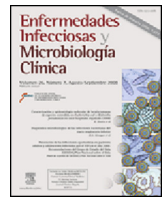




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Expresión de interferón gamma en la infección por el virus del papiloma humano y por *Chlamydia trachomatis* en muestras cervicales



María del Carmen Colín-Ferreya^a, Hugo Mendieta-Zerón^b, María del Socorro Romero-Figueroa^c, Migdania Martínez-Madrigal^d, Sergio Martínez-Pérez^e y María Victoria Domínguez-García^{f,*}

^a Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED), Posgrado en Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

^b Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED), Universidad Autónoma del Estado de México; Asociación Científica Latina (ASCILA) y Ciprés Grupo Médico (CGM), Toluca, México

^c Coordinación del Investigación, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Toluca, México

^d Departamento de Colposcopia, Hospital Materno-Perinatal «Mónica Pretelini», Instituto de Salud del Estado de México (ISEN), Toluca, México

^e Departamento de Colposcopia, Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED), Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

^f Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED), Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de diciembre de 2013

Aceptado el 29 de mayo de 2014

On-line el 23 de diciembre de 2014

Palabras clave:

Virus del papiloma humano
Chlamydia trachomatis
Coinfección
Interferón gamma

R E S U M E N

Introducción: El objetivo del presente trabajo fue medir la expresión de interferón gamma en la infección por VPH y por *Chlamydia trachomatis* en pacientes con lesión intraepitelial escamosa.

Método: Se incluyeron 100 muestras de pacientes diagnosticadas por colposcopia, con y sin lesión intraepitelial escamosa, en quienes se efectuó el diagnóstico de infección por VPH y/o *C. trachomatis*. Se cuantificó la expresión relativa de interferón gamma con la prueba de transcriptasa reversa-PCR en tiempo real (RT-PCR).

Resultados: Las unidades relativas de la expresión de interferón gamma fueron de 13, 1,8 y 0,3 en la coinfección por VPH y *C. trachomatis*, en la infección por VPH y en la infección por *C. trachomatis*, respectivamente.

Conclusión: La infección por VPH y por *C. trachomatis* puede constituir un factor estimulante de la expresión de interferón gamma.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Expression of gamma interferon during HPV and *Chlamydia trachomatis* infection in cervical samples

A B S T R A C T

Introduction: The aim of this study was to measure the expression of gamma interferon in HPV and *Chlamydia trachomatis* infection in squamous intraepithelial lesions.

Method: Samples from 100 patients diagnosed by colposcopy with or without squamous intraepithelial lesions were used in the present study. Each patient was found to be infected by HPV and *C. trachomatis*. Relative gamma interferon mRNA expression was assessed using a real-time reverse transcriptase PCR assay (RT-PCR).

Results: The relative units of expression of gamma interferon mRNA were 13, 1.8 and 0.3, for HPV and *C. trachomatis* co-infection, or HPV or *C. trachomatis* infection, respectively.

Conclusion: HPV and *C. trachomatis* could overstimulate the expression of gamma interferon.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

Human papillomavirus
Chlamydia trachomatis
Co-infection
Gamma interferon

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cicmedarticulos@gmail.com (M.V. Domínguez-García).

Introducción

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) se han asociado a infertilidad y oncogénesis. El virus del papiloma humano (VPH) y la bacteria *Chlamydia trachomatis* son patógenos intracelulares que inhiben la apoptosis de las células que infectan favoreciendo el daño celular¹⁻³. Estos patógenos se asocian al desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) y cáncer cervicouterino (CaCu)⁴⁻⁶.

Se han llevado a cabo diversos estudios cuyos resultados son contradictorios en cuanto a si la infección por VPH y por *C. trachomatis* se asocia o no con el desarrollo de lesiones cancerosas y precancerosas, pues mientras en algunos se ha observado que *C. trachomatis* puede participar como cofactor⁵⁻⁷, otros demuestran que es un factor independiente^{4,8}.

Entre los agentes patógenos que con mayor frecuencia se aíslan de las infecciones cervicales se han identificado los genotipos D, E, F, G, H, I, J y K de *C. trachomatis*⁹ y se han registrado 40 genotipos del VPH, entre ellos el 16 y el 18, considerados de alto riesgo¹⁰⁻¹².

