



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA
INMUNITARIO EN CITOLOGÍAS CERVICALES Y SU
CORRELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR EL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

T E S I S I N A

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

P R E S E N T A:

Q.F.B. ENRIQUE DE LEÓN LARA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO
2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice	
Abreviaturas	2
Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 Prevalencia del cáncer cervicouterino	4
1.2 Características del agente etiológico	6
1.3 Respuesta inmunitaria contra la infección por VPH	9
1.3.1 Papel de la respuesta inmunitaria innata y su evasión por el VPH	10
1.3.2 Papel de la respuesta inmunitaria adaptativa y su evasión por el VPH	11
1.4 Estrategias para prevenir el CaCu	13
2. Planteamiento del problema	15
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos particulares	18
6. Material y métodos	20
6.1 Criterios de inclusión	20
6.2 Criterios de no inclusión	21
6.3 Criterios de eliminación	21
6.4 Metodología	21
7. Resultados	26
8. Discusión de resultados	33
9. Conclusión	37
10. Referencias	38
11. Anexos	43

Abreviaturas

ADCC:	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
APC:	Célula presentadora de antígeno
APC:	Aloficoeritrina
ARN:	Ácido Ribonucleico
CaCu:	Cáncer cervicouterino
CD:	Cluster de diferenciación
CTL:	Linfocito T citotóxico
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
IARC:	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IFN:	Interferon
IL:	Interleucina
IRF-1:	Factor regulador de interferón 1
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad
MyD88:	Factor de diferenciación mieloides 88
NK:	Asesina natural
NLR:	Receptor tipo Nod
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PAMP:	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PE:	Ficoeritrina
PerCP:	Proteína clorófila peridina
PDZ:	Motivo de proteína de desnidad postsináptica, proteína supresora de tumores en Drosophila y proteína zonula occludens-1
RLR:	Receptor tipo Rig
STAT:	Transductor de señal y activador de la transcripción
TRIF:	Adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN beta
TGF:	Factor de crecimiento transformante
Th:	Linfocito T cooperador
TLR:	Receptor tipo Toll
TNF:	Factor de necrosis tumoral
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH:	Virus del Papiloma Humano
VPH-BR:	Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo
VPH-AR:	Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las principales enfermedades que afecta a las mujeres a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año se diagnostican aproximadamente 500,000 nuevos casos de este padecimiento, la mayoría en países en vías de desarrollo. Actualmente se reconoce que la infección persistente por los Virus del Papiloma Humano (VPH), especialmente los VPH de alto riesgo (VPH-AR), es la causa necesaria para el desarrollo de CaCu. Se estima que alrededor del 80% de las mujeres de la población mundial sufrirá un episodio de infección por VPH a lo largo de su vida. Sin embargo, la mayor parte de estas infecciones no evolucionarán a cáncer, ya que el Sistema Inmunológico juega un papel importante para evitar el desarrollo de la enfermedad. En este estudio se evaluó mediante citometría de flujo la frecuencia de linfocitos, monocitos y células asesinas naturales (NK) en citologías cervicales de mujeres con y sin infección por VPH, y se observó que los VPH-AR son los que se presentan con mayor frecuencia (7.1%), además la frecuencia de monocitos y células NK en estas pacientes es menor en comparación con las pacientes que no presentan infección o presentan VPH de bajo riesgo (VPH-BR). En conclusión la infección por VPH-AR induce un pobre reclutamiento de células NK y macrófagos, pero no afecta a la cantidad de linfocitos B, linfocitos T cooperadores y citotóxicos, por otra parte las pacientes co-infectadas presentan un mejor reclutamiento de células del Sistema Inmunológico que aquellas que solo presentan VPH-AR.

1. Introducción

1.1. Prevalencia del cáncer cervicouterino

A nivel mundial el cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo más frecuente en mujeres y la tercera causa de muerte debido a cáncer en mujeres a nivel mundial.¹ Según la OMS cada año se diagnostican aproximadamente 500,000 nuevos casos de este padecimiento, y se registran alrededor de 280,000 defunciones por esta enfermedad y cerca del 95% de estas son en países en vías de desarrollo.² Afecta raramente a mujeres menores de 30 años; es más frecuente en mujeres de 40 años pero el mayor número de fallecimientos se registra entre la población femenina de 50 a 60 años.³

Uno de los descubrimientos más importantes de los últimos 30 años fue el descubrimiento de la relación entre las infecciones por el Virus del Papiloma Humano (VPH) y CaCu mediante la identificación, clonación y secuenciación de dos genotipos importantes de VPH, el 16 y el 18, en muestras de tejido con cáncer cervical.⁴ Actualmente, se reconoce que la infección persistente por el VPH es causa necesaria para el desarrollo de CaCu, ya que se ha observado que en casi el 100% de los casos de CaCu se tiene la presencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) del virus⁵; sin embargo no todas las mujeres presentan CaCu. A la fecha se han identificado más de 120 genotipos diferentes del virus y más de 40 de estos genotipos infecta el revestimiento del tracto anogenital.^{6,7} Los VPH se clasifican de acuerdo a la homología genética entre las secuencias de nucleótidos de la proteína L1⁶ en 3 grupos; en el supergrupo A, también conocido como papilomavirus tipo alfa, se encuentran los virus que se transmiten de manera

sexual. El segundo grupo más importante de VPH se encuentra en el supergrupo B, los virus del subgrupo B1 toman importancia en las personas inmunosuprimidas, por el contrario los virus del subgrupo B2 causan verrugas cutáneas semejantes superficialmente a las causadas por los virus del supergrupo A.⁸

Los virus mucoso/genitales pertenecientes al supergrupo A, se pueden dividir dependiendo de su presencia o no en lesiones malignas en: no oncogénicos también nombrados VPH de bajo riesgo (VPH-BR) y en potencialmente oncogénicos o VPH de alto riesgo (VPH-AR)⁹ Entre los genotipos de alto riesgo destacan el 16 y el 18 siendo los que se encuentran con mayor frecuencia en los tumores, que en conjunto causan el 70-75% de todos los casos de CaCu¹⁰, además se conocen otros 13 genotipos de alto riesgo los cuales son: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Los genotipos de bajo riesgo que causan displasia de bajo grado y verrugas genitales son: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, y 81⁹

A pesar de que es necesaria la infección por VPH no es el único factor que influye en el desarrollo de cáncer ya que se estima que aproximadamente el 80% de la población mundial sufrirá un episodio de infección por VPH a lo largo de su vida. Sin embargo, la mayor parte de estas infecciones no evolucionaran a cáncer, existen otros factores tales como: el uso de anticonceptivos orales, alta paridad, el consumo de tabaco así como la co-infección con otros agentes infecciosos transmitidos por contacto sexual, como son Herpes virus tipo 2, Virus de inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros.¹¹

En México no hay registros que indiquen con certeza la prevalencia de infección por VPH o de la incidencia de CaCu, pero se estima que por cada 100,000 mujeres 30-45% presentan la enfermedad.² En un estudio realizado en pacientes con citología cervical normal se encontró que los genotipos de alto riesgo más frecuentes en mujeres mexicanas son: 16, 18, 31, 33 y 58, mientras que los de bajo riesgo los genotipos más frecuentes son el 6 y el 11. Por otra parte en citologías de mujeres con lesiones cervicales los genotipos de alto riesgo de VPH que se han reportado son 16, 31, 35, 52, 58, 33, 18, 45, 59, 39, y 56; y de bajo riesgo los genotipos 70, 11, y 6b, además de otros dos genotipos que podrían ser de alto riesgo 66 y 53.^{12,13}

