, G. (2011). Role of Chlamydia trachomatis in Miscarriage. *Emerging Infectious Diseases*, 17(9), 1630–1635.
- Baud, D., Regan, L., & Greub, G. (2010). Comparison of five commercial serological tests for the detection of anti- Chlamydia trachomatis antibodies, 669–675. <http://doi.org/10.1007/s10096-010-0912-4>
- Bhatla, N., Puri, K., Joseph, E., Kriplani, A., Iyer, V. K., & Sreenivas, V. (2013). Association of Chlamydia trachomatis infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia - A pilot study. *Indian J Med Res*, 137(March), 533–539.
- Blythe, M. J., Katz, B. P., Orr, D. P., Caine, V. A., & Jones, R. B. (1988). Historical and clinical factors associated with Chlamydia trachomatis genitourinary infection in female adolescents. *Journal of Pediatrics*, 112(6), 1000–1004.
- Boots, C. E. (2015). Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics Christina. *Semin Reprod Med*, 33(4), 270 – 275. <http://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.016>. Observing
- Borovkova, N., Korrovits, P., Ausmees, K., Türk, S., Jöers, K., Punab, M., & Mändar, R. (2011). Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe*, 17(6), 414–418. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.015>
- Briceag, I., Costache, A., Purcarea, V., Cergan, R., Dumitru, M., Briceag, I., ... Ispas, A. (2015). Fallopian tubes – literature review of anatomy and etiology in female infertility. *Journal of Medicine and Life*, 8(2), 129–131.
- Brotman, R. M., Ravel, J., Cone, R. A., &

- Zenilman, J. M. (2010). Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sex Transm Infect*, 86(4), 297–302.
<http://doi.org/10.1136/sti.2009.040592>. Rapid
- Brugo-olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2003). Infertility: Causes and Definitions. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, 54(2003), 227 – 248.
- Cai, T., Wagenlehner, F. M. E., Mondaini, N., Elia, C. D., Meacci, F., Migno, S., ... Bartoletti, R. (2014). Effect of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis co-infection on sperm quality in young heterosexual men with chronic prostatitis-related symptoms. *BJU Int*, 113, 281–287.
<http://doi.org/10.1111/bju.12244>
- Calinisan, J. H., Chan, S. R., King, A., & Chan, P. J. (2002). Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 19(3), 132–6.
<http://doi.org/10.1023/A:1014736805127>
- Casari, E., Ferrario, A., Morengi, E., & Montanelli, A. (2010). Gardnerella, Trichomonas vaginalis, Candida, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women. *New Microbiologica*, 33(1), 69–76.
- Casey, P. M., Long, M. E., & Marnach, M. L. (2011). Abnormal cervical appearance: what to do, when to worry? *Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic*, 86(May), 147–150. <http://doi.org/10.4065/mcp.2010.0512>
- Cassel, A., Barcellos, R., Silva, C., Almeida, S., & Rossetti, M. (2014). Association between human papillomavirus (HPV) DNA and micronuclei in normal cervical cytology. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3), 360–363.
- CDC. (2014). *Genital HPV Infection – CDC Fact Sheet*.
- Centers for Disease Control. (2013). *Incidence , Prevalence , and Cost of Sexually Transmitted Infections in the United States* (Vol. 40).
- Cervantes G, E. (2009). Infecciones causadas por Chlamydia trachomatis. *Rev Fac Med UNAM*, 52(1), 18–22.
- Charu, N., Ram, C., Poonam, G., & B. L, S. (2015). Evaluation of risk factors in patients attending STI clinic in a tertiary care hospital in North India. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*, 36(1), 48–52.
- Chernesky, M., Luinstra, K., Sellors, J., Schachter, J., Moncada, J., Caul, O., ... Mahony, J. (1998). Can Serology Diagnose Upper Genital Tract Chlamydia trachomatis infection. *Sexually Transmitted Diseases*, 25(1), 14–19.
- Cho, G., Min, K.-J., Hong, H.-R., Kim, S., Hong, J.-H., Lee, J.-K., ... Kim, H. (2013). High-risk human papillomavirus infection is associated with premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy and*