Los interferones son citoquinas que participan en la defensa contra agentes patógenos. El interferón gamma (IFN- γ), secretado principalmente por células T y por células asesinas naturales, es un agente antiviral que participa en la estimulación de los fagocitos en su actividad bactericida. Se ha sugerido que la expresión de IFN- γ aumenta en tejidos con neoplasias intraepiteliales, observándose que cuanto más severa sea la lesión, más aumenta su expresión¹³, mientras que en el CaCu disminuye¹⁴. Se ha demostrado también *in vitro* que el IFN- γ inhibe el crecimiento de *C. trachomatis*¹⁵ y que la infección por VPH aumenta su expresión¹⁶. Sin embargo, se precisan estudios que permitan comprender el efecto de la coinfección de ambos patógenos sobre la expresión de IFN- γ .

Basado en las observaciones anteriores, el objetivo del presente estudio fue identificar el patrón de expresión de IFN- γ en la infección por VPH y por *C. trachomatis* en pacientes con LIE. Los resultados de esta investigación sugieren que la coinfección de estos patógenos podría tener un efecto aditivo a la expresión de IFN- γ .

Métodos

Pacientes a estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo con 77 mujeres con LIE, siguiendo las instrucciones del comité de bioética del Centro de Investigación en Ciencias Médicas (Universidad Autónoma del Estado de México) de aprobación (carta de consentimiento informado) y privacidad de las pacientes participantes en estudios científicos. Las pacientes fueron atendidas en los servicios de colposcopia del Hospital Materno Perinatal (Instituto de Salud del Estado de México), en la clínica 221 (Instituto Mexicano del Seguro Social) y en el Centro de Investigación en Ciencias Médicas (Universidad Autónoma del Estado de México) de la ciudad de Toluca, estado de México. Los criterios de inclusión fueron: a) diagnóstico clínico de LIE, b) no estar sujetas a tratamiento farmacológico o antiinflamatorio, y c) que no hubiese embarazo. Como controles de la expresión de IFN- γ se incluyeron 23 mujeres sin LIE que acudieron al consultorio para revisión médica sin presentar ninguna enfermedad ni síntomas específicos y que aceptaron participar en el estudio.

Se obtuvieron muestras de células de raspado cervical con un cepillo endocervical (*Cervex-brush*[®], Países Bajos) y se colocaron en 20 ml en una solución de «transporte y conservación» (*ThinPrep*[®] *PreservCyt*[®] *Solution Hologic*TM *Marlborough*, Massachusetts, EE. UU.), como se ha descrito en estudios previos^{17,18}, y se guardaron a -70°C hasta que fueron analizadas.

Diagnóstico de virus del papiloma humano

La genotipificación del VPH se realizó con el sistema Linear Array HPV Genotyping Assay (Roche[®], Mannheim, Alemania) como se ha descrito previamente. Esta prueba emplea cebadores biotinados para identificar una secuencia de nucleótidos dentro de la región L1 polimórfica del VPH, por medio de extracción del ADN viral, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación¹⁹. Los genotipos identificados en esta prueba son 37 (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 y CP6108)^{19,20}.

Diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*

El ADN de la muestra de raspado cervical fue extraído con el ensayo Magna Pure LC DNA isolation (Roche[®] Mannheim, Alemania) en el sistema MagNA Pure LC 2.0 (Roche[®] Penzberg, Alemania). La pureza y la concentración del ADN se midió a 260/280 nm con un NanoPhotometerTM UV/Vis Spectrophotometer (Implen[®] Schatzbogen, Alemania). La amplificación del ADN se llevó a cabo por PCR en tiempo real con sondas TaqMan, con el ensayo *Chlamydia trachomatis*-Real Time (Genekam Biotechnology[®], Alemania) usando un termociclador Applied Biosystems 7500 fast real time PCR systems[®] (Foster City, EE. UU.). Cada ciclo de amplificación del PCR en tiempo real consistió en 15 s a 95°C y 6 s a 60°C . Se llevaron a cabo 45 ciclos, siguiendo las instrucciones del fabricante²¹.