En mujeres menores a 25 años con citología cervical normal se ha encontrado ADN de VPH en el 16.7% de las pacientes teniendo mayor prevalencia los VPH de alto riesgo (16.4%), en mujeres entre 35 y 44 años solo el 3.7%, en mujeres entre 45 y 54 años vuelve a subir la presencia de ADN del virus a 12.3%, teniendo un pico máximo de 23% en mujeres de 65 años o mayores, al igual que en las mujeres más jóvenes el tipo de VPH es de alto riesgo. Este último aumento en la frecuencia es característico de los países latinoamericanos.¹²

1.2. Características del agente etiológico

El VPH es un virus no envuelto perteneciente a la familia *Papillomaviridae*, de ADN de doble cadena de aproximadamente 8 kb, el ADN viral se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR) que no contiene marco de lectura, la región de las proteínas tempranas (E1 a E8) implicadas en la replicación y

regulación viral y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) que conforman la cápside viral.¹⁴

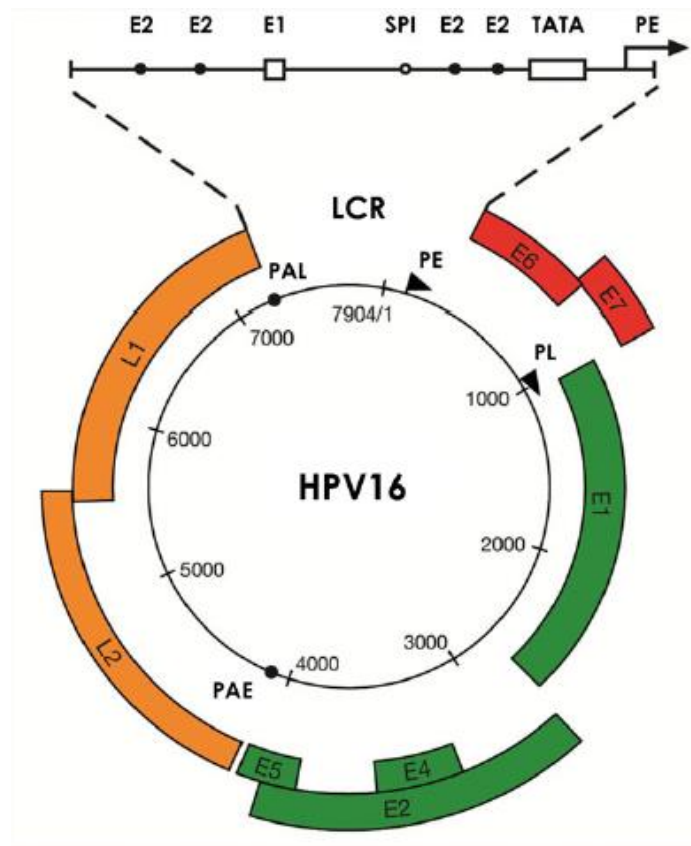


Figura 1. Organización genómica de un VPH de alto riesgo, VPH-16, se muestran los 8 genes necesarios para las diferentes etapas del ciclo de vida del virus y la región larga de control LCR. Tomado de Doorbar J. et al. 2012¹⁴

En el ciclo de vida normal de VPH para que se lleve a cabo la infección se necesita que ingresen a la lámina basal del tejido partículas virales (compuestas por DNA y las proteínas L1 y L2). En muchos casos se piensa que la infección necesita de lesiones o micro lesiones que permitan la entrada de los virus a la lámina basal y del proceso de reparación para que se pueda insertar el genoma viral al núcleo de los queratinocitos e iniciar la replicación. Los virus se unen a su

célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula $\alpha 6$ -integrina. Una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El ADN viral permanece fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular, esto es llamado estado episomal.¹⁵

Se piensa que la primera fase de la infección es la amplificación del genoma y posteriormente se mantiene el episoma viral en un número pequeño de copias, las proteínas E1 y E2 son esenciales para esta fase. Por otra parte las proteínas E6 y E7 juegan un papel importante en propiciar la proliferación celular en las placas basales y parabasales, además de la inmortalización celular debido a la inhibición de la apoptosis. Estas proteínas a pesar de guardar grandes similitudes entre las sintetizadas por los VPH de alto riesgo y los VPH de bajo riesgo existen diferencias notables, ya que las proteínas E6 y E7 de los VPH de bajo riesgo no causan la inmortalización celular.¹⁶

Una de las características más estudiadas acerca de la proteína E6 de los VPH de alto riesgo es su capacidad de transformar células normales en células malignas por diversos mecanismos como la degradación de p53 (proteína importante en la regulación del ciclo celular) mediante su ubiquitinación y posterior proteólisis en el proteasoma, activar las telomerasas de transcripción reversa, enzima que mantiene la integridad de los telómeros, además de la unión a motivos PDZ involucrados en la regulación y señalización celular. En cuanto a la proteína E7 de los VPH de alto riesgo se considera como una proteína muy eficiente para desregular el ciclo celular uniéndose a las proteínas de la familia de Retinoblastoma (pRb)¹⁷

Las proteínas E6 y E5 promueven la replicación del genoma modificando el microambiente celular. E5 es una proteína que atraviesa tres veces la membrana celular, se cree que tiene la capacidad de formar poros e interferir con la apoptosis y el tráfico de las vesículas endocíticas. E4 se encuentra en grandes concentraciones en células que llevan a cabo la síntesis viral. Por lo que su función está relacionada a la liberación de los virus o transmisión. Por último el ciclo de vida del VPH termina con la expresión de las proteínas L1 y L2, la salida de la célula del ciclo celular y el empaquetamiento del genoma viral llevado a cabo por el reclutamiento de L1 y L2 por medio de E2 para formar la cápside en forma de icosaedro.^{14,18}

1.3. Respuesta inmunitaria contra la infección por VPH

Normalmente la mayoría de las infecciones por el VPH son resueltas de manera exitosa por las pacientes inmunocompetentes, participando los dos brazos efectores de la respuesta inmunitaria: la respuesta inmunitaria innata que es la primera línea de defensa en contra del virus ya que ésta es activada cuando el tejido es dañado, se produce inflamación o si se lleva a cabo el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); el otro componente importante es la inmunidad adaptativa en donde participan de manera importante en la respuesta celular, células T tanto cooperadoras (Th) como citotóxicas (CTL) y en la respuesta humoral las células plasmáticas encargadas de la producción de anticuerpos.¹⁹

1.3.1. Papel de la respuesta inmunitaria innata y su evasión por el VPH

Las células infectadas por virus normalmente liberan interferón tipo I (IFN-I) como IFN- α e IFN- β , moléculas que actúan de manera autócrina o parácrina encargadas de inhibir la replicación viral en las células huésped y activar a las células NK.²⁰ Se ha demostrado que las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo inhiben la síntesis de IFN-I, mediante la interrupción de las vías de señalización mediadas por factores de transcripción transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) inactivando a factores de transcripción como el factor regulador de interferón 1 (IRF-1) esta ausencia de IFN-I provoca la inhibición de las células NK y propicia la progresión de la infección.²¹ Como mecanismo de evasión los virus pueden reducir la expresión de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad, esta disminución es detectada por las células NK, las cuales provocarían la muerte de las células infectadas; en las infecciones por VPH la proteína E7 inhibe este tipo de lisis gracias a que restaura la expresión de MHC-I.¹⁹

Los macrófagos son otras células participantes de la respuesta inmunitaria innata que son activadas por el reconocimiento de componentes virales, que actúan como PAMP's, como son el ADN de cadena sencilla o ARN. Estos componentes son reconocidos vía los Receptores Tipo Toll (TLR), principalmente TLR9 que reconoce ADN, y los receptores TLR3 y TLR7 que reconocen ARN de cadena doble y cadena sencilla respectivamente²², también participan los Receptores tipo Rig (RLR) que reconocen, entre otros PAMP's intracelulares, ácido ribonucleico (ARN).²³ La unión de los TLR con sus ligandos da lugar a la activación de varias vías de transmisión de señales; TLR3 transmite señales a través del adaptador

