

## 1. INTRODUCCION

El cáncer de cuello uterino (CCU) es la tercera neoplasia más común en mujeres alrededor del mundo, principalmente durante la edad fértil (15-44 años); se estima que cada año 530,000 mujeres son diagnosticadas con CCU y de éstas, 275,000 mueren. Del total de casos, el 85% ocurren en países en vías de desarrollo de África, Asia y Latinoamérica, en donde se presentan alrededor de 453,000 casos y 242,000 muertes anuales (GLOBOCAN 2008; Ferlay et al. 2010).

En Colombia, la incidencia anual de CCU se estima entre 32.9 a 36.4 casos/año/100,000 mujeres, y la mortalidad es de 18.2 casos/año/100,000 mujeres, lo cual representa un grave problema de salud pública (Pardo et al. 2003; Bermudez 2005; WHO 2007). Para el 2004, la infección por VPH reportada fue de 6.2 casos/100 mujeres, con mayor prevalencia en mujeres menores de 20 años (Munoz et al. 2004; Molano et al. 2005). Éste tipo de cáncer se presenta con mayor frecuencia en mujeres de bajo nivel socioeconómico, limitado o nulo acceso a información de programas de promoción y prevención en salud, o en condiciones de desplazamiento forzado (Pardo et al. 2003; Bermudez 2005)

La evidencia indica que ciertos tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) conocidos como de alto riesgo (VPH-AR) son la principal causa de CCU (detectándose ADN-VPH en 99.7% de mujeres con CCU) (Walboomers et al. 1999; Munoz et al. 2006). De los 200 tipos virales identificados hasta el momento, 15 han sido clasificados como VPH-AR (de Villiers et al. 2004). Los tipos comúnmente encontrados son VPH-AR-16, -18, -45, -31, -33, -52, -58 y -35, (asociados con ~90% de CCU a nivel mundial) (Clifford et al. 2003; Clifford et al. 2006).

La mayoría de infecciones causadas por VPH-AR son transitorias (el 80% desaparece entre 6 a 8 meses después de la infección, sin causar lesión), mientras que un 20% no son depuradas eficientemente por el sistema inmune y se mantienen persistentes, lo que se ha sido sugerido como un factor relacionado con la progresión de lesiones precancerosas que conllevan al desarrollo de neoplasia malignas (Burd 2003; Moscicki et al. 2006).

El desarrollo de CCU requiere de una infección previa con VPH, pero la presencia de éste en el organismo, no conlleva obligatoriamente a la enfermedad. Existen varios factores de riesgo asociados al huésped que potencian el desarrollo de este tipo de cáncer, dentro de los cuales se encuentran: la edad, el número de compañeros sexuales, la edad de inicio de las relaciones sexuales, la cantidad de partos y abortos, el consumo prolongado de anticonceptivos orales, el tabaquismo, una alimentación deficiente y factores genéticos. Como factores de riesgo asociados al virus se encuentran: la carga viral y las infecciones múltiples o coinfecciones (no sólo con otras familias de virus (Herpesvirus, VIH), sino también con diferentes tipos de VPH) (Burchell et al. 2006; Almonte et al. 2008).

Las infecciones con más de un tipo de VPH de manera simultánea (coinfecciones), han sido vinculadas al desarrollo de lesiones de mal pronóstico, comúnmente en mujeres con una baja respuesta inmune (Jacobs et al. 2000). Sin embargo, no está claramente definida esta asociación en mujeres inmunocompetentes (Rousseau et al. 2003). El interés en estudiar las infecciones múltiples se disminuyó, dado que se propuso la clonalidad del cáncer cervical (Woodman et al. 2007); sin embargo, se ha sugerido que las infecciones múltiples favorecen las condiciones para que un solo tipo viral logre una máxima expresión y colonice el tejido cervical (Mejlhede et al. 2010).

Estudios previos realizados para Colombia han mostrado prevalencias de infección viral diferentes dependiendo del origen de las mujeres analizadas; el primero fue realizado con población femenina de la ciudad de Bogotá, en el cual se reportaron prevalencias de infección del 14.8%, mientras el segundo estudio se realizó en el departamento de Cauca, mostrando frecuencias de infección más elevadas. Las diferencias pueden deberse a la inclusión en el último estudio de un grupo de población rural – urbana, que además estaba expuesta a otros factores de riesgo (exposición a carcinógenos químicos). Considerando que los trabajos antes mencionados no incluyen población con un componente socio-cultural y étnico diverso, y teniendo en cuenta que la distribución de las infecciones por VPH y tipo-específicas varía según las regiones y grupos étnicos analizados (Kenney 1996; Fuessel Haws et al. 2004), resulta de vital importancia llevar a cabo estudios en nuestro país que incluyan grupos poblacionales más heterogéneos.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El CCU representa un grave problema de salud pública en nuestro país (Parkin et al. 2008). Para el año 2002, la incidencia anual de CCU fue de 36.4 casos/100,000 mujeres y de infección por VPH de 6.2 casos por 100 mujeres, de los cuales 5.0 casos involucraban tipos virales de alto riesgo y 2.0 casos tipos de bajo riesgo (Munoz et al. 2004). Además, un 20 al 30%, presentaron infección por varios tipos de VPH simultáneamente (Liaw et al. 2001) (Mendez et al. 2005).

En la historia natural de la infección por VPH, ha sido descrito que del total de mujeres que algún momento de su vida tienen contacto con el virus, un 20% mantienen la infección, de éstas, luego de un largo periodo de persistencia (que puede durar de 7 a 10 años), entre el 20% al 40% desarrollan lesiones preneoplásicas que progresaran a CCU (zur Hausen 2002; Burd 2003). No obstante, la transformación celular causada por el virus es detectada cuando cambios morfológicos importantes ocurren; esta detección se realiza a través del test de Papanicolaou (Pap), el cual se considera como prueba de oro para la identificación de anomalías a nivel celular (Hartikainen 2001).

Se han diseñado diferentes métodos complementarios al test de Pap, que permiten identificar infecciones virales en cualquier momento del ciclo de vida del VPH (Molijn et al. 2005). Dentro de éstos, la PCR (de la sigla en inglés: Polymerase Chain Reaction) es una técnica de biología molecular que ha mostrado ser un método sensible, utilizado en la identificación y tipificación de VPH, tanto en estudios clínicos, como epidemiológicos (Husnjak et al. 2000; Hubbard 2003; Chaiwongkot et al. 2007; Depuydt et al. 2007) .

Algunos estudios se han llevado a cabo en nuestro país empleando esta metodología. En un estudio cohorte llevado a cabo en la ciudad de Bogotá, se encontró una prevalencia viral de 14.8%, con picos de infección en edades extremas (menores de 19 años y mayores de 50 años) y una prevalencia de coinfección (infección por más de un tipo viral simultáneamente) del 25% aproximadamente (Molano et al. 2002; Munoz et al. 2004; Mendez et al. 2005).

La importancia de identificar las infecciones múltiples radica en que se ha descrito que el riesgo de adquirir un VPH aumenta cuando se tiene una infección de base, sin que los

tipos involucrados presenten una relación filogenética estrecha (Thomas et al. 2000; Mendez et al. 2005). Además, no ha sido claramente establecida la relación entre las coinfecciones y el riesgo de desarrollar lesiones cervicales (Rousseau et al. 2003; Mejlhede et al. 2009).

Otro estudio llevado a cabo en el departamento de Cauca, que incluía tanto población urbana como rural, encontró una frecuencia de infección por VPH mayor. Los autores reportaron que en los casos (mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y carcinoma *in situ*), se encontraron frecuencias virales del 91% y en los controles (mujeres con un hallazgo citológico negativo para lesiones) la prevalencia viral fue del 39%. Estas prevalencias se justificaron bajo la premisa que el grupo analizado presentaba características de riesgo como bajo nivel socio-económico, multiparidad y exposición a carcinógenos (uso de leña como combustible) (Sierra-Torres et al. 2006; Sierra-Torres et al. 2006).