Cuantificación del interferón gamma

La extracción de ARN se efectuó con el ensayo Magna Pure LC RNA Isolation Kit III (Roche[®], Mannheim, Alemania) usando el sistema MagNA Pure LC 2.0 (Roche[®] Penzberg, Alemania). Se midieron la pureza y la concentración del ARN con el NanoPhotometerTM UV/Vis Spectrophotometer (Implen[®] Schatzbogen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron 20 ng de ARN para obtener el ADNc utilizando Transcriptor High Fidelity (Roche[®] Mannheim, Alemania), usando el termociclador Applied Biosystems[®] GeneAmp[®] PCR Systems 9700 (Life Technologies Corporation, EE. UU.). Se usaron 5 μl de ADNc para la amplificación por PCR en tiempo real con sondas TaqMan y los cebadores correspondientes (tabla 1).

La amplificación fue llevada a cabo en el termociclador LightCycler 2.0 Real-Time PCR (Roche[®] Penzberg, Alemania), analizando la expresión simultánea de IFN- γ y β -globina (usada como control positivo). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos de desnaturalización por 10 s a 95°C , alineamiento por 10 s a 63°C y extensión por 30 s a 72°C .

Cálculos para la cuantificación relativa de expresión de interferón gamma

En las muestras positivas para la expresión de IFN- γ se midió la expresión relativa con el método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. De acuerdo con este método, el primer paso fue obtener el promedio del valor del C_T , el cual corresponde al primer ciclo del PCR en el que se detecta el producto amplificado. El C_T se obtuvo tanto para el gen constitutivo (β -globina) como para el gen de IFN- γ . El segundo paso fue comparar las muestras negativas de la infección por VPH y *C. trachomatis* contra las que presentaron infección de VPH y/o *C. trachomatis*. Lo anterior se realizó calculando con el C_T , lo siguiente: $\Delta\text{C}_T = \text{C}_T$ del gen de IFN- γ menos C_T del gen de β -globina; $\Delta\Delta\text{C}_T = \Delta\text{C}_T$ de pacientes con expresión IFN- γ , menos el ΔC_T de los controles con

Tabla 1
Diseño de cebadores y sondas TaqMan para la expresión de IFN- γ

Cebador	Secuencia	Tamaño cebador	Tamaño amplicón	Número acceso GenBank
IFN- γ S	TGGAGACCATCAAGGAAGACA	21		
IFN- γ A	GTTTATGCTGGCTGGCGAC	18	169	NM.000619
IFN- γ TM	FAM-AGTTCATGTATTGCTTTGCGTTGGACA-BBQ	27		
HBB S	GGATCTGTCCACTCCTGATGC	21		
HBB A	GTTGCCAGGAGCCTGA	17	187	NM.000518
HBB TM	YAK-TCAGGATCCACGTGCACTGTCA-BBQ	24		

HBB A: cebador antisentido de β -globina; HBB S: cebador sentido de β -globina; HBB TM: sonda TaqMan de β -globina; IFN- γ A: cebador antisentido de interferón gamma; IFN- γ S: cebador sentido de interferón gamma; IFN- γ TM: sonda TaqMan de interferón gamma. Todas las secuencias están escritas en dirección 5' a 3'.

expresión de IFN- γ . Finalmente se calculó: $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. A este último dato se le conoce como unidades relativas de expresión (URE)^{22,23}.

Análisis estadístico de los datos:

Los datos fueron analizados con Microsoft Excel 2010 y *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) para Windows, versión 20.0. Las muestras se dividieron en 4 grupos: a) sin infección; b) infección por VPH; c) infección por *C. trachomatis*, y d) coinfección por VPH y *C. trachomatis*. Se realizó el análisis descriptivo para cada grupo para conocer el número de pacientes para la infección, LIE y expresión de IFN- γ . Se usó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) para identificar la asociación de LIE con la infección por VPH y/o *C. trachomatis*. La predicción de la asociación de las variables se estableció mediante regresión logística binaria, tomando a la expresión de IFN- γ (negativas y positivas) como variable dependiente y a la infección por VPH y/o *C. trachomatis*, LIE, genotipos de VPH considerados de alto riesgo como variables independientes.