Inductor de interferón que contiene el dominio TIR (TRIF) que activa a IRF3 e induce la expresión de interferones tipo I. Mientras que los TLR7 y TLR9 envían señales a través de una vía dependiente del factor de Diferenciación Mieloide 88 (MyD88) que activa el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) el cual induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas.²⁴ Los macrófagos también pueden ser activados por estas citocinas provocando la secreción de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otras citocinas y quimiocinas, estas moléculas son importantes para la inducción de inflamación y reclutamiento celular en el sitio de infección. Los macrófagos activados también pueden cooperar con la respuesta adaptativa, mediante la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). La proteína E6 de los VPH de alto riesgo puede bloquear la participación de los macrófagos mediante la inhibición de la síntesis en los queratinocitos de la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la proteína inflamatoria de macrófagos 3α ((MIP)- 3α) encargadas del reclutamiento de macrófagos en el sitio de infección, además se ha observado que E6 es capaz de inhibir la señalización vía los receptores TLR3, TLR9 y RLR's inhibiendo la fosforilación de STAT o relocalizando a STAT desde el núcleo y también evita la dimerización de IRF-3.^{19,25,26}

1.3.2. Papel de la respuesta inmunitaria adaptativa y su evasión por el VPH

A pesar de la gran capacidad del sistema inmunológico de eliminar a un agente patógeno, el VPH cuenta con diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria adaptativa, uno de los principales es el ciclo natural de replicación del virus ya que las proteínas tempranas se producen en los queratinocitos de la

lámina basal y no hay lisis de estas células, lo que provoca que a las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) que son el puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (células de Langerhans y macrófagos) les sea imposible reconocer los antígenos virales y presentarlos a las células T. Se presume que los antígenos serán accesibles para las APC cuando hay una microlesión debido a una infección bacteriana o al contacto sexual, una vez ocurrido esto las APC podrán endocitar el antígeno viral, madurar y presentar los péptidos virales a CTL o Th, volviéndolas células efectoras, todo esto con el requisito previo de que se establezca un microambiente inflamatorio que es propicio para la expresión de moléculas co-estimuladoras como B7.1 y B7.2 por parte de las APC.²⁷

Sorprendentemente las APC que son expuestas a la proteína L1 de VPH-AR no provocan una respuesta inmunitaria en contra del virus por el contrario inducen tolerancia lo que representa un mecanismo más de evasión de la respuesta inmunitaria,²⁸ ya que no habrá la diferenciación de las células Th vírgenes hacia linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) que son células productoras de IFN- γ (esencial para la activación de macrófagos) o T cooperadores tipo 2 (Th2) que son células encargadas de la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (inducen respuesta humoral). La inducción de tolerancia involucra la expresión de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por las DC,²⁹ esta enzima se encarga del metabolismo de triptófano, de esta manera inhibe la proliferación celular de los linfocitos T³⁰; por otra parte la presencia de IL-10 y de células reguladoras como linfocitos T reguladores (Treg) que expresan un inmunofenotipo CD3+, CD25+, Fox3P+ y linfocitos T reguladores no convencionales Tr-1 (CD4+, CD25-, Fox3P)

que producen factor de crecimiento transformante β (TGF- β), inducen un microambiente anti-inflamatorio evitando la maduración de las DC y su migración al ganglio linfático.²⁸

Los VPH-AR pueden evitar la lisis celular mediada por las CTL debido a que la proteína E5 de estos virus disminuye la expresión de MHC-I (moléculas que presentan péptidos del virus) por parte de las células infectadas.^{18,31}

1.4. Estrategias para prevenir el CaCu

Los programas de cribado son una estrategia de prevención en la que se aplica una prueba a personas asintomáticas para clasificarlas según su probabilidad de padecer una enfermedad. El objetivo de los programas de cribado es reducir la mortalidad e incidencia de CaCu a través del diagnóstico y tratamiento precoz. La citología de Papanicolau (o citología convencional) fue la primera prueba diagnóstica empleada para la detección precoz del CaCu y sigue siendo el método de referencia en la mayor parte de los países europeos.^{32,33}

El Papanicolau consiste en la toma, observación e interpretación de una muestra de células del orificio del cérvix, fondo y saco. Esta prueba exhibe las diferencias morfológicas, de estado de maduración y metabólica de las células gracias a una tinción policromática detectando la presencia de células anormales y neoplásicas. Según los resultados de la revisión sistemática publicada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), los programas organizados de cribado realizados mediante la citología de Papanicolau cada 3-5 años han llevado a reducciones del 70-80% en la incidencia y la mortalidad por cáncer de cérvix en muchos países desarrollados.³⁴

A pesar de aconsejar la citología de Papanicolau como prueba de cribado, las diferentes guías ponen de manifiesto que la citología es una técnica poco reproducible, poco sensible para diagnosticar lesiones de neoplasias cervicales intraepiteliales grado I (NIC1) y que presenta una gran variabilidad en la sensibilidad en el caso de lesiones de alto grado (NIC2). Actualmente se recomienda junto con el Papanicolau la búsqueda y tipo de VPH, alto o bajo riesgo.^{32,33}

Por todo lo anterior en el Laboratorio de Inmunobiología del Hospital Juárez de México (HJM) se evaluó la frecuencia de las poblaciones celulares del Sistema Inmunológico: linfocitos, células NK y macrófagos; en citologías cervicales de mujeres que acudieron al Servicio de Colposcopia y Displasias de dicho hospital y se correlaciono con la ausencia o presencia y genotipo de VPH.

2. Planteamiento del problema

Las infecciones por VPH toman relevancia ya que las pacientes pueden desarrollar CaCu siendo este una de las principales causas de muerte en nuestro país. En México no hay registros que indiquen con certeza la prevalencia de infección por VPH o de la incidencia de CaCu, pero se estima que por cada 100,000 mujeres 30-45% presentan la enfermedad.² Debido a esto es necesario conocer los factores que pueden ocasionar el CaCu, uno de estos factores es el papel que juega el Sistema Inmunológico por lo que en el laboratorio nos preguntamos ¿cuál sería la frecuencia de las poblaciones de células del Sistema Inmunológico presentes en citologías cervicales de mujeres infectadas y no infectadas por VPH?

3. Justificación

Los VPH son causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de cáncer cervicouterino,⁵ ya que el sistema inmunológico juega un papel importante en el desarrollo de una infección persistente debido a un estado de permivisidad inmunitaria. Por lo que es necesario evaluar el estado del sistema inmunológico en el sitio de infección y correlacionarlo con el tipo de VPH infectante, si es de alto o bajo riesgo, así como con las lesiones producidas por la infección, para establecer medidas preventivas en el desarrollo del CaCu.

4. Hipótesis

La infección por virus del VPH de alto riesgo induce un pobre reclutamiento de células de la respuesta inmunitaria (linfocitos, células NK y macrófagos), en comparación con el reclutamiento de células de la respuesta inmunitaria en la infección de VPH de bajo riesgo.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la frecuencia de las células del sistema inmunitario en citologías cervicales, de mujeres que asistan al servicio de colposcopia y displasias del HJM, y correlacionarla con la presencia y tipo de VPH (alto o bajo riesgo).

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de las células NK mediante el inmunofenotipo CD16+, CD56+, en citologías cervicales mediante citometría de flujo multiparamétrica.
- Determinar la frecuencia de macrófagos mediante el inmunofenotipo CD14+, CD16+, HLA-DR+, en citologías cervicales mediante citometría de flujo multiparamétrica.
- Determinar la frecuencia de linfocitos T mediante el inmunofenotipo CD45+, CD3+ en citologías cervicales mediante citometría de flujo multiparamétrica.
- Determinar la frecuencia de células T cooperadoras mediante el inmunofenotipo CD3+, CD4+ en citologías cervicales mediante citometría de flujo multiparamétrica.
- Determinar la frecuencia de linfocitos T citotóxicos mediante el inmunofenotipo CD3+, CD8+, en citologías cervicales mediante citometría de flujo multiparamétrica.