Aunque estudios similares se han llevado a cabo en Colombia, el objetivo del presente trabajo fue establecer la prevalencia de infección de dos VPH-BR-6/-11 y seis tipos de VPH-AR-16, -18, -31, -33, -45 y -58, en cinco ciudades de distintas regiones del país, con el fin de incluir un grupo de mujeres con características económicas (principalmente de bajo estrato), demográficas y socio-culturales diferentes, principalmente pertenecientes a grupos poblacionales considerados vulnerables, y cuyos perfiles epidemiológicos no hubiesen sido descritos previamente.

Con estos datos, se pretende contribuir al conocimiento del comportamiento de algunos tipos de VPH-AR y VPH-BR en países en vía de desarrollo. Adicionalmente, proporcionar evidencia que permita, a futuro, medir el impacto de las diferentes vacunas, de acuerdo a la población blanco en la cual se aplican.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la frecuencia de infección, coinfección, la distribución tipo-específica del virus del Papiloma, y evaluar factores de riesgo asociados en mujeres Colombianas provenientes de cinco ciudades ubicadas en diferentes regiones geográficas, con características económicas, culturales y socio-demográficas diferentes.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las características socio-demográficas de las mujeres que participan en este estudio.
- Identificar la presencia de ADN de VPH, a través de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa, con el uso de dos tipos de cebadores genéricos (GP5+/6+ y MY09/11).
- Establecer la prevalencia de infección y coinfección (definida como infección por más de un tipo viral simultáneamente).
- Describir en cada ciudad evaluada, la distribución tipo específica de seis tipos de VPH-AR-16, -18, -31, -33, -45 y -58, y dos tipos de VPH-BR-6/-11.
- Analizar la eventual asociación entre los factores de riesgo y la presencia de infección y coinfección con VPH.

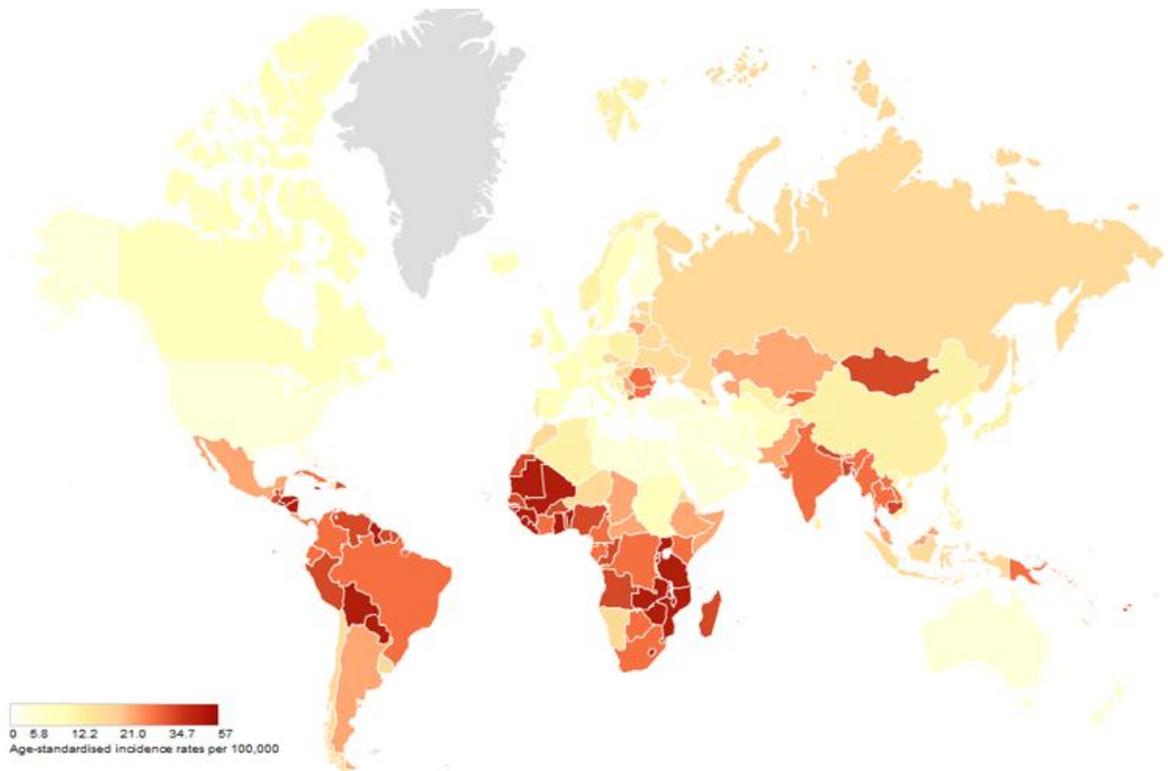
## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 Cáncer de Cuello Uterino

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y proliferación anormal de las células. De los diferentes tipos de cáncer que afectan a las mujeres, el de cuello uterino (CCU) es una de las enfermedades más frecuentes (Bermudez 2005). Esta patología aparece en la unión escamocelular entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso de la ectocervix, donde ocurren los cambios metaplásicos.

En la población general, se presenta como el séptimo cáncer más común, ocupando el tercer lugar dentro de los cánceres femeninos. Para el año de 2008 fueron reportados cerca de 530,000 casos nuevos y 275,000 muertes por esta causa (Figura 1) (Ferlay et al. 2010). Del total de casos reportados, el 85% (453,000 casos y 242,000 muertes) se observan en los países en vías de desarrollo del África, Asia Sur-Central, Melanesia, América Latina y el Caribe.

En el 2008, los países latinoamericanos reportaron una incidencia de 68,220 casos (tasa: 23.5 casos/100,000 mujeres) y una mortalidad de 31,712 casos (tasa: 10.8 casos/100,000 mujeres) (GLOBOCAN 2008). Para Colombia el panorama no es diferente, esta patología es catalogada como un grave problema de salud pública, ya que la mortalidad por CCU constituye la cuarta causa a nivel general y la segunda más frecuente en mujeres (después del cáncer de mama), siendo la incidencia para el país de 6,815 casos (tasa: 36.4 casos/100,000 mujeres) con una mortalidad de 3,296 casos (tasa: 18.2 casos/100,000 mujeres) (Parkin et al. 2008).



**Fig 1. Mapa de las tasas de incidencia estimada de cáncer de cuello uterino en el mundo (GLOBOCAN 2008).**

Múltiples estudios indican que ciertos tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) conocidos como de alto riesgo (VPH-AR) son la principal causa de CCU; en mujeres con este tipo de cáncer, se ha detectado el ADN del virus en un 99.7% de los casos (Walboomers et al. 1999). Del total de tipos caracterizados hasta el momento (200 tipos de VPH), cerca de 40 infectan el tracto genital y de éstos, 13 tipos son considerados oncogénicos (con capacidad para inducir cambios metaplásicos) (de Villiers et al. 2004; Cogliano et al. 2005). Los tipos de virus más prevalentes son VPH-AR-16, -18, -45, -31, -33, -52, -58 y -35, responsables del 90% de los casos de cáncer de CCU (Munoz et al. 2006).

Del total de mujeres que en algún momento de su vida tienen contacto con el virus, el 80% logran depurar eficientemente la infección, desapareciendo en un lapso de 6 a 8 meses; el 20% restante, la mantendrá persistentemente y desarrollará lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL, de la sigla en inglés: Low grade Squamous Intraepithelial Lesion). De

este último grupo, entre un 20 a 40% progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL, de la sigla en inglés: High grade Squamous Intraepithelial Lesion) (Burd 2003; Moscicki et al. 2006).

Debido a que la infección viral activa no presenta síntomas, la presencia del VPH es determinada cuando ocurren cambios morfológicos a nivel celular, los cuales son identificados a través del test de Pap. Éste fue introducido hace más de 60 años y con su aplicación a grandes masas de población se ha producido una importante disminución en la incidencia de CCU (Arbyn et al. 2008), por lo que se ha constituido como la herramienta principal para la detección de anomalías a nivel celular en el cuello uterino.