Resultados

En el presente estudio se incluyeron 77 pacientes con LIE y 23 que no presentaban síntomas de LIE. La edad promedio de las pacientes con LIE fue de $37,9 \pm 11,8$ años y la de las pacientes sin LIE, de $38,0 \pm 11,7$ años. De las 77 pacientes diagnosticadas con LIE, 10 (13%) presentaron coinfección por VPH y *C. trachomatis*; 35 (45,5%), solo infección por VPH; 10 (12,9%) únicamente infección por *C. trachomatis*, y 12 (15,6%) no presentaron ninguno de estos patógenos (fig. 1).

En cuanto a la expresión del gen de IFN- γ , 15 (15%) de las 100 muestras fueron las que lo expresaron. En la cuantificación relativa de la expresión de IFN- γ , la mayor expresión se observó en casos de coinfección por VPH y *C. trachomatis* (13 URE), seguida por el grupo con infección por VPH (1,8 URE), mientras que para la infección por *C. trachomatis* fue menor (0,3 URE) (fig. 2).

El análisis de regresión logística binaria sugiere que la expresión de IFN- γ tuvo una asociación con la coinfección por VPH y *C. trachomatis* (OR = 1,6; IC 95%: 0,2-12,6) y con los genotipos de VPH de alto riesgo (OR = 2,3; IC 95%: 0,4-13,2); sin embargo, ninguno de estos valores tuvo significación estadística (tabla 2).

Tabla 2
Regresión logística de la expresión de interferón gamma en la presencia de LIE, infección por VPH y/o *Chlamydia trachomatis* y genotipos considerados de alto riesgo

Factor	OR	IC 95%	p
Presencia de lesión intraepitelial escamosa	0,7	0,2-2,3	0,5
Coinfección de VPH y <i>C. trachomatis</i>	1,6	0,2-12,6	0,6
Infección por VPH	0,9	0,2-4,8	0,9
Infección por <i>C. trachomatis</i>	0,7	0,2-3,0	0,6
Genotipos de VPH considerados de alto riesgo	2,3	0,4-13,2	0,3

IC: intervalo de confianza; OR: odds ratio; VPH: virus del papiloma humano.

En la infección por VPH se encontraron 21 genotipos (6, 16, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 71, 81, 83 y 84), de los cuales 11 son considerados de alto riesgo (16, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59). En las pacientes con coinfección por VPH y *C. trachomatis* se encontraron 12 genotipos de VPH (11, 16, 18, 51, 52, 53, 58, 59, 62, 71, 84 y CP6108), de los cuales 6 son considerados de alto riesgo (16, 18, 51, 52, 58 y 59). No se encontró asociación entre la presencia de genotipos de alto riesgo y la infección por *C. trachomatis* ($\chi^2 = 1,9$; $p = 0,2$).

Se observó asociación de la coinfección por VPH y *C. trachomatis* con la presencia de LIE ($p = 0,03$). Es importante resaltar que las 10 pacientes que manifestaron coinfección por VPH y *C. trachomatis*, presentaron LIE. En cuanto a la infección por VPH, también se asoció con la presencia de LIE ($p = 0,0$). No se encontró asociación entre la infección con *C. trachomatis* y evidencia de LIE ($p = 0,2$).

Discusión

VPH y *C. trachomatis* son agentes que se presentan frecuentemente asociados con las ITS y en todas ellas la respuesta inmune es crucial para la prognosis de la enfermedad. El IFN- γ puede ser parte de la respuesta, por lo que es importante conocer el efecto que VPH y *C. trachomatis* ejercen sobre el patrón de expresión de esta citoquina.

En los resultados de esta investigación se observó una mayor expresión de mensajero para IFN- γ cuando se presentaba coinfección con VPH y *C. trachomatis*. No se han descrito estudios anteriores que permitan corroborar este resultado en la coinfección con estos patógenos, y una limitación importante de este estudio es el tamaño de la muestra. Nuestras observaciones concuerdan con estudios anteriores, llevados a cabo *in vitro*, que demostraron que el género *Chlamydia* induce la expresión de IFN- γ ²⁴, causando la inhibición del crecimiento de *C. trachomatis*^{25,26}; otro estudio demostró aumento de expresión de IFN- γ en pacientes con infección por VPH¹³. De las observaciones anteriores, se esperaría que la coinfección con VPH y con *C. trachomatis* tuviera un efecto aditivo sobre la expresión de IFN- γ , hipótesis confirmada con los resultados de este estudio.