- Determinar la frecuencia de linfocitos B mediante el inmunofenotipo CD45+, CD19+ en citologías cervicales mediante citometría de flujo multiparamétrica.
- Correlacionar la frecuencia de los componentes celulares de la respuesta inmunitaria con la ausencia o presencia de VPH y el tipo de virus, alto o bajo riesgo.

6. Material y métodos

Se realizó un estudio observacional, analítico, transversal y prospectivo de las pacientes que acudieron al servicio de Colposcopia y Displasias del Hospital Juárez de México en el periodo comprendido del 12 de agosto de 2013 hasta el 17 de octubre de 2013 (n = 141), las muestras se agruparon en cuatro grupos dependiendo del tipo de VPH encontrado por el ensayo de genotipificación: a) pacientes sin infección, b) pacientes con infección de VPH-BR, c) pacientes con infección de VPH-AR y d) pacientes con co-infección (infección por dos o más genotipos diferentes de VPH).

6.1. Criterios de inclusión

- Mujeres que asistan a la Unidad de colposcopia y Displasias del Hospital Juárez de México para la realización de papanicolau.
- Mujeres que hayan iniciado vida sexual >18 años de edad.
- Sin antecedente de infección de VPH
- Sin antecedente de tratamientos ablativos y escisionales de cérvix
- Sin antecedente de cáncer cervicouterino
- Que cuenten con citología, colposcopia y biopsia de la unidad de Displasias del HJM.
- Pacientes que acepten el estudio después de haber leído y aceptado la carta de consentimiento bajo información (Anexo 1)

6.2. Criterios de no inclusión

- Mujeres sin inicio de vida sexual activa
- Mujeres < de 18 años
- Con histerectomía total
- Con antecedentes de tratamiento de cérvix
- Antecedentes de CaCu tratado
- Pacientes con sospecha de otra ETS
- Pacientes que no hayan firmado la carta de consentimiento bajo información

6.3. Criterios de eliminación

- Pacientes que decidan retirar su consentimiento informado
- Pacientes que no asistan a la toma de muestra para la genotipificación del VPH y/o análisis de colposcopia.
- Muestra insuficiente para su análisis mediante citometría de flujo multiparamétrica

5.4 Metodología

El cepillo de la citología posterior al extendido de la laminilla se suspendió en 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH=7.2, constituida por: NaCl 8 g/L, Na₂HPO₄ 1.16 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L y KCl 0.2 g/L; posteriormente se agitó el cepillo en el vórtex Maxi Mix Plus (Thermolyne™, Barnstead, EU) durante 10 segundos, para obtener el paquete celular se centrifugó la suspensión celular a 600 g durante 5 minutos a 18 °C en la centrifuga Heraeus™ Megafuge™ (Thermo Scientific™, Langenselbold, GR). Posteriormente se lavó con 2 mL de PBS, se filtró utilizando filtros (BD® Biosciences, San Jose, CA, EU) y se resuspendió el paquete celular

en 200 μ l de PBS. De la suspensión celular se tomaron cuatro alícuotas de 50 μ l cada una, se colocaron en tubos de poliestireno de 5 ml (BD® Biosciences, San Jose, CA, EU) y se adicionaron los anticuerpos monoclonales (BD® Biosciences, San Jose, CA, EU) correspondientes.

Tabla 1. Forma de realizar la tinción con anticuerpos acoplados a fluorocromos de las células.

	Anticuerpo	Fluorocromo*	Dilución	Catálogo
Tubo A	Anti-CD45, anti-CD3, anti-CD19	PerCP, FITC, PE	1:20	
Tubo B	Anti-CD3	PerCP	1:50	
	Anti-CD4	APC	1:50	
	Anti-CD8	PE	1:50	
Tubo C	Anti-CD14	FITC	1:50	
	Anti-(HLA-DR)	PE	1:50	
	Anti-CD56	APC	1:50	
	Anti-CD16	Pe-Cy7	1:100	
Tubo D	_____	_____	_____	_____

**APC alofocianina, FITC isotiocianato de fluoresceina, PE Ficoeritrina, PerCP proteína clorofila peridina, PE-Cy7 Ficoeritrina Cianina 7.*

Después de la adición de los anticuerpos monoclonales se realizó un lavado adicionando 1 mL de PBS y posteriormente se centrifugaron a 600 g por 5 min a 18 °C. Se agregaron 500 μ L de solución fijadora (Lyse Solution, BD® San José, CA EU); posteriormente, se resuspendió el paquete celular en 150 μ L de PBS y

se adquirieron 150 μ L por citometría de flujo en el equipo Accuri C6 (BD® San José, CA EU).

Para el análisis de datos adquiridos se utilizó el programa FlowJo versión 10.0.6 (Tree Star Inc.).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba para datos no paramétricos Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posteriori; $p < 0.05$. El programa utilizado fue GraphPad Prism® versión 5.0 para Windows® (GraphPad Software Inc.).

La frecuencia de células T y B se determinó utilizando la siguiente estrategia de análisis: de una gráfica de puntos utilizando los parámetros de tamaño en altura (FSC-H) contra tamaño en área (FSC-A) se seleccionó el singulete (células no agregadas) (**figura 2a**). De estos eventos se seleccionaron los eventos dobles positivos para CD45 y CD19 que corresponden a las células B (**figura 2b**), y para la población de células T se seleccionaron los eventos dobles positivos para los marcadores CD45 y CD3 (**figura 2c**).

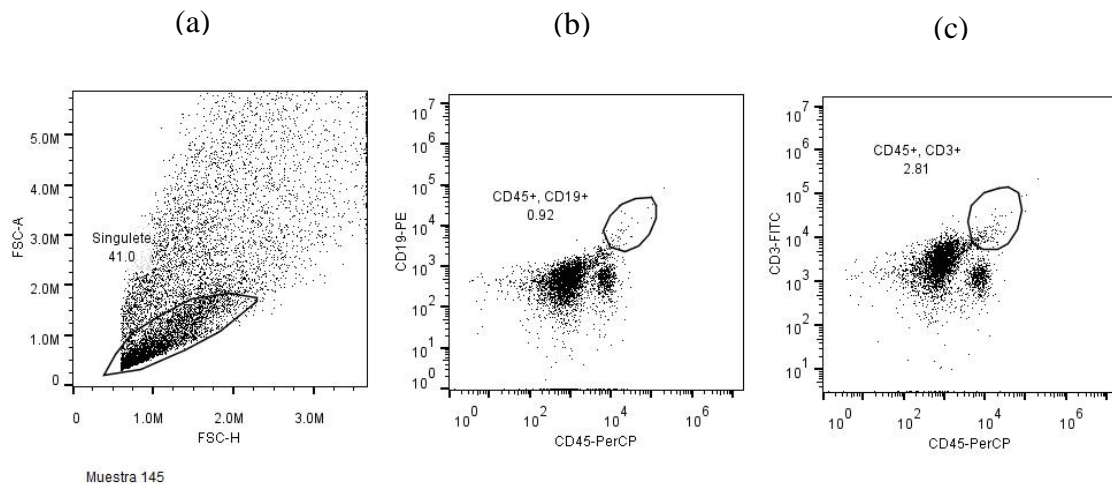


Figura 2. Estrategia de análisis para las poblaciones de linfocitos T y linfocitos B. Células de citología cervical fueron teñidas con anticuerpos: anti-CD45, anti-CD3 y anti-CD19. (a) selección del singlete; (b) subpoblación de linfocitos B y (c) subpoblación de linfocitos T.