A pesar de su bajo costo y su elevada especificidad (95-98%), el test de Pap presenta tres grandes problemas: primero, su sensibilidad es muy baja y variable (de un 41 – 73%), lo que se ha tratado de solucionar realizando citologías anuales en esquema 1: 1: 3 (Olmos et al. 2007; Cuzick et al. 2008), el segundo problema es que se ha reportado que la cobertura de la citología en países como Colombia es alrededor de un 10%, lo que hace que la morbilidad y mortalidad del cáncer de cuello uterino sea alta, y en tercer lugar, el reporte de falsos negativos es variable (hay mujeres con lesiones precancerosas que no son detectadas con el test de Papanicolaou) (Ojeda et al. 2008).

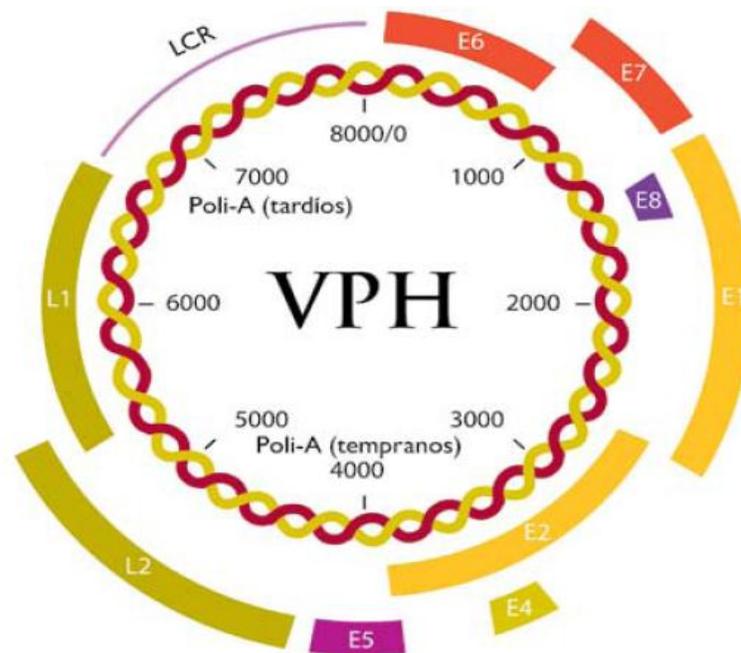
En los últimos años, se han desarrollado métodos complementarios al test Pap, basados en técnicas de biología molecular que permiten la detección del ADN viral y son empleados con fines clínicos y de investigación; de estos métodos se hablará más adelante.

#### **4.2 Virus del Papiloma Humano**

La naturaleza infecciosa de este virus fue corroborada en el año de 1930, cuando se caracterizó el primer modelo mamífero con cáncer, causado por este virus (virus de papiloma Shope). En 1960, las investigaciones avanzaron hacia el estudio de la replicación del virus del papiloma humano, seguidas de la hipótesis postulada por el médico Alemán Harald Zur Hausen en 1976, que mostraba al VPH como el agente causal del CCU; finalmente, este mismo científico en 1983, demostró la presencia de ADN de Virus de Papiloma Humano en las lesiones precursoras del cáncer genital (zur Hausen 1976; Ikenberg et al. 1983; Knipe et al. 2006).

Los virus del papiloma humano son miembros de la familia *Papillomaviridae*; estos virus son pequeños (diámetro de 60 nm), replican su genoma dentro del núcleo de las células del huésped infectado, carecen de envoltura y poseen una cápside icosaédrica que está compuesta por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) (Knipe et al. 2006).

El genoma del VPH consiste en una única molécula de ADN bicatenario circular, que contiene aproximadamente 8,000 pb (de Villiers et al. 2004); está compuesto por ocho marcos de lectura abiertos (ORF, de la sigla en inglés: Open Reading Frames) que son expresados a partir de ARNm policistrónicos (Longworth and Laimins 2004). Se ha dividido en tres regiones mayores: una región codificante para proteínas tempranas (E: del inglés Early) de aproximadamente 4kb, que genera las proteínas no estructurales necesarias para los procesos de replicación, transcripción y cito-transformación; una región de proteínas tardías (L: del inglés Late) de ~3kb, que codifica para dos proteínas estructurales de la cápside; y una región larga de control (LCR de la sigla en inglés: Long Control Region) de ~1kb, que no codifica para ninguna proteína viral, pero contiene elementos reguladores de la expresión y transcripción viral (Figura 2) (Villa 2006).



**Fig 2. Organización del genoma del virus del papiloma humano tipo 16 (López and Lizano 2006).**

#### **4.2.1 Proteínas E1 y E2 del Virus del Papiloma Humano**

E1 y E2 juegan un papel importante en la replicación del genoma viral y en la conservación del estado episomal (estado latente). La proteína E1 cumple funciones de helicasa y ATPasa, reconociendo secuencias ricas en AT en los orígenes de la replicación del VPH, próximas a los sitios de transcripción temprana (Hughes and Romanos 1993), además permite la unión a la ADN polimerasa (ayudando a reclutar el complejo de replicación celular) e interviene en el posicionamiento de los nucleosomas (permitiendo una mayor eficiencia de la horquilla de replicación) (Swindle and Engler 1998).

La proteína E2 es requerida tanto en la replicación del ADN viral como en el control transcripcional, principalmente en los VPH-AR, donde además tienen la capacidad de actuar como activador de la transcripción. Otra de sus funciones es la de asociarse con la helicasa de ADN viral E1, lo que resulta necesario para el reconocimiento eficiente del origen y replicación del genoma viral (Munger et al. 2004). E2 se une al ADN como un dímero a través del dominio C-terminal de la proteína, mientras que E1 se une débilmente como un hexámero, afinidad que se incrementa en presencia de E2 (Dixon et al. 2000).

Dímeros de E2 se unen a secuencias palindrómicas consenso ( $ACCN_6GGT$ ) conocidas como de unión a E2 (E2BSs, de la sigla en inglés E2 Binding Sequences), las cuales se encuentran tanto en la LCR como flanqueando secuencias de reconocimiento del origen de replicación de E1 (McBride et al. 1991). Cuando E2 se encuentra en bajas concentraciones, promueve la expresión de otros genes tempranos, mientras que cuando su concentración aumenta, estos genes son reprimidos (interfiere en la unión de factores de transcripción), lo que contribuye al control del número de copias virales en las células en diferenciación. El control transcripcional de las proteínas E1 y E2 se establece de acuerdo al estado de diferenciación celular (Klumpp and Laimins 1999; McMurray et al. 2001).

#### **4.2.2 Proteínas E4 y E5 del Virus del Papiloma Humano**

La proteína E4 se expresa abundantemente en las etapas tardías del ciclo viral, su ORF es traducido como una fusión con los primeros aminoácidos de la proteína E1, lo que genera una proteína de fusión conocida como E1<sup>E4</sup>, esto se debe a que el ORF de E4 carece del codón de iniciación de la traducción, por lo que emplea la secuencia de E1 para iniciar este proceso (Knipe et al. 2006). En la fase tardía del ciclo viral, esta proteína de fusión es sintetizada y se localiza en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma causando el colapso de éstos, lo que ha sido relacionado con la liberación de los viriones. La expresión de E4 precede la síntesis y el ensamblaje de las proteínas estructurales del virus, por lo que el facilitar la salida viral, se ha sugerido como una de sus funciones (Doorbar 2005). Adicionalmente, en virus de alto riesgo, esta proteína contribuye a la regulación de la expresión de genes, puesto que interactúa con la ARN helicasa (E4-DBD), involucrada en el splicing, transporte y la traducción del ARNm (Yoshioka et al. 2000).

La proteína E5 viral está localizada corriente abajo de E2 a nivel genómico y no es conservada entre los distintos tipos de VPH. Se ubica principalmente en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, pero también en la membrana citoplasmática, donde interactúa con algunos receptores de crecimiento celular, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La sobreexpresión de E5 aumenta la fosforilación del receptor de EGFR, impidiendo la degradación de éste, y como consecuencia de estas interacciones, ocurre la inhibición de la acidificación de los endosomas de la célula huésped (McMurray et al. 2001; Christensen 2002).