- Childbirth*, 13(1), 173.
<http://doi.org/10.1186/1471-2393-13-173>
- Choroszy-Król, I., Frej-Madrzak, M., Jama-Kmieciak, A., Bober, T., & Sarowska, J. (2012). Characteristics of the Chlamydia trachomatis species - Immunopathology and Infections. *Adv Clin Exp Med*, 21(6), 799–808.
- Conde-Ferrández, L., Chan May, A. D. a, Carrillo-Martínez, J. R., Ayora-Talavera, G., & González-Losa, M. D. R. (2013). Human papillomavirus infection and spontaneous abortion: a case-control study performed in Mexico. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 170, 468–73.
<http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.07.002>
- Crichton, J., Hickman, M., Campbell, R., Batistaferrer, H., & Macleod, J. (2015). Socioeconomic factors and other sources of variation in the prevalence of genital chlamydia infections: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 15, 1–10. <http://doi.org/10.1186/s12889-015-2069-7>
- Cuschieri, K. S., & Cubie, H. A. (2005). The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *Journal of Clinical Virology*, 32S, 34–42.
<http://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.11.020>
- Cuzick, J. (2002). Role of HPV testing in clinical practice. *Virus Research*, 89, 263–269.
- De Haro-Cruz, M. D. J., De león-rodriguez, I., Escobedo-guerra, M. R., López-hurtado, M., Arteaga-troncoso, G., Ortiz-ibarra, F. J., & Guerra-infante, F. M. (2011). Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens of infertile Mexican women. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(2), 102–108.
<http://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.08.014>
- Dean, D. (2009). Chlamydia trachomatis today: treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of chlamydial disease pathogenesis. *Drugs Today*, 45, 25–31.
- Del Zoppo, G. J. (1997). Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 823(619), 132–147.
<http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48386.x>
- Dimitrijevic, A., Milosevic-Djordjevic, O., Grujicic, D., & Arsenijevic, S. (2006). Micronucleus frequency in women with genital Chlamydia Trachomatis infection before and after therapy. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 608(1), 43–48.
<http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.05.002>
- Donders, G. G. G., Vereecken, A., Salembier, G., Van Bulck, B., & Spitz, B. (1996). Assessment of vaginal lactobacillary flora in wet mount and fresh or delayed Gram's stain. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 4(1), 2–6.
[http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-0997\(1996\)4:1<2::AID-IDOG2>3.0.CO;2-5](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-0997(1996)4:1<2::AID-IDOG2>3.0.CO;2-5)

- Ethuin, F., Gérard, B., Benna, J. E., Boutten, A., Gougereot-Pocidaló, M.-A., Jacob, L., & Chollet-Martin, S. (2004). Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *84*(10), 1363–1371. <http://doi.org/10.1038/labinvest.3700148>
- Evers, J. L. H. (2002). Female subfertility. *Lancet (London, England)*, *360*(9327), 151–9. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09417-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09417-5)
- Ferreccio, C., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Herrero, R., Wacholder, S., Hildesheim, A., ... Schiffman, M. (2003). A Comparison of Single and Combined Visual, Cytologic, and Virologic Tests as Screening Strategies in a Region at High Risk of Cervical Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *12*(September), 815–823.
- Finan, R. R., Tamim, H., & Almawi, W. Y. (2002). Identification of Chlamydia trachomatis DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal and abnormal cytology. *Arch Gynecol Obstet*, *266*(3), 168–171. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12197559
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harbor Protoc*, *3*(5), 1–3. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Foresta, C., Pizzol, D., Moretti, A., Barzon, L., Palú, G., & Garolla, A. (2010). Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertility and Sterility*, *94*(5), 1723–1727. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.012>
- Fuchs, W., & Brockmeyer, N. H. (2014). Sexually transmitted infections. *Journal of Deutsche Dermatologische Gesellschaft*, *12*(6), 451–464. <http://doi.org/10.1111/ddg.12310>
- Furman, B. D., Kimmerling, K. A., Zura, R. D., Reilly, R. M., Zlowodzki, M. P., Huebner, J. L., ... Olson, S. A. (2015). Articular Ankle Fracture Results in Increased Synovitis, Synovial Macrophage Infiltration, and Synovial Fluid Concentrations of Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Arthritis Rheumatol*, *67*(5), 1234–1239. <http://doi.org/10.14440/jbm.2015.54.A>
- Garolla, A., Pizzol, D., & Foresta, C. (2011). The role of human papillomavirus on sperm function. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *23*, 232–237. <http://doi.org/10.1097/GCO.0b013e328348a3a4>
- Gates, M. L., Staples-horne, M., Cartier, J., Best, C., & Gates, M. L. (2015). Understanding Psychosocial and High-Risk Sexual Behaviors Among Detained Juveniles: A Descriptive Study Protocol. *JMIR Research Protocols*, *4*(4). <http://doi.org/10.2196/resprot.5153>
- Gaydos, C., & Hardick, J. (2014). Point of care