Para la determinación de la frecuencia de linfocitos T cooperadores (Th) y linfocitos T citotóxicos (Tc) de la gráfica de \log_{10} de tamaño en altura (FSC-H) contra tamaño en área (FSC-A) se seleccionaron los eventos sencillos (células no agregadas) (**figura 3a**). Posteriormente para identificar a las células Th se seleccionaron los eventos dobles positivos para los marcadores CD3 y CD4 (**figura 3b**), y para las células Tc se seleccionaron los eventos dobles positivos para los marcadores CD3 y CD8 (**figura 3c**).

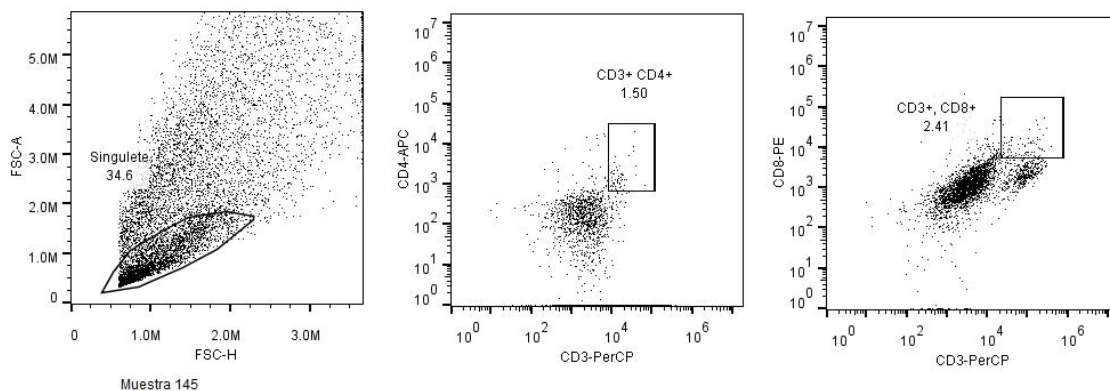


Figura 3. Estrategia de análisis para las poblaciones de células Th y Tc. Células de citología cervical fueron teñidas con anticuerpos: anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. (a) selección de eventos sencillos; (b) subpoblación de Th y (c) subpoblación de Tc.

Por último para determinar las poblaciones de células NK y macrófagos al igual que para las otras poblaciones celulares de la gráfica de puntos de tamaño en altura (FSC-H) contra tamaño en área (FSC-A) se seleccionaron los eventos sencillos (células no agregadas) (**figura 4a**), para los macrófagos se seleccionaron los eventos dobles positivos para los marcadores CD14 y CD16 (figura **4b**); además de estos eventos se buscaron los macrófagos no clásicos, células que expresan los marcadores CD14, CD16 y HLA-DR (**figura 4c**). La población de células NK se determinó a partir de la selección de los eventos dobles positivos para los marcadores CD16 y CD56 (**figura 4d**).

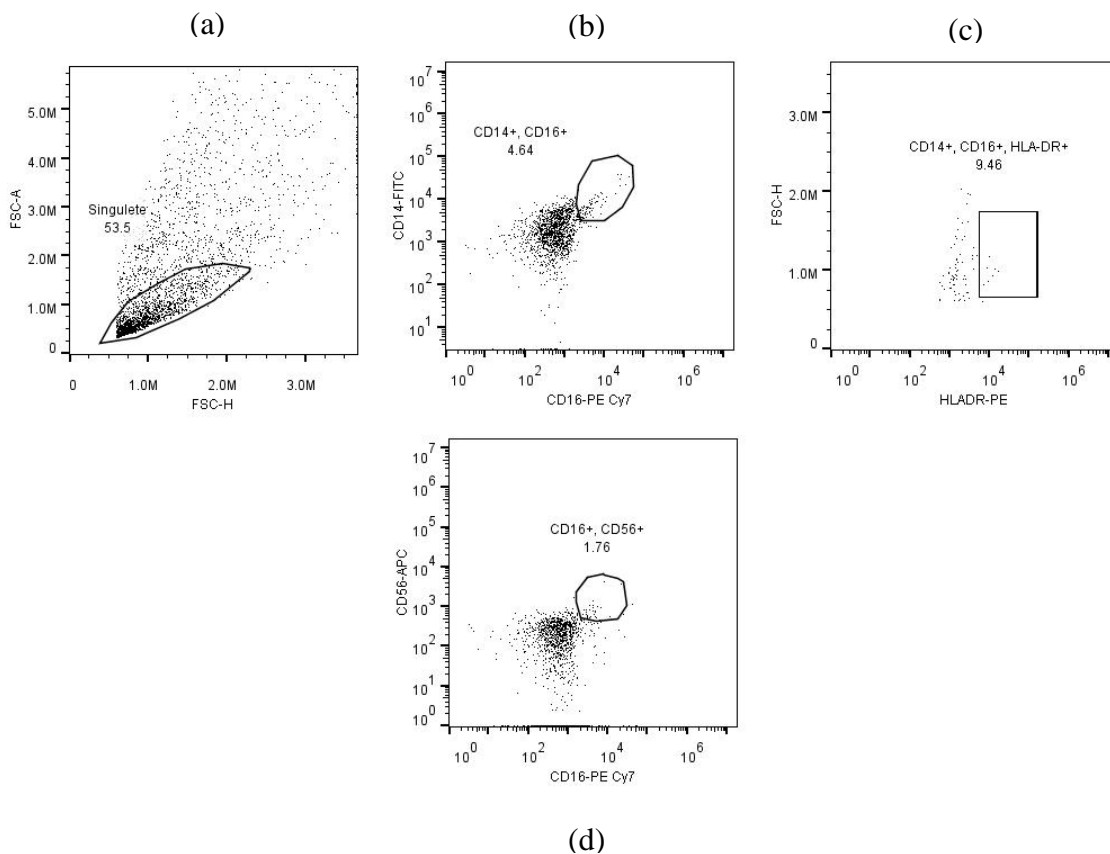


Figura 4. Estrategia de análisis para las poblaciones de macrófagos y células NK. Células de citología cervical fueron teñidas con anticuerpos: anti-CD14, anti-CD16, anti-CD56 y anti-(HLA-DR) (a) selección de eventos sencillos; (b) y (c) corresponden a las regiones de macrófagos y (d) es la región correspondiente a células NK.

7. Resultados

A las muestras que se utilizaron en este estudio para determinar la frecuencia de las células inmunitarias se les realizó un estudio de microarreglos en el laboratorio de genética y biología molecular del HJM para determinar si el tipo de VPH es de alto riesgo o de bajo riesgo, estos resultados se presentan en la tabla 2, en donde se observa que la mayor parte de las pacientes no presentan infección por VPH, mientras que de las pacientes que presentan ADN viral la mayoría corresponde a pacientes con co-infección.

Tabla 2. Resultados de la genotipificación de VPH presente en las citologías cervicales de la población que asistió al servicio de Colposcopia y Displasias del HJM.

	Número de pacientes	Porcentaje
VPH negativo	120	85.1
VPH Alto Riesgo	10	7.1
VPH59	3	
VPH31	3	

VPH58	2	
VPH53	1	
VPH66	1	
Co-infección		
VPH Bajo Riesgo	3	2.1
VPH11	1	
VPH81	1	
VPH84	1	
Co-infección	1	
Co-Infección	8	5.8
VPH11	1	
VPH16	1	
VPH35	1	
VPH39	1	
VPH40	1	
VPH42	1	
VPH45	1	
VPH51	2	
VPH52	2	
VPH53	2	
VPH54	1	
VPH58	2	
VPH59	1	

VPH66	1
VPH84	1

En la **figura 5** se puede observar un aumento en la frecuencia de macrófagos (**A**) al igual que en las células NK (**B**) en el grupo de pacientes positivas a VPH-BR en comparación con el grupo de mujeres VPH negativo. Por otro lado las pacientes VPH-AR positivas presentan una gran disminución en la frecuencia de estas dos poblaciones.