#### **4.2.3 Proteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano**

La oncoproteína E6 induce cambios importantes en las células del hospedero y coopera con E7 para la acción transformante e inmortalizante. La acción más importante de E6 en los VPH-AR es inhibir la función de P53. Se expresa de manera temprana durante la infección viral, cumpliendo varias funciones que alteran la morfología e incrementan la

vida celular por activación de la telomerasa y la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300/CBP (coactivador de p53) (Ganguly and Parihar 2009).

Normalmente, las células infectadas con agentes patógenos actúan para prevenir la propagación de éstos a las células vecinas a través de la activación de las vías de apoptosis; no obstante, muchos virus han desarrollado mecanismos para bloquear la inducción de la apoptosis. Este mecanismo es empleado por el VPH, llevado a cabo por la proteína E6, la cual, para superar las actividades pro-apoptóticas de p53, se une a ella en un complejo con la ubiquitina ligasa E6AP; la formación de este complejo resulta en la ubiquitinación de p53 y su posterior degradación por el proteasoma 26S (Huibregtse et al. 1993; McMurray et al. 2001). La proteína p53 (caracterizada como un supresor tumoral) regula distintos puntos de control del ciclo celular en fases de G1/S y G2/M, lo que resulta en la supresión de estos controles y trae como consecuencia cambios morfológicos celulares rápidos, duplicaciones y anomalías cromosómicas (Thompson et al. 1997; Knipe et al. 2006).

La segunda oncoproteína importante en el ciclo de vida de VPH es la E7, siendo su principal función la de asociarse con las proteínas de la familia pRB. La unión E7-pRB es mediada a través de tres regiones conservadas presentes en todas las proteínas E7 de los VPH-AR: CR1 en el N-terminal, CR2 que se une mediante el motivo LXCXE y CR3 que contiene dos dedos de zinc (Munger et al. 2004).

La unión de E7 a la forma activa de pRB ocasiona degradación de ésta a través de la vía ubiquitina-proteasoma, conduciendo a la liberación de los factores de transcripción E2F, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular, y la activación de los genes involucrados en la síntesis de ADN (Munger et al. 2001). E7 también se asocia con otras proteínas tales como las histona desacetilasas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. Una de las propiedades importantes de esta oncoproteína viral es su capacidad de inducir inestabilidad genómica, llevando a aneuploidias (alteraciones cromosómicas numéricas); su expresión es suficiente para inducir un incremento en el número de centrosomas anormales, que son los principales centros de la organización de los microtúbulos y que coordinan la segregación de los cromosomas a las células hijas durante la división celular (Duensing et al. 2000; Knipe et al. 2006).

#### **4.2.4 Proteínas L1 y L2 del Virus del Papiloma Humano**

Los genes tardíos codifican para las proteínas mayores de la cápside viral (L1 y L2), las cuales son sintetizadas en la fase final del ciclo viral y son las responsables del ensamble de los nuevos viriones en las capas cutáneas superiores; estas dos proteínas se pueden generar *in vitro* en una variedad de sistemas de producción y se auto-ensamblan como partículas semejantes a virus (VLP, de la sigla en inglés: Virus-Like Particles) (Lowe et al. 2008).

La proteína principal de la cápside es L1, que comprende más del 90% y es el principal componente de la superficie del virus. Ésta es expresada después de L2 y su unión tiene consecuencias importantes para el empaquetamiento del ADN viral; L1 y L2 interactúan a través de un dominio hidrofóbico en una región cercana al carboxi-terminal de L1 (Doorbar 2005).

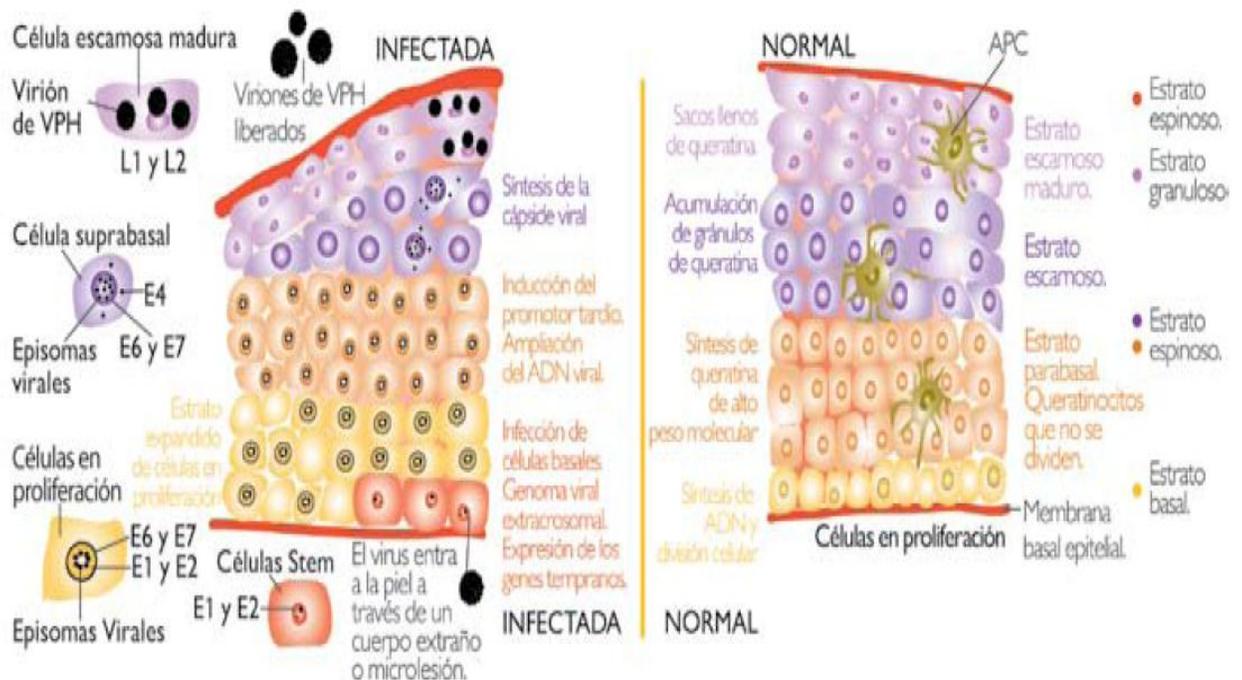
La proteína L2 despliega un dominio de unión al ADN del virus y a un epítoto expuesto en la superficie, que media específicamente en el reconocimiento inmune (Jagu et al. 2009). Estudios recientes indican que la proteína L2 también pueden unirse a la superficie celular, lo que resulta en su internalización, sugiriendo el papel de ésta como facilitador de la infección a través de la interacción con receptores secundarios (Kawana et al. 2001). También se ha descrito que participa en varios pasos durante la entrada del virus a las células huésped, incluyendo funciones como la inducción de cambios conformacionales de los viriones unidos a la célula, la ruptura de membranas endosomales y el tráfico subcelular del genoma viral (Kamper et al. 2006).

#### **4.3 Ciclo de Vida del Virus del Papiloma Humano**

El ciclo de vida del VPH está estrechamente vinculado al programa de diferenciación del epitelio infectado (Figura 3). El transporte nuclear del genoma viral depende de una variedad de procesos que incluyen: la unión a los receptores celulares, la fusión o penetración a través de la membrana plasmática o endosomal, el transporte endosomal, la interacción con el citoesqueleto celular, los eventos de desensamblaje viral, y por último, la proliferación (Whittaker 2003).

El ADN viral se mantiene en pocas copias en el núcleo de la célula infectada, tanto células como virus son desplazados hacia la superficie del epitelio, debido a los procesos de diferenciación; cuando llega a las células terminales diferenciadas, los genes tardíos son expresados y la progenie del virus se produce; como los VPH son virus no líticos, la progenie del virus se elimina al medio ambiente como una carga dentro de células epiteliales escamosas (Munger et al. 2004).

Las etapas iniciales de la infección viral requieren la unión a receptores celulares, lo cual ocurre en la capa basal de las células (células epiteliales que se dividen activamente) y la entrada del virus se da por medio de una micro abrasión o micro trauma generado en la zona de transformación celular (Figura 3); una vez expuestas las células blanco de infección y transformación viral, hay dos posibles maneras de anclaje a la membrana basal celular, una consta de estructuras de heparán sulfato (Shafti-Keramat et al. 2003) y la otra se da a través de la internalización de viriones por endocitosis, a través de vesículas recubiertas de clatrina o caveolina (Smith et al. 2008).