La variación individual en este estudio pudiera haber permitido observar un alto porcentaje (85,7%) de pacientes que no expresan IFN- γ . Lo anterior podría explicarse debido a que los patógenos, particularmente el VPH, podrían activar diferentes mecanismos de evasión de la respuesta inmune^{12,27}, permitiendo que el gen de IFN- γ no se eleve a nivel transcripcional, lo que sería un factor que posibilite el desarrollo de LIE y CaCu.

Otros investigadores han demostrado que en tejidos con neoplasias intraepiteliales cervicales la expresión de IFN- γ aumenta¹³. En nuestro estudio no se observó asociación entre la expresión de IFN- γ y la presencia de LIE. Sin embargo, sería importante dar seguimiento a las pacientes para investigar si las que expresaron IFN- γ pudieran tener una mejor prognosis comparada con las pacientes que no lo expresaron. También se observó que la coinfección por VPH y *C. trachomatis* se asocia con LIE. Esta asociación encontrada

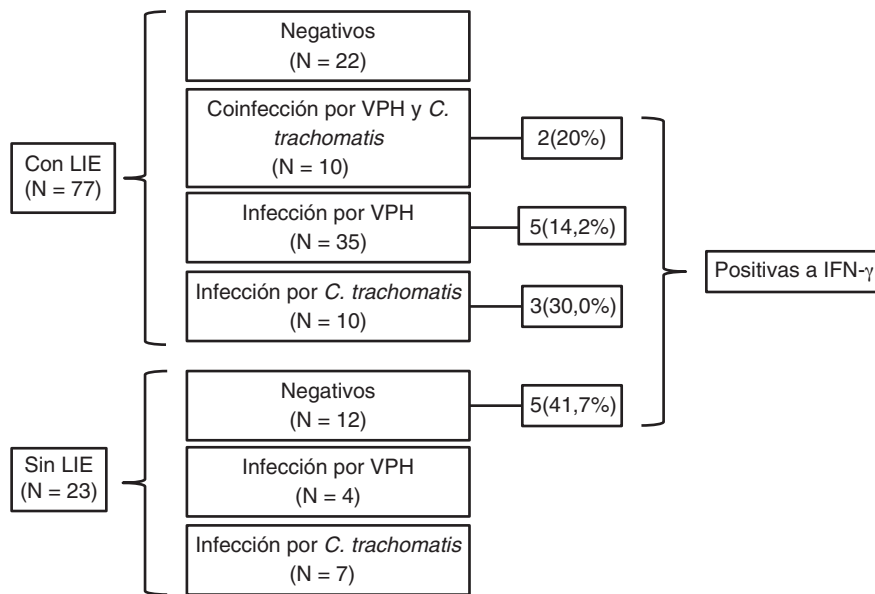


Figura 1. Diagrama de flujo de los grupos de estudio.

LIE: lesión intraepitelial escamosa; VPH: virus del papiloma humano.

coincide con lo demostrado en diferentes estudios, tanto en lesiones precancerosas como en cancerosas^{5-7,28}. De acuerdo con los resultados de este estudio, LIE aumenta cuando hay infección por VPH, no así cuando hay infección por *C. trachomatis*. El estudio de los patógenos que se encuentran en las ITS es muy importante, debido a que su asociación con el desarrollo de lesiones precancerosas y cancerosas se puede relacionar con un incremento del CaCu y, en consecuencia, con la mortalidad de la mujer.