- diagnostics for sexually transmitted infections: perspectives and advances. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 12(6), 657–672. <http://doi.org/10.1586/14787210.2014.880651>.Point
- Giuliano, A. R., Lee, J.-H., Fulp, W., Villa, L. L., Lazcano, E., Papenfuss, M. R., ... Smith, D. (2011). Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet (London, England)*, 377(9769), 932–940. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62342-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62342-2).Incidence
- Gizzo, S., Ferrari, B., Noventa, M., Ferrari, E., Patrelli, T. S., Gangemi, M., & Nardelli, G. B. (2014). Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: Update on molecular mechanism and clinical impact - Systematic review. *BioMed Research International*, 2014, 20–22. <http://doi.org/10.1155/2014/230263>
- GLOBOCAN. (2012). GLOBOCAN Fact Sheets Cervical cancer.
- Golob, B., Poljak, M., Verdenik, I., Simoniti, M. K., Vertacnik Bokal, E., & Zorn, B. (2014). High HPV Infection Prevalence in Men from Infertile Couples and Lack of Relationship between Seminal HPV Infection and Sperm Quality. *BioMed Research International*, 2014.
- Gomez, L. M., Ma, Y., Ho, C., McGrath, C. M., Nelson, D. B., & Parry, S. (2008). Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(3), 709–715. <http://doi.org/10.1093/humrep/dem404>
- Gradison, M. (2012). Pelvic inflammatory disease. *American Family Physician*, 85(8), 791–796. <http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318253ca67>
- Gray, S. H., & Walzer, T. B. (2004). New strategies for cervical cancer screening in adolescents. *Current Opinion in Pediatrics*, 16(4), 344–349. <http://doi.org/10.1097/01.mop.0000133078.40007.2b>
- Graziottin, A., & Serafini, A. (2009). HPV infection in women : psychosexual impact of genital warts and intraepithelial lesions. *The Journal of Sexual Medicine*, 6(3), 633–645.
- Grover, S., Mujib, a, Jahagirdar, a, Telagi, N., & Kulkarni, P. (2012). A comparative study for selectivity of micronuclei in oral exfoliated epithelial cells. *Journal of Cytology / Indian Academy of Cytologists*, 29(4), 230–235. <http://doi.org/10.4103/0970-9371.103940>
- Guerra-Infante, F., Flores-Medina, S., Arteaga-Troncoso, G., Zamora-Ruiz, A., López-Hurtado, M., & Ortiz-Ibarra, F. J. (2003). Factores de riesgo y secuelas reproductivas asociados a la infección por Chlamydia trachomatis en mujeres infértiles. *Salud Publica de Mexico*, 45(SUPPL. 5).
- Guldbrandsen, K., Hakonsen, L. B., Ernst, A., Toft, G., Lyngso, J., Olsen, J., & Ramlau-Hansen, C. H. (2014). Age of menarche and time to pregnancy. *Human Reproduction*, 29(9), 2058–2064.

- <http://doi.org/10.1093/humrep/deu153>
- Gunnarsson, R. K., & Lanke, J. (2002). The predictive value of microbiologic diagnostic tests if asymptomatic carriers are present. *Statistics in Medicine*, *21*(12), 1773–1785. <http://doi.org/10.1002/sim.1119>
- Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, R. A., & Bhattacharya, S. (2011). Defining infertility — a systematic review of prevalence studies. *Human Reproduction Update*, *17*(5), 575–588. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmr015>
- Gutierrez, J.-P., Bertozzi, S. M., Conde-Glez, C. J., & Sanchez-Aleman, M.-A. (2006). Risk behaviors of 15-21 year olds in Mexico lead to a high prevalence of sexually transmitted infections: results of a survey in disadvantaged urban areas. *BMC Public Health*, *6*(49). <http://doi.org/10.1186/1471-2458-6-49>
- Haedicke, J., & Iftner, T. (2013). Human papillomaviruses and cancer. *Radiotherapy and Oncology*, *108*(3), 397–402. <http://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.004>
- Hafner, J. W., & Schaefer, T. J. (2014). Sensitivity and Specificity of the vaginal wet prep. *Journal of Emergency Medicine*, *46*(1), 83–84. <http://doi.org/10.1016/j.jemermed.2012.12.027>
- Hajikhani, B., Motallebi, T., Norouzi, J., Bahador, A., Bagheri, R., & Asgari, S. (2013). Classical and Molecular Methods for Evaluation of Chlamydia trachomatis Infection in Women with Tubal Factor Infertility. *J Reprod Infertil*, *14*(3), 29–33.
- Hart, R. (2003). Unexplained infertility, endometriosis, and fibroids Unexplained subfertility Endometriosis. *British Medical Journal*, *327*, 721–724.
- Heideman, D. A. M., Hesselink, A. T., Berkhof, J., Van Kemenade, F., Melchers, W. J. G., Daalmeijer, N. F., ... Snijders, P. J. F. (2011). Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(11), 3983–3985. <http://doi.org/10.1128/JCM.05552-11>
- Henneberg, A. A., Patton, W. C., Jacobson, J. D., & Chan, P. J. (2006). Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *23*(6), 255–9. <http://doi.org/10.1007/s10815-006-9030-8>
- Hermonat, P. L., Han, L., Wendel, P. J., Quirk, J. G., Stern, S., Lowery, C. L., & Rehtin, T. M. (1997). Human Papillomavirus is More Prevalent in First Trimester Spontaneously Aborted Products of Conception Compared to Elective Specimens. *Virus Genes*, *14*(1), 13–17.
- Hong, L. J., Oshiro, B. T., & Chan, P. J. (2013). HPV-16 exposed mouse embryos: a potential model for pregnancy wastage. *Arch Gynecol Obstet*, *287*, 1093–1097. <http://doi.org/10.1007/s00404-013-2711-5>
- Kelly, B. A., & Black, A. S. (1990). The inflammatory cervical smear: a study in general practice. *The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal*