**Fig 3. Organización del ciclo de vida durante la infección productiva (López and Lizano 2006).**

El transporte de la partícula viral a través del endosoma se da por la actividad de las proteínas Rab5 y Rab7 dependientes de GTPasa; Rab5 es la encargada de transportar y fusionar el caveosoma con el endosoma temprano, y Rab7 fusiona el endosoma tardío con el lisosoma, de manera que la partícula del virus puede atravesar el citoplasma celular (Smith et al. 2008). A medida que el endosoma temprano va madurando, ocurre una acidificación interna; en un pH ácido se rompen los puentes disulfuro de las proteínas L1 de la cápside viral, dejando expuesto el ADN viral y la proteína L2 en el medio, esta proteína tiene un péptido que desestabiliza la membrana endosomal y a medida que el pH se acidifica, se encarga de extraer el ADN viral y dirigirlo hacia los receptores de importación nuclear para realizar el transporte del genoma viral a el núcleo celular (Bordeaux et al. 2006; Kamper et al. 2006).

El transporte dentro y fuera del núcleo ocurre a través de complejos de poro nuclear, compuestos por karioferina alfa y beta (importinas). La subunidad alfa de karioferina funciona como un receptor de la señal de localización nuclear, mientras que la subunidad beta media el acoplamiento hacia el poro nuclear. Durante el importe, Rab-GTP induce el acople de las importinas para permitir la entrada de sustratos dirigidos a los dominios nucleares, donde comienza la replicación del ADN viral; una vez entra al núcleo, el genoma viral utiliza la maquinaria celular para su replicación, síntesis y expresión de las proteínas tempranas (E1-E7) y las tardías (L1-L2) (Moroianu 1997; Doorbar 2005).

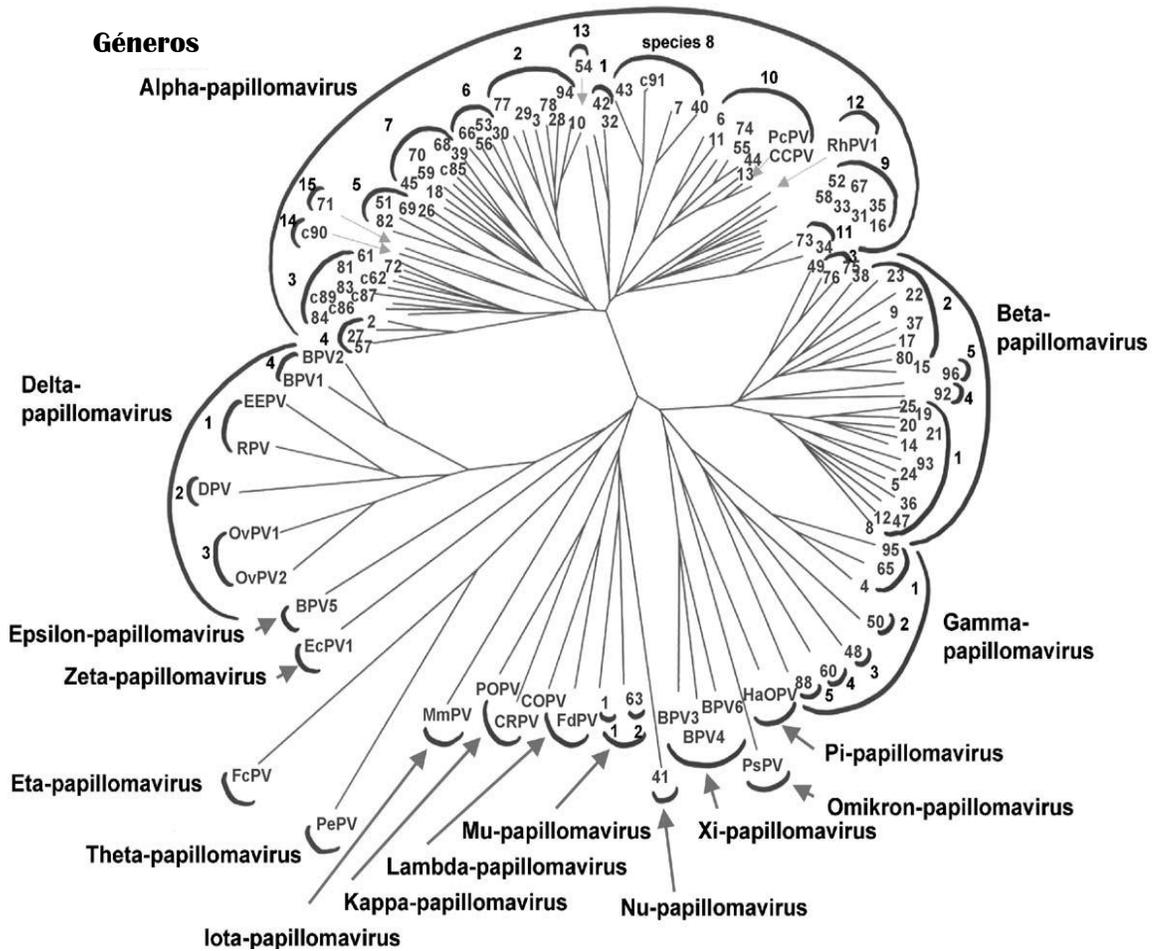
#### **4.4 Clasificación de la familia *Papillomaviridae***

Los tipos virales que integran la familia *Papillomaviridae* presentan una tasa de cambio lenta, en donde los papilomavirus (PVs) más alejados presentan aproximadamente un 50% de diversidad nucleotídica (Bernard 2005). Se han descubierto más de 200 tipos virales, de los cuales 118 han sido aislados, secuenciados por completo y agrupados en géneros denominados por letras griegas, tales como alfa, beta y gama papilomavirus. Esta clasificación fue realizada con base en la homología comparativa del ORF de L1, el cual codifica para la mayor proteína estructural y la más conservada entre los distintos tipos de Papilomavirus (Figura 4) (Bernard 2005).

La clasificación con base en su homología, permitió dividirlos en géneros, especies, tipos, subtipos y variantes; los diferentes géneros comparten menos del 60% de identidad, las especies de un género comparten una identidad de secuencia de 60 a 70% y los tipos virales dentro de una especie comparten entre un 71 a 89% de identidad. Dentro de los tipos pueden existir los subtipos, que comparten entre 90 a 98% de identidad, de los tipos de VPH descritos, se conocen subtipos para: VPH-5, -8, -20, -34, -44, -54, -68 y -82. Finalmente, se encuentran las variantes, las cuales comparten entre sí un 98% de identidad (de Villiers et al. 2004; Knipe et al. 2006).

Usando esta clasificación, los PVs se han agrupado en 16 géneros, de los cuales, los géneros *Alfa*, *Beta*, *Gama*, *Mu* y *Nu* infectan a humanos, mientras que los géneros restantes comprenden exclusivamente tipos virales encontrados en varios mamíferos y aves. La especie del huésped está asociada a cada género de papiloma, lo cual refleja la estrecha evolución que se presenta entre el virus y el hospedero (Illades-Aguar et al. 2009).

Los VPH se caracterizan por infectar células epiteliales de la piel o tejidos internos, por lo cual han sido divididos en tipos cutáneos o mucosos. Estos tipos se encuentran agrupados en el género *Alfa-papilomavirus*, dentro de éste, los VPHs con tropismo dirigido a mucosas han sido a su vez clasificados en tipos de alto y bajo riesgo (VPH-AR, -BR, respectivamente), dependiendo de su potencial oncogénico (capacidad para desarrollar lesiones cervicales) y del tipo de lesión a la cual se asocian (cutánea o mucosa) (de Villiers et al. 2004; Bernard 2005).