Se ha demostrado una asociación de la infección por *C. trachomatis* con genotipos considerados de alto riesgo de VPH^{29,30}; en los resultados de la presente investigación se encontró que 6 (16, 18, 51, 52, 58 y 59) de los 12 genotipos identificados en la coinfección por VPH y *C. trachomatis* son genotipos considerados de alto riesgo; sin embargo, durante el estudio no se observó significación estadística a esta asociación. En estudios anteriores también

se han observado los genotipos VPH 6, 11, 16, 18, 33, 35 y 45 en la coinfección por VPH y *C. trachomatis*, siendo el genotipo VPH 16 el más frecuente²⁹⁻³¹, que coincide con los resultados del presente estudio

Los resultados de este estudio sugieren que es importante continuar con investigaciones respecto a la coinfección por VPH y *C. trachomatis* que permitan dilucidar cómo se ven afectadas las vías de señalización intracelular, así como genes y proteínas de la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria. Así mismo, sería importante confirmar las observaciones de este estudio con técnicas de proteómica, para valorar con mayor exactitud si el efecto de la coinfección por VPH y *C. trachomatis* sobre IFN- γ se limita a nivel transcripcional o se extiende a nivel translacional.

La importancia de este estudio radica en que los estudios en investigación básica se hacen con modelos experimentales

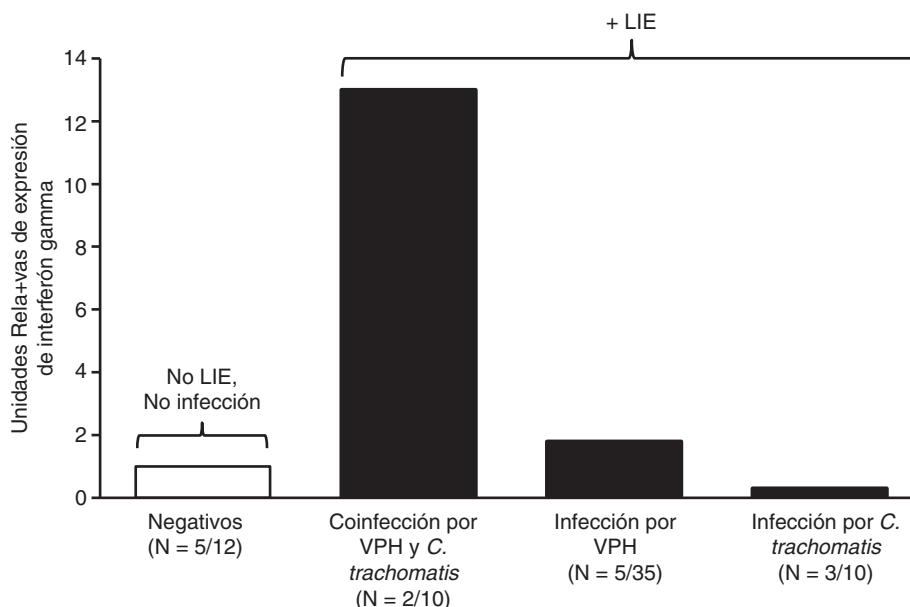


Figura 2. Unidades relativas de expresión (URE) de interferón gamma en la coinfección del VPH y *Chlamydia trachomatis*, la infección con VPH y la infección con *C. trachomatis* con respecto a los negativos. VPH: virus del papiloma humano.

en condiciones muy controladas (temperatura constante, comida controlada, ciclos de luz-oscuridad controlada, minimización de las diferencias genética, etc.). Estas condiciones contribuyen a disminuir la variación individual. Desafortunadamente este control es imposible en estudios realizados con humanos, y las diferencias individuales e infecciones sufridas en el pasado pueden contribuir a aumentar la dispersión de los datos. A pesar de las limitaciones descritas para realizar investigación en humanos, nuestros estudios demuestran una tendencia a aumentar la respuesta de IFN- γ en las pacientes presentando coinfección con VPH y *C. trachomatis*.

En conclusión, los resultados del presente trabajo sugieren que la coinfección por VPH y *C. trachomatis* puede estimular la expresión de IFN- γ y favorecer la prognosis de la enfermedad.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y estudios avanzados Universidad Autónoma del Estado de México (número de proyecto 3097).

Conflicto de intereses

Todos los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos las instituciones participantes en este estudio CIC-MED, Hospital Mónica Pretelini, IMSS por su apoyo.

Los autores agradecen a Juan Codina por su revisión al manuscrito.