- College of General Practitioners*, 40(335), 238–240.
- Kenyon, C., Buyze, J., & Colebunders, R. (2014). Classification of incidence and prevalence of certain sexually transmitted infections by world regions. *International Journal of Infectious Diseases*, 18, 73–80. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.09.014>
- Keramat, A., Masoumi, S. Z., Mousavi, S. A., Poorolajal, J., Shobeiri, F., & Mehdi Hazavehie, S. M. (2014). Quality of Life and Its Related Factors in Infertile Couples. *Journal of Research in Health Sciences*, 14(1), 57–64.
- Kessler, L. M., Ph, D., Craig, B. M., Ph, D., Plosker, S. M., Reed, D. R., ... Ph, D. (2013). Infertility Evaluation and Treatment among Women in the United States. *Fertility and Sterility*, 100(4), 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.040>. Infertility
- Kleine, T. O. (2015). Cellular immune surveillance of central nervous system bypasses blood-brain barrier and blood-cerebrospinal-fluid barrier: Revealed with the New Marburg cerebrospinal-fluid model in healthy humans. *Cytometry Part A*, 87(3), 227–243. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.22589>
- Klinkhammer, P., Vooijs, G., & de Haan, A. (1989). Intraobserver and interobserver variability in the quality assessment of cervical smears. *Acta Cytologica*, 33(2), 215–218.
- Kodaman, P. H., Arici, A., & Seli, E. (2004). Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 16, 221–229. <http://doi.org/10.1097/01.gco.0000129421.98370.0d>
- Koshiol, J. E., Laurent, S. A. S. T., & Pimenta, J. M. (2004). Rate and Predictors of New Genital Warts Claims and Genital Warts-Related Healthcare Utilization Among Privately Insured Patients in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, 31(12), 748–752. <http://doi.org/10.1097/01.olq.0000145851.76025.ad>
- Koskela, P., Anttila, T., Bjorge, T., Brunsvig, A., Dillner, J., Hakama, M., ... Paavonen, J. (2000). Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer*, 85, 35–39.
- Krawczyk, E., Supryniewicz, F. A., Liu, X., Dai, Y., Hartmann, D. P., Hanover, J., & Schlegel, R. (2008). Koilocytosis - A Cooperative Interaction between the Human Papillomavirus. *Epithelial and Mesenchymal Cell Biology*, 173(3), 682–688. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080280>
- Land, J. A., Bergen, J. E. A. M. Van, Morre, S. A., & Postma, M. J. (2010). Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost- effectiveness of screening. *Human Reproduction Update*, 16(2), 189–204. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmp035>
- Lazcano Ponce, E., Herrero, R., MUnoz, N., Cruz, A., Shah, K. V, Alonso, P., ... HERNandez, M. (2001). Epidemiology of HPV infection

- among Mexican women with normal cervical cytology. *International Journal of Cancer*, 91(3), 412–420.
- Lee, Y., & Lee, K. (2013). Chlamydia and Male Lower Urinary Tract Diseases. *Korean Journal of Urology*, 54, 73–77.
- Lei, H.-L., Wei, H.-J., Ho, H.-Y., Liao, K.-W., & Chien, L.-C. (2015). Relationship between risk factors for infertility in women and lead, cadmium, and arsenic blood levels: a cross-sectional study from Taiwan. *BMC Public Health*, 15(1), 1220. <http://doi.org/10.1186/s12889-015-2564-x>
- Li, Z., Li, D., Liu, H., Jiang, Z., Zhu, L., & Wang, N. (2014). Study on the prevalence and associated risk factors related to HIV, syphilis, herpes simplex virus-2 among female sex workers in Jiaozhou, Shandong province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 35(10), 1099–1104.
- Linhares, I. M., & Witkin, S. S. (2010). Immunopathogenic consequences of Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract. *Cell Stress and Chaperones*, 15, 467–473. <http://doi.org/10.1007/s12192-010-0171-4>
- Ljubin-sternak, S. I., & T, T. M. (2014). Chlamydia trachomatis and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health. *Journal of Pathogens*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/183167>
- Loeffelholz, M. J., Lewinski, C. A., Silver, S. R., Purohit, A. P., Herman, S. A., Buonagurio, D. A., & Dragon, E. A. (1992). Detection of Chlamydia trachomatis in Endocervical Specimens by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11), 2847–2851.
- López Rivera, M. G., Flores, M. O. M., Villalba Magdaleno, J. D., & Sánchez Monroy, V. (2012). Prevalence of Human Papillomavirus in Women from Mexico City. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2012, 1–4. <http://doi.org/10.1155/2012/384758>
- Lu, H., Jiang, P., Zhang, X., Hou, W., Wei, Z., Lu, J., ... Han, Y. (2015). Characteristics of bacterial vaginosis infection in cervical lesions with high risk human papillomavirus infection. *Int J Clin Exp Med*, 8(11), 21080–21088.
- Magaña-Contreras, M., Contreras-Paredes, A., Chavez-Blanco, A., Lizano, M., De la Cruz-Hernandez, Y., & De la Cruz-Hernandez, E. (2015). Prevalence of sexually transmitted pathogens associated with HPV infection in cervical samples in a Mexican population. *Journal of Medical Virology*, 87(12), 2098–2105. <http://doi.org/10.1002/jmv.24278>
- Magnusson, C., & Trost, K. (2006). Girls experiencing sexual intercourse early: could it play a part in reproductive health in middle adulthood? *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology*, 27(4), 237–244. <http://doi.org/10.1080/01674820600869006>
- Malhotra, M., Sood, S., Mukherjee, A., Muralidhar, S., & Bala, M. (2013). Genital