**Fig 4. Árbol filogenético de 118 tipos del virus del papiloma (de Villiers et al. 2004).**

Los tipos de VPH-BR son aquellos encontrados frecuentemente en verrugas genitales, mientras que los VPH-AR son reconocidos como la causa principal de casi todos los CCU y se encuentran distribuidos en las especies 5, 6, 7, 9 y 11. El ADN de VPH-AR se ha detectado en aproximadamente el 99.7% de las mujeres con CCU (Walboomers et al. 1999), siendo los tipos más frecuentes VPH-AR-16, -18, -45, -31, -33, -52, -58 y -35, responsables del 90% de los cánceres cervicales a nivel mundial (Munoz et al. 2006).

El tipo VPH-16 (miembro de la especie 9) es el tipo más detectado en cáncer, seguido del VPH-18 (especie 7); estos dos tipos virales se encuentran involucrados en el 70% de los casos (Knipe et al. 2006; Munoz et al. 2006).

#### **4.4.1 Técnicas de Identificación del Virus del Papiloma Humano**

Debido a su dificultad de crecimiento *in vitro*, se han diseñado otras técnicas para realizar la identificación de VPH, entre las que se incluyen la inmunofluorescencia y la inmunquímica, sin embargo, éstas generan problemas por su baja sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. El uso de anticuerpos policlonales anti-proteínas estructurales tardías L1 y L2 puede confirmar la presencia de cambios morfológicos inducidos por VPH, pero no ha superado la sensibilidad que muestra el diagnóstico de ADN de VPH (Coutlee et al. 2005).

Las pruebas serológicas se han realizado con el objetivo de determinar la respuesta humoral producida por el hospedero frente a la infección viral, por lo que se enfocan en detectar anticuerpos contra proteínas virales, principalmente contra la proteína de cápside L1 y la oncoproteína viral E7 (Urquiza et al. 2005). Los análisis por metodologías de captura antigénica como el ELISA han ofrecido buenas perspectivas, sin embargo, aún no se ha desarrollado un método de tamización confiable (Christensen et al. 1996; Christensen et al. 2001; Slupetzky et al. 2001). Estos ensayos son de fácil manipulación, no requieren equipo especial y podrían ser realizados por muchos laboratorios clínicos alrededor del mundo.

Como marcadores serológicos en cáncer cervical se han utilizado el antígeno celular de carcinoma escamoso (SCCA), derivado de las células cervicales cancerosas, y el antígeno carcinoembrionario (CEA); sin embargo, sus aplicaciones clínicas son criticadas, debido a que los valores estándar de positividad son demasiado amplios (valores tan bajos como 34% y 18%, respectivamente) y además presentan cambios inexplicables en los estados tempranos del cáncer cervical que no están relacionados con el estado clínico (Carter et al. 2000).

En la actualidad, se han desarrollado técnicas moleculares con el fin de identificar ADN viral en muestras de tejido cervical, entre las que se encuentran la técnica de PCR y recientemente la técnica de Captura Híbrida Viral II (HCII) (Bollmann et al. 2003; Cortes-Gutierrez et al. 2003).

La técnica de HCII fue desarrollada por la compañía Digene®, ésta emplea sondas de ARN dirigidas a secuencias de ADN de 13 tipos de VPH-AR (-16, -18, -31, -33, -35, -39, -

45, -51, -52, -56, -58, -59 y -68) y de 5 tipos de VPH de Bajo Riesgo (VPH-BR) (-6, -11, -42, -43 y -44) para la detección y amplificación de la señal en fase líquida (Mo et al. 2008). Esta técnica tiene algunas limitaciones como son la dificultad de identificar los tipos específicos, la posibilidad de reacciones cruzadas entre los dos sets de sondas (Lorincz 1996; Baleriola et al. 2008) y una proporción considerable de falsos negativos (Poljak et al. 1999).

Por el contrario, la PCR es una técnica que ha mostrado ser un método sensible y específico (Arnheim and Erlich 1992), incluso cuando hay bajas copias virales en la muestra; este método ha sido ampliamente utilizado en estudios clínicos y epidemiológicos (Husnjak et al. 2000; Hubbard 2003; Chaiwongkot et al. 2007; Depuydt et al. 2007). Se han descrito diversos sistemas de primers consenso que permiten la detección simultánea de un espectro de tipos virales que infectan el tracto genital, entre los que se encuentran GP5+/6+, MY09/11, PGMY y SPF10 (Iftner and Villa 2003; Molijn et al. 2005).

Varias metodologías han intentado combinar la PCR con el Western Blot, procurando aumentar la sensibilidad de la prueba. Uno de los más usados hasta el momento, es un par de cebadores PGMY L1, cuya sensibilidad se calculó entre el 91 al 100% al ser analizado en diferentes laboratorios (Kornegay et al. 2003). A continuación, se muestra una tabla donde se resumen las diferentes técnicas de detección de ADN de VPH y sus ventajas y desventajas (Tabla 1).

Método de detección de ADN de VPH	Sensibilidad %	Especificidad %	Ventajas	Desventajas	Referencias
<b>GP5+/6+</b>	51	100	Alta sensibilidad, especialmente con muestras que contienen bajas copias virales. Gracias a su bajo costo y fácil implementación han sido ampliamente usados en estudios clínicos y epidemiológicos.	Puede ser poco eficaz en la amplificación de algunos tipos de VPH-AR tales como VPH-53 y -61. No recomendado para tipificación.	(de Roda Husman et al. 1995; Remmerbach et al. 2004)
<b>MY09/11</b>	72.2	100	Detección de más de 25 tipos virales simultáneamente. Alta sensibilidad en la detección de diferentes genotipos. Gracias a su bajo costo y fácil implementación han sido ampliamente usados en estudios clínicos y epidemiológicos.	Fragmentos de PCR relativamente largos. Existe la posibilidad de la pérdida del blanco de amplificación, especialmente en muestras que tienen poco producto de ADN, tales como las fijadas en formalina, embebidas en parafina o con alto porcentaje de integración. No apropiado para tipificación.	(Qu et al. 1997)
<b>PGMY-LB</b>	95.6	----	Combina ensayos de PCR con marcaje tipo específico de sondas oligonucleotídicas (radio-marcadas) para incrementar la sensibilidad y reproducibilidad de la detección.	Es más sensible al efecto de inhibidores en las muestras.	(Coutlee et al. 2002)
<b>SPF10-LiPA25</b>	----	----	Sistema de detección y genotipificación capaz de amplificar hasta 43 diferentes tipos; identifica simultáneamente hasta 25 tipos.	Puede tener problemas de sensibilidad en muestras con más de un tipo viral, debido a la competencia de tipos de VPH según su concentración en la muestra.	(Husnjak et al. 2000; Castle et al. 2008)
<b>Amplicor HPV test</b>	96.4	100	Detecta 13 tipos de VPH-AR en simultánea, además asegura la presencia del gen de la $\beta$ -globina humana como control positivo.	Hibridación cruzada entre cebadores principalmente con VPH-56 y requiere profesionales expertos para la implementación de la prueba. Requiere de más tiempo que las otras pruebas para la obtención de resultados.	(Gravitt et al. 2008)
<b>LINEAR ARRAY HPV genotyping test</b>	89.1	46.5	Detecta 37 tipos de VPH individualmente, incluyendo los 14 carcinogénicos principales. Utiliza un control interno ( $\beta$ -globina humana).	Baja sensibilidad (identificación de mujeres con la enfermedad). Las muestras deben mantenerse en medio especial (STM).	(Mo et al. 2008)
<b>PapilloCheck HPV-Screening Test</b>	----	----	Detecta y tipifica 25 tipos de VPH en simultánea: 15 VPH-AR, 2 tipos de VPH de riesgo probable y 8 VPH-BR.	Puede reportar discrepancias en la detección al compararlo con otros métodos de detección múltiple. Se ha reportado una importante detección de falsos positivos. La detección se dirige a E1, gen susceptible a delecciones parciales comparado con la región L1.	(Dalstein et al. 2009)

**Tabla 1. Pruebas de identificación de ADN de VPH más utilizadas (modificada de (Camargo et al. 2011)).**

#### **4.5 Factores de Riesgo Asociados al Desarrollo de CCU**

Numerosos estudios longitudinales alrededor del mundo se han llevado a cabo con la finalidad de establecer las frecuencias de infección viral, tanto en mujeres con lesión, como en aquellas que aún no presentan cambios celulares (Tabla 2). En la historia natural de la infección, se ha descrito que la transmisión de VPH se da principalmente por contacto directo piel a piel y estudios epidemiológicos indican que el riesgo de contraer una infección genital por este virus está influenciado por la conducta sexual (Munoz et al. 2006).