Por otro lado en la **figura 6A** se puede observar la frecuencia de células T en las pacientes que cursan con una infección por VPH-AR presentan una disminución de estas células al igual que las pacientes que presentan VPH-BR pos en comparación con las pacientes VPH-neg. Sorprendentemente las pacientes con co-infección mantienen la misma frecuencia que el grupo de pacientes sin infección. Para el caso de las células B (**figura 6B**) los grupos en los tres grupos se observa una disminución en la frecuencia de estas células en comparación con el grupo de pacientes VPH negativo, pero donde se observa una disminución acentuada en la frecuencia de estas células es en los grupos de pacientes VPH-AR positivo y las pacientes con co-infección.

Para los linfocitos cooperadores (**figura 7A**) se observa una disminución mayor de la frecuencia de células en el grupo de VPH-BR que en los otros grupos, mientras que las pacientes con co-infección aumentaron la cantidad de estas células. Los linfocitos citotóxicos (**figura 7B**) presentan una frecuencia baja en los grupos de pacientes VPH negativo, VPH-AR positivo y VPH-BR positivo mientras que las

pacientes del grupo de co-infección presentan un aumento notable en la frecuencia de estas células.

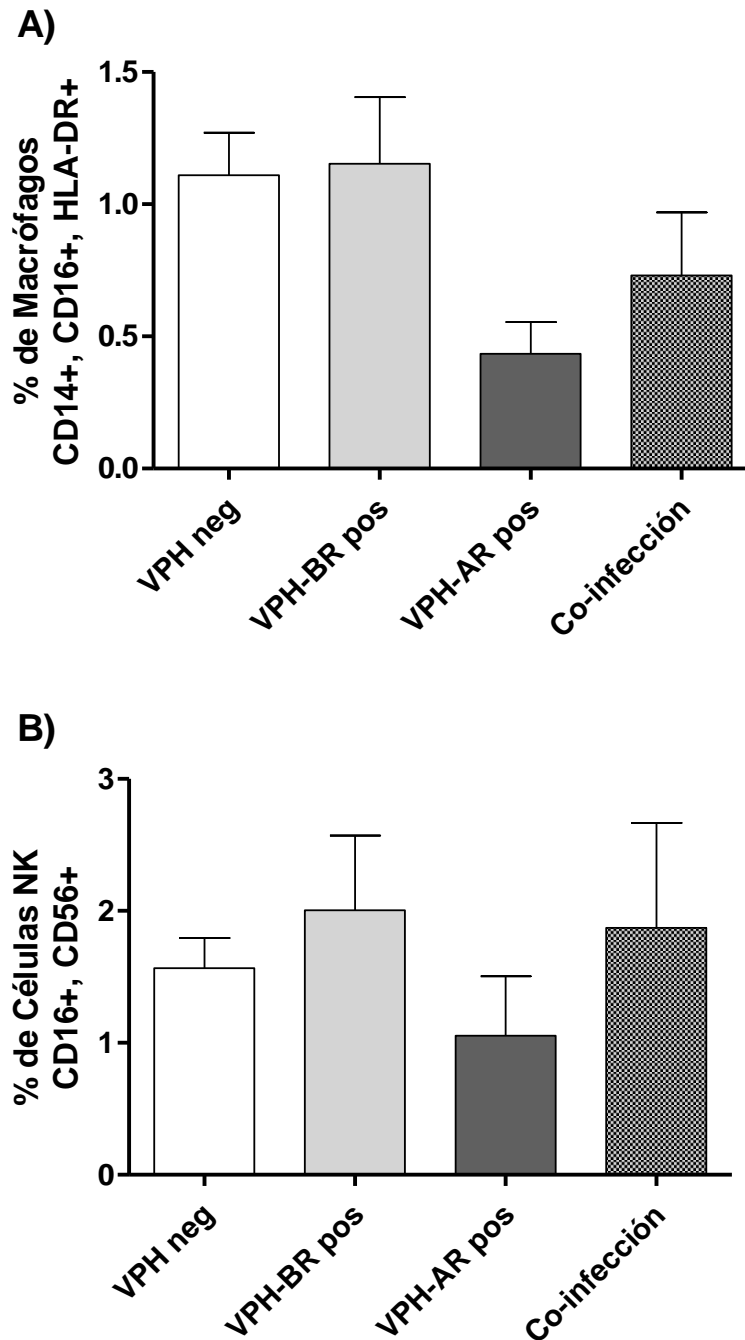


Figura 5. Frecuencias de macrófagos (A) y células NK (B) en citologías cervicales. Se muestra la frecuencia de macrófagos (CD14+, CD16+, HLA-DR+) y células NK (CD16+, CD56+) para los diferentes grupos de pacientes del servicio de colposcopia y displasias del HJM, las pacientes se agruparon en VPH neg, VPH-BR pos, VPH-AR pos y co-infección.