Bibliografía

- Rajalingam K, Sharma M, Paland N, Hurwitz R, Thieck O, Oswald M, et al. IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells. *PLoS Pathog*. 2006;2:e114.
- Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*. 2006;151:2321–35.
- Cai Q, Lv L, Shao Q, Li X, Dian A. Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287:541–8.
- Lehtinen M, Ault KA, Lyytikäinen E, Dillner J, Garland SM, Ferris DG, et al. *Chlamydia trachomatis* infection and risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Sex Transm Infect*. 2011;87:372–6.
- Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis*. 2002;185:324–31.
- Bhatla N, Puri K, Joseph E, Kriplani A, Iyer VK, Sreenivas V. Association of *Chlamydia trachomatis* infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia — a pilot study. *Indian J Med Res*. 2013;137:533–9.
- Deluca GD, Basiletti J, Schelover E, Vasquez ND, Alonso JM, Marin HM, et al. *Chlamydia trachomatis* as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. *Braz J Infect Dis*. 2011;15:567–72.
- Koskela P, Anttila T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, et al. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 2000;85:35–9.
- Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2001;285:47–51.
- Flores YN, Bishai DM, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Lorincz A, Hernandez M, et al. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud Pública México*. 2008;50:49–58.
- Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010;2:15.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:550–60.
- Pardo-Govea T, Callejas D, Nunez-Troconis J, Araujo M, Costa L, Pons H, et al. Gamma interferon (IFN-gamma), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukins 2,4 and 6 (IL-2, IL-4, IL-6) in cervical-uterine cells of intraepithelial neoplasia: A preliminary report. *Invest Clin*. 2005;46:5–13.
- Pao CC, Lin CY, Yao DS, Tseng CJ. Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214:1146–51.
- Shemer Y, Sarov I. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. *Infect Immun*. 1985;48:592–6.
- Scott M, Stites DP, Moscicki AB. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6:751–5.
- Delgado D, Marín JM, de Diego J, Guerra S, González B, Barrios JL, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:230–5.
- Bianchi A, Moret F, Desrués JM, Champenois T, Dervaux Y, Desvovous O, et al. PreservCyt transport medium used for the ThinPrep Pap test is a suitable medium for detection of *Chlamydia trachomatis* by the COBAS Amplicor CT/NG test: results of a preliminary study and future implications. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1749–54.
- Schalasta G, Rosenthal T, Grothe M, Roche AMPLICOR human papilloma virus (HPV) and Linear Array HPV tests will profit from automated DNA extraction. *Clin Lab*. 2007;53:131–3.
- Pérez-Castro S, Lorenzo-Mahía Y, Iñarrea Fernández A, Lamas-González MJ, Saran-Díez MT, Rubio-Alarcón J, et al. Neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 o peor en Galicia, España: el VPH 16 la prevalencia y la vacunación impacto. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.09.011>, pii: S0213-005X [Epub ahead of print].
- Chlamydia trachomatis*-Real time. Manual- Real time RF040. Alemania: GeneKam Biotecnology, AG; 2012. p. 1–4.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402–8.
- Feng S, Tan H, Ling H, Yuan X. Detecting overexpression level of HER2 gene in NSCLC by real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. 2011;14:938–42.
- Rothfuchs AG, Trumstedt C, Wigzell H, Rottenberg ME. Intracellular bacterial infection-induced IFN-gamma is critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN-alpha beta-STAT1 signaling. *J Immunol*. 2004;172:6345–53.
- Morrison RP. Differential sensitivities of *Chlamydia trachomatis* strains to inhibitory effects of gamma interferon. *Infect Immun*. 2000;68:6038–40.
- Ishihara T, Aga M, Hino K, Ushio C, Taniguchi M, Iwaki K, et al. Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by human interferon-alpha: mechanisms and synergistic effect with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Bio-med Res*. 2005;26:179–85.
- 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.
- Da Silva Barros NK, Costa MC, Alves RR, Villa LL, Derchain SF, Zeferino LC, et al. Association of HPV infection and *Chlamydia trachomatis* seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil. *J Med Virol*. 2012;84:1143–50.
- Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43:277–81.
- Quint KD, de Koning MN, Geraets DT, Quint WG, Pirog EC. Comprehensive analysis of human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in *in-situ* and invasive cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 2009;114:390–4.
- Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL, Koranne RV, Mohan VP, Mittal A, et al. *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:88–93.