Sin embargo, la infección *per se* no es suficiente para producir la conversión maligna, una compleja interacción entre virus y factores celulares intervienen y evitan el control del ciclo celular, lo que lleva a la inmortalización celular, acumulación de mutaciones, seguido de cambios celulares y la progresión maligna de las células cervicales (de Villiers 2003).

En el desarrollo de CCU, se han descrito una serie de factores virales y del huésped que contribuyen a la persistencia del VPH y que incrementan el riesgo de desarrollar neoplasias malignas (Burchell et al. 2006). Además de esto otros factores sociales que contribuyen al desarrollo de neoplasias malignas son los factores relacionados con las barreras de acceso al sistema de salud, la carencia de tecnologías de punta en los servicios de salud, la falta de una adecuada educación sexual, entre otras (Wiesner-Ceballos et al. 2006).

##### **4.5.1 Factores de Riesgo Asociados al Virus del Papiloma Humano**

Entre los factores virales más importantes descritos, se encuentran las variantes del VPH, la carga viral y la integración del virus al genoma del hospedero. Por otra parte, dentro de los factores del huésped, se encuentran los referentes a la conducta sexual, la paridad, el uso prolongado de anticonceptivos orales, el consumo de cigarrillo y el componente genético de individuo (Castellsague et al. 2002; Au et al. 2007).

Las implicaciones filogenéticas de la identificación de variantes de VPH pueden verse reflejadas en la estrecha evolución que se presenta entre el virus y el hospedero, dando

origen a variantes determinadas según las etnias (Junes-Gill et al. 2008; Tornesello et al. 2011). Esto sugiere que la adquisición de distintas variantes de VPH-AR puede llevar a desenlaces clínicos diferentes (Xi et al. 2006; Illades-Aguiar et al. 2010).

País	Prevalencia VPH (%)	Técnica de Identificación Viral	Año	Referencia
Francia	45.3	HC II	2008	(Pannier-Stockman et al. 2008)
Italia	68.9	SFP <sub>10</sub> -LIPA	2009	(Bello et al. 2009)
Comoros	35.4	-----	2007	(WHO 2007)
Congo	23.0	-----	2007	(WHO 2007)
Bolivia	14.3	-----	2007	(WHO 2007)
Colombia	14.9	PCR (GP5+/6+)	2002	(Molano et al. 2002)
	49.2	PCR (GP5+/6+ y MY09/11)	2009	(Soto-De Leon et al. 2009)
Costa Rica	35	HC II - PCR (SPF10)	2007	(Safaeian et al. 2007)
	50	PCR (SPF10)	2008	(Herrero et al. 2008)
Ecuador	14.3	-----	2007	(WHO 2007)
Honduras	29.3	PCR (MY09/11)	2000	(Ferrera et al. 2000)
	51	PCR (SPF10)	2009	(Tabora et al. 2009)
Nicaragua	20.5	-----	2007	(WHO 2007)
Panamá	20.5	-----	2007	(WHO 2007)
Perú	17.7	PCR (GP5+/6+)	2001	(Santos et al. 2001)
Venezuela	14.3	-----	2007	(WHO 2007)
	15.6	HC II	2009	(Nunez-Troconis et al. 2009)

**Tabla 2. Prevalencia de VPH en diferentes países.**

Por ser el más prevalente a nivel mundial, el VPH-16 ha sido el más estudiado para la identificación de variantes, del cual se han descrito seis variantes, dos Africanas: Af1 y Af2, una Europea: Eu, una Asiática: As, una Asiática-Americana: AA y una última variante denominada Norteamericana: NA (Quint et al. 2010).

Las variantes descritas para VPH-16, se han identificado en todo el mundo, pero sus prevalencias difieren según la región y la etnia estudiada (Ho et al. 1993; Ho et al. 1993). Adicionalmente, estas variantes han sido relacionadas según un efecto fundador y esto permite pensar que su distribución en las diferentes regiones obedece también a las dinámicas migratorias poblacionales (Xi et al. 1997).

En cuanto a la identificación de variantes en otros tipos de VPH-AR, se han logrado identificar tres diferentes variantes para VPH-18: una Africana (Af), una Europea (E) y una Asiática–Amerindia (AsAi) (Pista et al. 2007). Para los demás tipos de VPH-AR, no se han establecido claramente variantes según los orígenes geográficos. Algunos estudios sugieren que VPH-16 presenta una replicación más eficiente que los demás, por lo que se podrían generar más variaciones genómicas (Stoppler et al. 1996).

La cuantificación del virus de VPH es un factor que ha sido considerado importante desde el punto de vista clínico, ya que se ha demostrado que la persistencia de la infección y el mantenimiento elevado de la carga viral, contribuyen a la progresión de lesiones de bajo grado a cáncer cervical (Moberg et al. 2003; Wang and Hildesheim 2003). La identificación de la carga viral para VPH se ha realizado en muestras de mujeres con varios grados de lesión (Bontkes et al. 1998; Hudelist et al. 2004), con varios tipos virales (Gravitt et al. 2007; Guo et al. 2007; Ramanakumar et al. 2010) y con muestras tomadas en diferentes fluidos (Coutlee et al. 2009), entre otros. Estas cuantificaciones ha permitido relacionar el aumento en el número de copias virales con el aumento en el grado de lesión, principalmente para los tipos VPH-16 y -18 (Josefsson et al. 2000; Moberg et al. 2005). Se ha sugerido que en los principales casos de lesiones cervicales, el tipo VPH-16 se encuentra en mayor cantidad e integrado al genoma del hospedero (Boulet et al. 2009), mientras que para VPH-18, la correlación entre el aumento en su carga viral y el aumento de la gravedad de la lesión, ha sido compleja (Cheung et al. 2009); sin embargo, es común ver el VPH-18 ligado a lesiones más avanzadas y en menor cantidad comparado con VPH-16 (Botezatu et al. 2009).

Otro factor viral que ha sido descrito es la integración viral; a pesar que el VPH se encuentra en las primeras etapas del ciclo viral en forma episomal, su integración ha sido principalmente asociada con cáncer de cuello uterino. Sin embargo, no está claramente establecido si la integración del VPH ocurre de manera aleatoria o qué efectos biológicos llevan a que ésta ocurra (Ferenczy and Franco 2002). Durante la integración, los genes virales *E1* y *E2* son frecuentemente interrumpidos o se encuentran en baja actividad transcripcional, lo que favorece la expresión de los oncogenes *E6* y *E7*. La frecuencia de la integración del virus parece aumentar con el grado de severidad de la lesión cervical, lo que podría ser empleado como un factor de correlación con la progresión a cáncer de cuello uterino (Klaes et al. 1999). No obstante, la importancia biológica de la integración del virus es todavía objeto de estudio, principalmente por las limitaciones metodológicas, puesto que los sitios de integración son altamente variables y el virus puede coexistir en forma episomal e integrado al genoma del huésped (Kalantari et al. 2001).

#### **4.5.2 Factores de Riesgo Asociados al Huésped**

Es reconocido que la mayoría de las mujeres infectadas con el virus no desarrollan cáncer y que además existe un pequeño porcentaje de CCU en el cuál no hay evidencia de infección viral. Por lo tanto, otros factores deben contribuir a la inducción de la neoplasia.

Entre los factores más relacionados con CCU se encuentra el consumo de cigarrillo, el cual ha sido asociado significativamente con el incremento del riesgo de desarrollar lesión y con un efecto que es dependiente de la dosis; la exposición a agentes mutágenos y carcinógenos como el humo del cigarrillo puede inducir mutaciones en los genes y aberraciones cromosómicas (Kjellberg et al. 2000; Au et al. 2007).