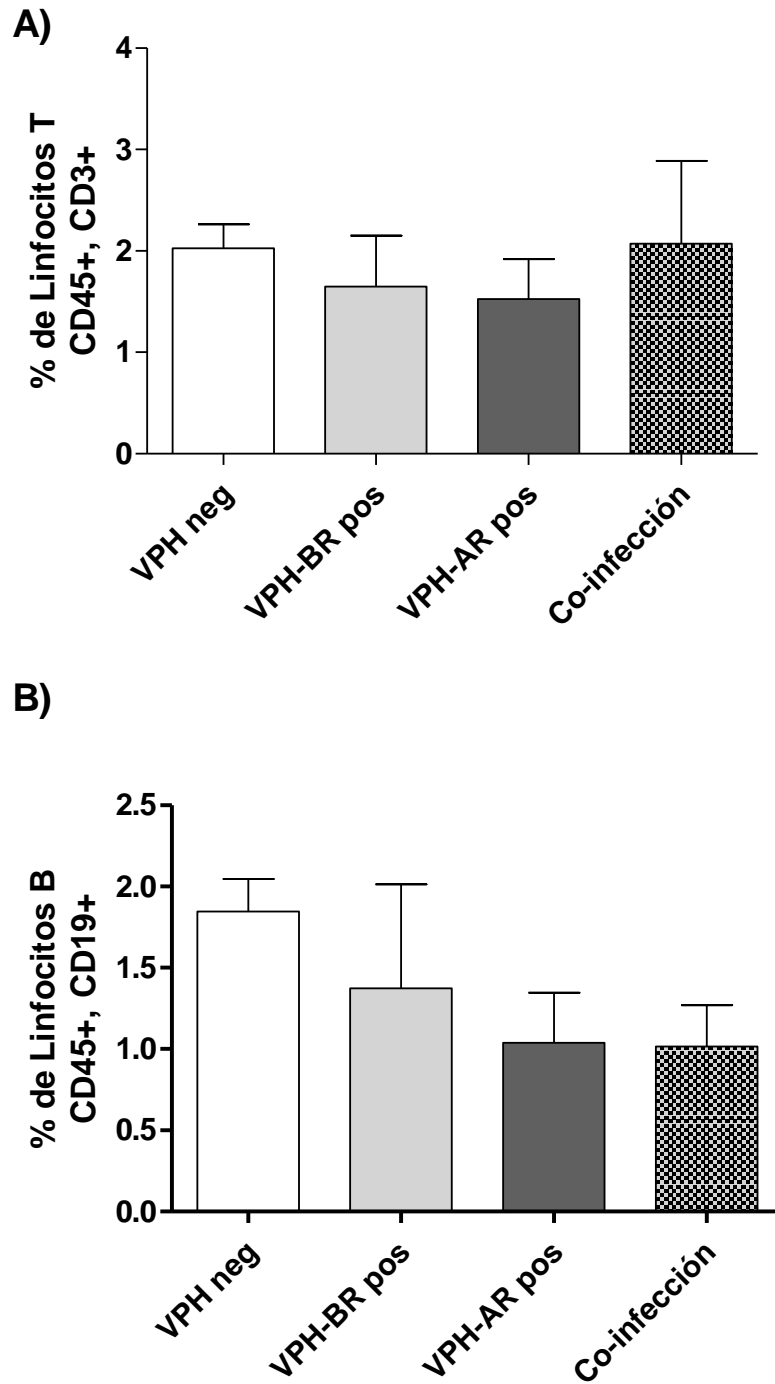


Figura 6. Frecuencias de células T (A) y B (B) en citologías cervicales. Se muestra la frecuencia de células T (CD3+, CD45+) y B (CD19+, CD45+) para los diferentes grupos de pacientes del servicio de colposcopia y displasias del HJM, las pacientes se agruparon en VPH neg, VPH-BR pos, VPH-AR pos y co-infección

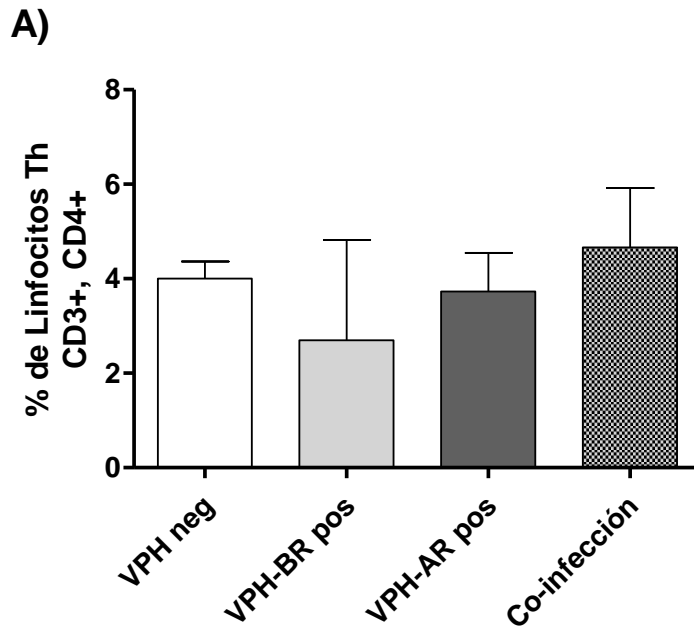
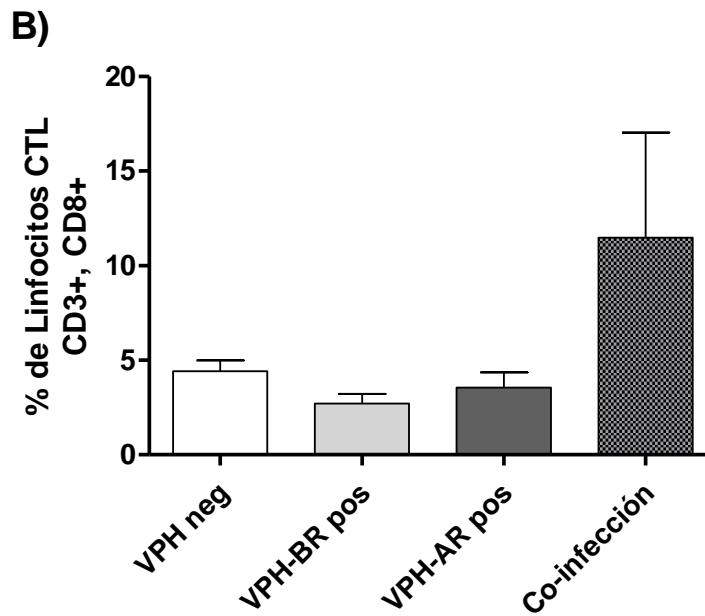


Figura 7.



Frecuencias de células Th (A) y CTL (B) en citologías cervicales. Se muestra la frecuencia de células Th (CD3+, CD4+) y B (CD3+, CD8+) para los diferentes grupos de pacientes del servicio de colposcopia y displasias del HJM, las pacientes se agruparon en VPH neg, VPH-BR pos, VPH-AR pos y co-infección

8. Discusión

Los VPH tienen gran relevancia a nivel mundial ya que la infección persistente por este virus, principalmente los genotipos de alto riesgo debido a los diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria pueden causar CaCu, el cual es el segundo tumor más frecuente entre las mujeres.^{2,5} Para erradicar una infección por VPH-AR se necesitan de 8 a 14 meses, mientras que para las infecciones causadas por VPH-BR 5 a 6 meses.^{35,36}

Los tipos de VPH que se presentan con mayor frecuencia en pacientes diagnosticadas con CaCu son los de alto riesgo y según lo reportado los genotipos más frecuentes en mujeres de América Latina son el 16 y 18 al igual que en el resto del mundo⁹ En nuestros resultados el 15% de las pacientes presentaron ADN viral. Para el caso de los VPH-AR los genotipos más frecuentes fueron VPH-AR 59 y 31, mientras que para VPH-BR solo 3 pacientes fueron positivas y todas con diferente genotipo por lo que no se puede establecer una frecuencia. Curiosamente en este estudio se encontró que la presencia de dos o más genotipos de VPH en la citología es casi igual de frecuente que la presencia de un solo genotipo, además se encontró que puede haber combinación entre VPH-AR y VPH-BR, esto toma importancia debido a que no se tienen reportes de qué tipo de células de él Sistema Inmunológico se están reclutando en estas pacientes y presumiblemente podrían estar llevando a cabo una respuesta inmunitaria diferente a aquellas pacientes en las que solo se presenta VPH-AR o VPH-BR.

Los macrófagos representan un papel importante en la respuesta inmunitaria contra el VPH ya que estas células junto con las células dendríticas son las

primeras que estarán en contacto con el virus estas células producen citocinas indispensables, como TNF- α , y además son las encargadas de formar el puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, y que dependiendo de la manera en que se presente el antígeno a los linfocitos T se dará o no lugar a una respuesta inmunitaria adaptativa que sea capaz de erradicar al virus.¹⁹ Por su parte los VPH-AR son capaces de inhibir las funciones de los macrófagos por diferentes métodos, ya sea impidiendo la activación de NF- κ B bloqueando la señalización por medio de PRR's provocando que no se produzca TNF- α o también impidiendo la síntesis, en los queratinocitos, de MCP-1 y (MIP)-3 α encargadas del reclutamiento celular.²⁶ Para evaluar la frecuencia de macrófagos se utilizaron 3 marcadores diferentes (CD14, CD16 y HLA-DR) debido a que se ha reportado que los queratinocitos incrementan la expresión de HLA-DR entre otros marcadores conforme aumenta la severidad de la enfermedad.⁴⁰ En nuestros resultados se puede observar que en la infección por VPH-AR hay una gran disminución de macrófagos (**figura 5A**) (CD14+, CD16+ HLA-DR+) en comparación con las pacientes con VPH-BR donde se observa una gran cantidad de células, esto correlaciona con lo reportado previamente ya que están actuando los mecanismos de evasión de los VPH-AR. Interesantemente en el laboratorio utilizando el modelo de ratón transgénico que sobre-expresa la proteína E6 o E7 bajo el promotor de citoqueratina K14, se encontró una disminución en el porcentaje de células MHC-II+ (datos no publicados). En las pacientes con co-infección se observa una disminución de estas células en comparación con las pacientes no infectadas.