- Chlamydia trachomatis : An update. *Indian J Med Res*, 138(September), 303–316.
- Marashi, S. M. A., Moulana, Z., Imani Fooladi, A. A., & Mashhadi Karim, M. (2014). Comparison of Genital Chlamydia trachomatis Infection Incidence Between Women With Infertility and Healthy Women in Iran Using PCR and Immunofluorescence Methods. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(4), e9450. <http://doi.org/10.5812/jjm.9450>
- Maria, C., Zahra, R., & Sara, P. (2014). Prevalence of Cervical-Vaginal Infections in the Pap-Smear Samples in Iran. *Global Journal of Health Science*, 6(1), 201–206. <http://doi.org/10.5539/gjhs.v6n1p201>
- Mastromarino, P., Hemalatha, R., Barbonetti, A., Cinque, B., Cifone, M. G., Tammara, F., & Francavilla, F. (2014). Biological control of vaginosis to improve reproductive health. *Indian Journal of Medical Research*, 140(November), 91–97.
- Mayrand, M.-H., Duarte-Franco, E., Rodrigues, I., Walter, S. D., Hanley, J., Ferenczy, A., ... Franco, E. L. (2007). Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screenin Tests for Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 357(16), 1579–1588.
- Mcgoogan, E. (2004). Liquid-based cytology : the new screening test for cervical cancer. *Journal of Family Planning and Reproductive Health-Care*, 30(2), 123–125.
- Melkert, P. W., Hopman, E., van den Brule, A. J., Risse, E. K., van Diest, P. J., Bleker, O. P., ... Walboomers, J. M. (1993). Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *International Journal of Cancer*, 53(6), 919–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386137>
- Mittal, A., Kapur, S., & Gupta, S. (1993). Chlamydial cervicitis: role of culture, enzyme immunoassay and Giemsa cytology in diagnosis. *Apmis*, 101(1), 37–40.
- Molano, M., Meijer, C. J. L. M., Weiderpass, E., Arslan, A., Posso, H., Franceschi, S., ... Brule, A. J. C. Van Den. (2005). The Natural Course of Chlamydia trachomatis Infection in Asymptomatic Colombian Women : A 5-Year Follow-Up Study. *The Journal of Infectious Diseases*, 191, 907–916.
- Moore, D., Pugh-Cain, D., & Walker, T. (2009). Cervical smear adequacy: Cellularity references were found to increase both interobserver agreement and unsatisfactory rate. *Cytopathology*, 20(3), 161–168. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2008.00605.x>
- Moscicki, A. (2007). HPV infections in adolescents. *Disease Markers*, 23, 229–234.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., Berrington De Gonz, A., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1 : HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(3), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
- Mu-Shwe, M., Harano, T., Okada, S., Aye-Win, A.,

- Saw-Aye, K., Myat-Thu, H., ... Khin, M. (2014). Prevalence of human papillomavirus infection among women with and without abnormal cervical cytology in Myanmar, 79–87.
- Mylonas, I. (2012). Female genital Chlamydia trachomatis infection: where are we heading? *Arch Gynecol Obstet*, 285, 1271–1285. <http://doi.org/10.1007/s00404-012-2240-7>
- Myziuk, L., Romanowski, B., & Brown, M. (2001). Endocervical Gram stain smears and their usefulness in the diagnosis of Chlamydia trachomatis. *Sexually Transmitted Infections*, 77, 103–6. <http://doi.org/10.1136/sti.77.2.103>
- National Collaborating Centre For Women's and Children's Health. (2013). *Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems*.
- Nelson, H. D., & Helfand, M. (2008). Screening for chlamydial infection. *American Family Physician*, 78(12), 1349–1351. <http://doi.org/10.1097/00007435-199804000-00005>
- Newson, J., Stables, M., Karra, E., Arce-vargas, F., Quezada, S., Motwani, M., ... Gilroy, D. W. (2015). Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity, 124(11), 1748–1765. <http://doi.org/10.1182/blood-2014-03-562710>.J.N.
- Nnadi, D., Nwobodo, E., Ekele, B., & Sahabi, S. (2014). Screening for Cervical Cancer: A Review of Outcome among Infertile Women in a Tertiary Hospital in North-West Nigeria. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 4(3), 383–387. <http://doi.org/10.4103/2141-9248.133464>
- Noventa, M., Andrisani, A., Gizzo, S., Nardelli, G. B., & Ambrosini, G. (2014). Is it time to shift the attention on early stages embryo development to avoid inconclusive evidence on HPV-related infertility: debate and proposal. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 48. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-12-48>
- of Nurse-Midwives, A. college. (2013). Sexually Transmitted Infections (STIs). *Journal of Midwifery & Women's Health*, 58(5), 601–602.
- Oliveira, M. D. L., Amorim, M. M. R. De, Souza, P. R. E. De, Albuquerque, L. C. B. De, Brandão, L. A. C., & Guimarães, R. L. (2008). Chlamydia infection in patients with and without cervical intra-epithelial lesions tested by real-time PCR vs. direct immunofluorescence. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(4), 324–328. <http://doi.org/S1413-86702008000400014> [pii]
- OMS. (2012). *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008*.
- OMS. (2015). Infecciones de transmisión sexual. Retrieved February 11, 2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>