Las células NK son otras células que forman parte de las primeras líneas de defensa con la que cuenta el organismo en una infección, estas células pueden ser activadas por moléculas como son los IFN-I;²⁰ los VPH-AR pueden evitar la acción de las NK sobre las células infectadas inhibiendo la producción de IFN-I inactivando los factores de transcripción STAT e IRF a través de sus proteínas tempranas E6 y E7.²¹ Esto correlaciona con los resultados obtenidos en los que se observa que hay una disminución de células NK (CD16+, CD56+) (**figura 5B**) en las pacientes infectadas con VPH-AR, mientras que en las pacientes infectadas por VPH-BR se observa un ligero aumento de estas células en comparación con las pacientes no infectadas, al igual que las pacientes con VPH-BR las pacientes con co-infección presentan una gran frecuencia de células NK.

La respuesta inmunitaria adaptativa en contra de los VPH-AR se ve afectada debido a la falta de diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia linfocitos efectores, ocasionado por la desregulación de la respuesta inmunitaria innata por los diversos mecanismos de evasión descritos previamente.^{28,29}

Al analizar los resultados de la frecuencia de células T (CD45+, CD3+) (**figura 6A**) se puede observar que no hay una diferencia significativa entre la frecuencia de células entre los diferentes grupos de pacientes, para los linfocitos B (CD45+, CD19+) (**figura 6B**) se observa algo similar, sin embargo en el grupo de pacientes VPH neg se obtuvo una mayor frecuencia de estas células pero de igual manera sin diferencia significativa para los 4 grupos, por lo que se puede sugerir que no es la frecuencia de células del Sistema Inmunológico lo que define la resolución de la infección.

Como antecedente en verrugas genitales que se encuentran en regresión se ha encontrado un gran infiltrado de linfocitos Th y CTL en comparación con las verrugas que no lo están.³⁷ Se ha demostrado que tanto los linfocitos Th como los CTL juegan un papel importante en la defensa del organismo contra el VPH ya que se observó que los pacientes inmunosuprimidos son más susceptibles a la infección por este virus,³⁸ Al analizar la frecuencia de linfocitos Th (CD3+, CD4+) y CTL's (CD3+, CD8+) (**figura 7**) se observó que en las pacientes positivas para VPH-BR hay una disminución en estas células, esto no se asemeja a lo reportado por Coleman y col.³⁷ pero podría deberse a que apenas se está iniciando la infección ya que las pacientes no son pacientes diagnosticadas con lesiones tumorales o pretumorales por VPH o CaCu

En cuanto a las pacientes con co-infección se observa que hay una mejor respuesta de CTL (**figura 7A**) que de Th (**figura 7B**) lo que puede sugerir que se está llevando a cabo una respuesta inmunitaria eficaz en contra del virus, estos resultados correlacionan con experimentos realizados en ratones con una proteína de fusión fabricada de E6 y E7 de dos genotipos diferentes de VPH-BR (6 y 11) en donde se obtuvo una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de las CTL.³⁹

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los mecanismos de evasión de los VPH-AR en comparación con los VPH-BR afecta principalmente a las células NK y a macrófagos evitando su reclutamiento en el sitio de infección y probablemente inhibiendo los diferentes mecanismos de defensa que tienen estas células, aunque se debe de tomar en cuenta que la cantidad de pacientes que se reporta en cada grupo es muy reducida y es de los primeros estudios de este tipo

realizado en población mexicana por lo que se necesita continuar con el número de pacientes por grupo para tener un resultado más confiable. Por otro lado también se podría suponer que a pesar de que hay relativamente la misma cantidad de linfocitos Th y CTL en las infecciones por VPH-AR y de VPH-BR, en la infección por VPH-BR se encuentre mayor cantidad de células efectoras específicas contra el virus que podrán eliminarlo.

Para terminar de comprender cómo se lleva a cabo la respuesta inmunitaria en las infecciones por los diferentes tipos de VPH y tener un panorama más amplio de lo que está sucediendo en el sitio de infección es necesario evaluar el microambiente establecido en la lesión midiendo la concentración de citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y quimiocinas, así como la activación de las APC y la presencia de células efectoras como son los linfocitos Th y CTL.

9. Conclusión

La infección por VPH-AR induce un pobre reclutamiento de células NK y macrófagos, pero no afecta a la cantidad de linfocitos B, linfocitos Th y CTL en comparación con las pacientes infectadas con VPH-BR y con aquellas que no presentan ADN viral. Las pacientes co-infectadas presentan un mejor reclutamiento de células del Sistema Inmunológico que aquellas que solo presentan VPH-AR.

10. Referencias

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011; 61: 69-90.
- 2 *Control Integral del Cáncer Cervicouterino Guía de prácticas esenciales.* Organización Mundial de la Salud, 2007.
- 3 de MC, Ferlay J, Franceschi S *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 607-15.
- 4 zur HH. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-F78.
- 5 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999; 189: 12-9.
- 6 Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van DK, zur HH, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401: 70-9.
- 7 Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013; 382: 889-99.
- 8 Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 Suppl 1: S7-15.
- 9 Munoz N, Bosch FX, de SS *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 518-27.

- 10 Munoz N, Bosch FX, Castellsague X *et al.* Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer* 2004; 111: 278-85.
- 11 Castellsague X, Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* 2003; 20-8.
- 12 Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N *et al.* Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int. J. Cancer* 2001; 91: 412-20.
- 13 Pina-Sanchez P, Hernandez-Hernandez DM, Lopez-Romero R *et al.* Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2006; 16: 1041-7.
- 14 Doorbar J, Quint W, Banks L *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F55-F70.
- 15 Sanabria Negrin JG. Virus del Papiloma humano. *Revista de Ciencias M+@dicas de Pinar del R+jo* 2009; 13: 168-87.
- 16 Klingelutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology* 2012; 424: 77-98.
- 17 Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 2010; 40: 1-13.

- 18 Campo MS, Graham SV, Cortese MS *et al.* HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 2010; 407: 137-42.
- 19 Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J. Infect. Chemother.* 2012; 18: 807-15.
- 20 Grandvaux N, tenOever BR, Servant MJ, Hiscott J. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002; 15: 259-67.
- 21 Koromilas AE, Li S, Matlashewski G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12: 157-70.
- 22 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 675-80.
- 23 Karim R, Meyers C, Backendorf C *et al.* Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes. *PLoS. One.* 2011; 6: e17848.
- 24 Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* Elsevier, 2012.
- 25 Hibma MH. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. *Open. Virol. J.* 2012; 6: 241-8.
- 26 Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2007; 7: 79-89.

- 27 Patel S, Chiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2009; 21: 54-9.
- 28 Fausch SC, Fahey LM, Da Silva DM, Kast WM. Human papillomavirus can escape immune recognition through Langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. *J. Immunol.* 2005; 174: 7172-8.
- 29 Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal. Immunol.* 2008; 1: 412-20.
- 30 Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 2005; 338: 20-4.
- 31 Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M *et al.* Suppression of transforming growth factor-beta results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury. *J. Hepatol.* 2004; 41: 974-82.
- 32 Blanks RG. ABC3 Part II: a review of the new criteria for evaluating cervical cytology in England. *Cytopathology* 2012; 23: 360-70.
- 33 Leeson SC, Alibegashvili T, Arbyn M *et al.* HPV Testing and Vaccination in Europe. *J. Low Genit. Tract. Dis.* 2013.
- 34 Prorok PC, Chamberlain J, Day NE, Hakama M, Miller AB. UICC Workshop on the evaluation of screening programmes for cancer. *Int. J. Cancer* 1984; 34: 1-4.
- 35 Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* 1999; 180: 1415-23.

36 Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL *et al.* Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. *J. Infect. Dis.* 2002; 186: 462-9.