- Ortayli, N., Ringheim, K., Collins, L., & Sladden, T. (2014). Sexually transmitted infections : progress and challenges since the 1994 International Conference on Population and Development (ICPD). *Contraception*, *90*(6), S22–S31.
<http://doi.org/10.1016/j.contraception.2014.06.024>
- Osaka, I., & Hefty, P. S. (2013). Simple Resazurin-Based Microplate Assay for Measuring Chlamydia Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(6), 2838–2840.
<http://doi.org/10.1128/AAC.00056-13>
- Owusu-Edusei Jr, K., Nguyen, H. T., & Gift, T. L. (2013). Utilization and Cost of Diagnostic Methods for Sexually Transmitted Infection Screening Among Insured American Youth , 2008. *Sexually Transmitted Diseases*, *40*(5), 354–361.
<http://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e318285c58f>
- Panatto, D., Amicizia, D., Bianchi, S., Frati, E. R., Zotti, C. M., Lai, P. L., ... Tanzi, E. (2015). Chlamydia trachomatis prevalence and chlamydial/HPV co-infection among HPV-unvaccinated young italian females with normal cytology. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *11*(1), 270–276.
<http://doi.org/10.4161/hv.36163>
- Papanicolaou, G. (1954). *Atlas of Exfoliative Cytology. The Commonwealth Fund by Harvard University Press.*
- Peeling, R. W., Holmes, K. K., Mabey, D., & Ronald, A. (2006). Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. *Sex Transm Infect*, *82*(5), 1–6.
<http://doi.org/10.1136/sti.2006.024265>
- Peipert, J. F. (2003). Genital Chlamydial Infections. *The New England Journal of Medicine*, *349*(25), 2424–2430.
- Perino, A., Giovannelli, L., Schillaci, R., Ruvolo, G., Fiorentino, F. P., Alimondi, P., ... Ammatuna, P. (2011). Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures : impact on reproductive outcomes. *Fertility and Sterility*, *95*(5), 1845–1848.
<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.047>
- Peters, T. M., & Barbosa, P. (1971). The effects of vital dyes on living organisms with special reference to Methylene Blue and Neutral Red. *Histochemical Journal*, *3*, 71–93.
- Rafiei Tabatabaei, S., Afjeiee, S. A., Fallah, F., Zanjani Tahami, N., Shiva, F., Tavakkoly Fard, A., ... Karimi, A. (2012). The Use of Polymerase Chain Reaction Assay versus Cell Culture in Detecting Neonatal Chlamydial Conjunctivitis. *Arch Iran Med*, *15*(3), 171–175.
- Ramos Gonzalez, B. (2011). *FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO DE HOMBRES INFÉRTILES CON INFECCIÓN GENITOURINARIA OCACIONADA POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS Y MYCOPLASMA SP. EFECTO DE LA TERAPIA ANTIBIÓTICA Y ANTIOXIDANTE.*
- Ramos Gonzalez, B., Alvarez Cuevas, S., Sanchez

- Hernandez, J. J., Niderhauser García, A., Ancer Rodriguez, J., & Gallegos Avila, M. G. (2011). Desarrollo de una prueba citológica en fresco de alta resolución (CIFAR) para la detección de infección genital por *Micoplasmas genitales* y *Chlamydia trachomatis*. *Rev Int Androl*, *09*, 62–69.
- Rivera, L., Trenado, M., Valdez, A., & Gonzalez, C. (1996). Prevalence of bacterial vaginitis and vaginosis: association with clinical and laboratory features, and treatment. *Ginecol Obstet Mex*, *1*(64), 26–35.
- Rosa, M., & Mohammadi, A. (2007). *REVISION SOBRE CITOLOGIA DE CUELLO UTERINO CON ENFASIS EN LA CLASIFICACIÓN BETHESDA*.
- Rossi, E. D., Bizzarro, T., Schmitt, F., & Longatto-Filho, A. (2015). The role of liquid-based cytology and ancillary techniques in pleural and pericardic effusions: an institutional experience. *Cancer Cytopathol*, *123*(4), 258–266. <http://doi.org/10.1002/ency.21518>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. a. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, *239*(4839), 487–491. <http://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Salazar-Piña, D. A., Pedroza-Saavedra, A., Cruz-Valdez, A., Ortiz-Panozo, E., Maldonado-Gama, M., Chihu-Amparan, L., ... Gutierrez-Xicotencatl, L. (2016). Validation of Serological Antibody Profiles Against Human Papillomavirus Type 16 Antigens as Markers for Early Detection of Cervical Cancer. *Medicine*, *95*(6), e2769. <http://doi.org/10.1097/MD.00000000000002769>
- Salud, S. de. (2015). *Síntesis de Noticias*.
- Sanjose, S. De, Quint, W. G. V, Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., ... Valle, U. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncology*, *11*, 1048–56. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70230-8](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70230-8)
- Santiago, E., Camacho, L., Junquera, M. L., & Vázquez, F. (2006). Full HPV typing by a single restriction enzyme. *Journal of Clinical Virology*, *37*(1), 38–46. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.06.001>
- Santos, C., Teixeira, F., Vicente, A., & Astolfi-Filho, S. (2003). Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *7*, 91–95. <http://doi.org/S1413-86702003000200001> [pii]
- Schillaci, R., Capra, G., Bellavia, C., Ruvolo, G., Scazzone, C., Venezia, R., & Perino, A. (2013). Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertility and Sterility*, *100*(5), 1236–1240. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.0>

- Sheary, B., & Dayan, L. (2005). Cervical screening and human papillomavirus. *Australian Family Physician*, 34(7), 578–580.
- Shikova, E., Todorova, I., Ganchev, G., & Kouseva-Dragneva, V. (2009). Detection and Typing of Human Papillomaviruses by PCR. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 877–880. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2009.10818562> \nfile:///Users/juergen/Documents/Hybrid/downloads/Taylor and Francis/Confirmed OA/13102818%2E2009%2E10818562.pdf \npapers2://publication/doi/10.1080/13102818.2009.10818562
- Singh, V., Gupta, N., Nijhawan, R., R, S., Suri, V., & Rajwanshi, A. (2015). Liquid-based cytology versus conventional cytology for evaluation of cervical Pap smears: experience from the first 1000 split samples. *Indian J Pathol Microbiol*, 58, 17–21.
- Skoczyński, M., Goździcka-Józefiak, A., & Kwaśniewska, A. (2011). Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 90(12), 1402–5. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01189.x>
- Smith, J. F., Eisenberg, M. L., Glidden, D., Susan, G., Cedars, M., Walsh, T. J., ... Katz, P. P. (2011). Socioeconomic Disparities in the Utilization and Success of Fertility Treatments: Analysis of Data from a Prospective Cohort in the United States. *Fertility and Sterility*, 96(1), 95–101. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.054>. Socioeconomic
- Smith, J. S., Muñoz, N., Herrero, R., Eluf-neto, J., Ngelangel, C., Franceschi, S., ... Peeling, R. W. (2002). Evidence for Chlamydia trachomatis as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, 324–331.
- Souho, T., Benlemlih, M., & Bennani, B. (2015). Human Papillomavirus Infection and Fertility Alteration: A Systematic Review. *Plos One*, 10(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0126936>
- Spandorfer, S. D., Bongiovanni, A. M., Fasioulotis, S., Rosenwaks, Z., Ledger, W. J., & Witkin, S. S. (2006). Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertility and Sterility*, 86(3), 765–7. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.01.051>
- Spiliopoulou, A., Lakiotis, V., Vittoraki, A., Zavou, D., & Mauri, D. (2005). Chlamydia trachomatis: time for screening? *Clinical Microbiology and Infection*, 11(9), 687–689. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01187.x>
- Spinelli, O. M., & Altamirano, E. M. (2003). Efecto citopático por el virus del papiloma humano (HPV). *Revista de La Facultad de*

- Ciencias Médicas*, 1(1), 40–41.
- Stauffer, W. M., Painter, J., Mamo, B., Kaiser, R., Weinberg, M., & Berman, S. (2012). Short Report: Sexually Transmitted Infections in Newly Arrived Refugees: Is Routine Screening for Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis Infection Indicated? *Am J Trop Mol Hyg*, 86(2), 292–295. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0527>
- Stephens, A. J., Aubuchon, M., & Schust, D. J. (2011). Antichlamydial Antibodies, Human Fertility, and Pregnancy Wastage. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2011. <http://doi.org/10.1155/2011/525182>
- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., ... Davis, R. W. (1998). Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: Chlamydia trachomatis. *Science*, 282, 754–759. <http://doi.org/10.1126/science.282.5389.754>
- Suneeta, M., Lakhbir, D., Sanjeev, S., Sanjay, C., Garg, B. S., & Singh, N. (2012). Infertility. *Obstetrics and Gynecology International*, 2012, 1–2. <http://doi.org/10.1155/2012/508276>
- Tamim, H., Finan, R. R., Sharida, H. E., Rashid, M., & Almawi, W. Y. (2002). Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and chlamydia trachomatis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43(4), 277–281. [http://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00403-0](http://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00403-0)
- Tarín, J. J., García-pérez, M. A., Hamatani, T., & Cano, A. (2015). Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single meta-diseases. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(31), 1–11. <http://doi.org/10.1186/s12958-015-0029-9>
- Taylor Robinson, D. (1997). Evaluation and comparison of tests to diagnose Chlamydia trachomatis genital infections. *Human Reproduction*, 12(11), 113 – 120.
- Taylor, B. D., Darville, T., & Haggerty, C. L. (2013). Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease? *Sex Transm Dis*, 40(2), 117–122. <http://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31827c5a5b>
- Tosun, I., Cihanyurdu, M., Kaklikkaya, N., Topbas, M., Aydin, F., & Erturk, M. (2008). Asymptomatic Chlamydia trachomatis infection and predictive criteria among low-risk women in a primary care setting. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61(3), 216–218.
- van Bergen, J., Götz, H. M., Richardus, J. H., Hoebe, C. J. P. a, Broer, J., & Coenen, a J. T. (2005). Prevalence of urogenital Chlamydia trachomatis increases significantly with level of urbanisation and suggests targeted screening approaches: results from the first national population based study in the Netherlands. *Sexually Transmitted Infections*, 81(1), 17–23. <http://doi.org/10.1136/sti.2004.010173>
- van Oostrum, N., De Sutter, P., Meys, J., &

- Verstraelen, H. (2013). Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 28(7), 1809–15. <http://doi.org/10.1093/humrep/det096>
- Vanderpool, R., Jones, M. G., Stradtman, L. R., Smith, J. S., & Crosby, R. (2014). Self-collecting a cervico-vaginal specimen for cervical cancer screening: An exploratory study of acceptability among medically underserved women in rural Appalachia. *Gynecol Oncol*, 132(1), 21–25. <http://doi.org/10.14440/jbm.2015.54.A>
- Venezuela, R. F., Kiguen, A. X., Frutos, M. C., & Cuffini, C. G. (2012). Circulation of human papillomavirus (HPV) genotypes in women from Córdoba, Argentina, with squamous intraepithelial lesions. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(1), 11–16. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652012000100003>
- Verghese, S., Padmaja, P., Asha, M., Elizabeth, S. J., Anitha, A., Kundavi, K. M., ... Varma, T. (2001). Prevalence, species distribution and antifungal sensitivity of vaginal yeasts in infertile women. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 44(3), 313–314. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=12024920>
- Verma, S., Dhole, T. N., Kumar, M., & Kashyap, S. (2013). Novel approach for improving sensitivity of microscopic detection of acid-fast bacilli (AFB) by use of the Reaslr method. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), 3597–3601. <http://doi.org/10.1128/JCM.01570-13>
- Vigil, P., Tapia, A., Zacharias, S., Riquelme, R., Salgado, A. M., & Varleta, J. (2002). First-trimester pregnancy loss and active Chlamydia trachomatis infection: correlation and ultrastructural evidence. *Andrologia*, 34, 373–378.
- Vinodhini, K., Shanmughapriya, S., Das, B. C., & Natarajaseenivasan, K. (2012). Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(3), 771–777. <http://doi.org/10.1007/s00404-011-2155-8>
- Wah, R., Anderson, D., & Hill, J. (1990). Asymptomatic cervicovaginal leukocytosis in infertile women. *Fertility and Sterility*, 54(3), 445–450.
- Wang, Z., Rui, T., Yang, M., Valiyeva, F., & Kvietys, P. R. (2008). Alveolar macrophages from septic mice promote polymorphonuclear leukocyte transendothelial migration via an endothelial cell Src kinase/NADPH oxidase pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(12), 8735–44. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8735>
- Wilkes, S., Chinn, D. J., Murdoch, A., & Rubin, G. (2009). Epidemiology and management of infertility: a population-based study in UK primary care, (June), 0–5. <http://doi.org/10.1093/fampra/cmp029>

- Wilson, L. E., Pawlita, M., Castle, P. E., Waterboer, T., Sahasrabudde, V., Gravitt, P. E., ... Wentzensen, N. (2013). Natural immune responses against eight oncogenic human papillomaviruses in the ASCUS-LSIL triage study. *Int. J. Cancer*, *133*(9), 2172–2181.
<http://doi.org/10.1002/ijc.28215>.Natural
- Yang, Y., Jia, C., Ma, Y., Zhou, L., & Wang, S. (2013). Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian Journal of Andrology*, *15*(4), 529–532.
<http://doi.org/10.1038/aja.2013.36>
- Yoneda, C., Dawson, C. R., Daghfous, T., Hoshiwara, I., Jones, P., Messadi, M., & Schachter, J. (1975). Cytology as a guide to the presence of chlamydial inclusions in Giemsa-stained conjunctival smears in severe endemic trachoma. *Brit J Ophthal*, (1 975).
- Yuce, K., Pinar, A., Salman, M. C., Alp, A., Sayal, B., Dogan, S., & Hascelik, G. (2012). Detection and genotyping of cervical HPV with simultaneous cervical cytology in Turkish women: A hospital-based study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *286*(1), 203–208.
<http://doi.org/10.1007/s00404-012-2280-z>
- Zander, B. Y. E. (1937). Changes in Blood Vessels (Capillary Fragility) With Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, *66*(5), 637–651.
- Zhang, L., & Wang, C. C. (2014). Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, *13*(2), 138–152.
[http://doi.org/10.1016/s1499-3872\(14\)60024-2](http://doi.org/10.1016/s1499-3872(14)60024-2)
- Zhang, M., Shi, Z., Yu, J., Zhang, Y.-P., Wang, L.-G., & Qiu, Y. (2015). Scrotal heat stress causes sperm chromatin damage and cysteinyl aspartate-specific proteinases 3 changes in fertile men. *J Assist Reprod Genet*, *32*, 747–755.
<http://doi.org/10.1007/s10815-015-0451-0>
- Zuo, Z., Goel, S., & Carter, J. E. (2011). Association of Cervical Cytology and HPV DNA Status and Preterm Birth. *American Journal of Clinical Pathology*, *136*, 260–265.
<http://doi.org/10.1309/AJCP93JMIUEKRPIW>