Otro factor del huésped que en algunos estudios se ha encontrado asociado al desarrollo de CCU, es la alta paridad. Esto podría deberse a que las mujeres que han tenido un gran número de hijos, experimentan cambios hormonales importantes que se presentan con cada embarazo, y por lo tanto, han mantenido niveles hormonales altos durante lapsos de tiempo prolongados (Bayo et al. 2002). Además, ha sido descrito que algunas hormonas pueden llegar a modular la infección viral, al contribuir en la expresión de genes virales,

efecto que también ha sido descrito en mujeres que mantienen un uso prolongado de anticonceptivos hormonales (Castellsague et al. 2002).

Con respecto a los factores genéticos del huésped que pueden ser importantes en el desarrollo de cáncer cervical, se han sido realizado estudios con el fin de determinar asociaciones entre el componente genético y el desarrollo de la enfermedad (Magnusson and Gyllensten 2000; Wang and Hildesheim 2003; Au et al. 2007), sin embargo, hasta el momento sólo se ha visto que estos factores pueden variar de un país a otro, lo cual estaría explicado sobre la base de la composición étnica de la población del estudio, sumado al impacto de los distintos factores de riesgo adicionales a los cuales pueden estar expuestas dichas poblaciones (Au et al. 2007).

No obstante, se han establecido que ciertos polimorfismos podrían estar relacionados con el desarrollo de CCU, algunos de los cuales ocurren en genes responsables del metabolismo de químicos y otros en genes responsables del sistema inmune. Entre los que metabolizan químicos, encontramos por ejemplo las alteraciones en los genes *GSTM1* y *GSTT1*, responsables de la eliminación de epóxidos, los cuales son metabolitos reactivos que se derivan de la combustión de productos como los cigarrillos y la madera (Sierra-Torres et al. 2006; Au et al. 2007).

En cuanto a los polimorfismos en genes involucrados en la respuesta inmune, los más estudiados son los referentes al HLA; este sistema tiene la función de presentar antígenos extraños a los linfocitos T y, por lo tanto, juega un papel importante en la regulación de la función inmune (Magnusson and Gyllensten 2000). La variación en los genes de *HLA* puede ser importante en determinar la reacción de la respuesta inmune frente a la infección viral; asociaciones de polimorfismos en alelos HLA y precursores de cáncer cervical han sido reportados en algunos estudios (Wang and Hildesheim 2003), indicando la existencia de alelos tanto de predisposición como de protección. Esto podría explicar por qué algunos individuos logran la unión y presentación efectiva de péptidos virales al sistema inmune, mientras que en otros, el sistema inmune resulta incapaz de responder a la infección. Adicionalmente, algunos estudios han comenzado a considerar diferencias étnicas en la respuesta inmune, puesto que la inmunidad es un rasgo genéticamente determinado (Kenney 1996).

## **5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la prevalencia de infecciones únicas y múltiples de VPH para poblaciones socio-demográficamente heterogéneas?

¿Cuál es la distribución tipo-específica de VPH en nuestra población?

¿De los factores de riesgo reportados previamente cuales se encuentran asociados con las infecciones únicas y múltiples de la población incluida en este estudio?

## **6. HIPÓTESIS**

Los valores de OR que miden la asociación entre cada uno de los factores de riesgo y la presencia de infección son iguales a uno.

Los valores de OR que miden la asociación entre cada uno de los factores de riesgo y la presencia de coinfección son iguales a uno.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Tipo de Estudio**

Estudio observacional analítico de corte transversal.

### **7.2 Población de Estudio**

La población de este trabajo incluye mujeres que acuden al programa de promoción y prevención de cáncer de cuello uterino, el cual inició a mediados de los años sesenta y que se fortaleció a través de la resolución 412 de 2000. Este programa tiene como función la atención de mujeres pertenecientes al sistema general de seguridad social en salud (SGSSS), en todos los estratos.

Tres de las ciudades incluidas en el estudio se encuentran ubicadas en la región andina (centro-oeste de Colombia): Chaparral, Girardot y Bogotá. En éstas, se llevaron a cabo convenios con los hospitales que se mencionan a continuación. El primero es el Hospital San Juan Bautista en Chaparral; esta ciudad está localizada en el departamento de Tolima y tiene cerca de 8,500 habitantes, su población está constituida principalmente por mestizos con un estilo de vida sedentario. El segundo es el Hospital San Rafael de Girardot, ubicado en una ciudad importante en el departamento de Cundinamarca con una población de 131,354 habitantes; debido a sus condiciones climáticas favorables y gran proximidad a la capital del país, presenta una economía basada en el turismo. Por último, se encuentra el Hospital de Engativá, localizado en Bogotá D.C., al noroccidente de la capital.

La Liga contra el Cáncer en Leticia (capital del departamento de Amazonas) fue la cuarta población incluida en el estudio; esta ciudad tiene 39,636 habitantes y se encuentra localizada en una región tropical selvática de Colombia en el límite sur del país, en la frontera entre Colombia, Brasil y Perú, lo que favorece una mayor migración poblacional, adicionalmente, actúa como puerto en el río Amazonas, con una importante diversidad étnica comprendida en gran número por indígenas.

Finalmente, la quinta ciudad incluida en el estudio fue Tumaco (Hospital San Andrés de Tumaco); localizado en el departamento de Nariño, lo habitan 170,000 personas, sus costas son bañadas por el Océano Pacífico y limita con el Ecuador; cerca de la mitad de su población se encuentra en condiciones de pobreza. Las mujeres pertenecientes a esta región representan la mayoría de la población afrodescendiente incluida en este estudio (Ochoa and Montoya 2003).

Estas regiones fueron seleccionadas basadas en el supuesto que representan población con diferentes estratos socio-económicos (principalmente bajo), culturalmente diversa y con diferentes niveles de acceso a servicios de salud. Considerando que se buscaba conformar una población femenina socialmente heterogénea y con distintas tasas de mortalidad por esta neoplasia, las estadísticas previas muestran que Amazonas y Tolima presentan alto riesgo de desarrollar CCU (con tasas de mortalidad de 5.67 y 5.55 por 100,000 mujeres-año, respectivamente), las tres restantes, cuentan con población femenina con moderado riesgo de desarrollar CCU (Bogotá: 3.29, Cundinamarca: 3.22 y Nariño: 3.12 por 100,000 mujeres-año) (Ochoa and Montoya 2003).

### **7.3 Criterios de Inclusión**

Mujeres que asistan al programa de promoción y prevención de cáncer de cuello uterino, sin antecedentes de patología cervical pre-invasora o invasora, que suministren consentimiento informado y que estén en condiciones de responder el cuestionario en el que se consignan las variables medidas en este estudio.

### **7.4 Criterios de Exclusión**

Mujeres mayores de 69 años, o que presenten alteraciones en el tracto genito-urinario que impidan la toma de la muestra cervical.

## **7.5 Cálculo del Tamaño de Muestra**

Se efectuó teniendo en cuenta el objetivo general, asumiendo una prevalencia de infección por VPH estimada en mujeres de 0.25 (Mendez et al. 2005), considerando una precisión alrededor del estimador de 0.05 y un intervalo de confianza del 95%. Con estos supuestos, se requiere un tamaño mínimo de muestra de 1,778 mujeres. El cálculo se efectuó con el comando sampsi del programa STATA11®. Para calcular el número de muestras por hospital y basados en el estrato de las cinco regiones geográficas incluidas en el estudio, el número de muestras se ajustó teniendo en cuenta una asignación proporcional, donde el tamaño depende del número de citologías/año tomadas por cada hospital.

## **7.6 Metodología**

### **7.6.1 Datos Sociodemográficos y Toma de la Muestra**

Todas las mujeres recibieron información sobre el propósito del estudio, así como los riesgos y beneficios asociados a éste; aquellas que aceptaron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado y llenaron un cuestionario que considera características socio-demográficas, comportamiento sexual y factores de riesgo, antes de realizar el examen ginecológico (Anexo 1). El consentimiento informado de las mujeres menores de 18 años fue firmado por un padre o tutor.

Un total de 2,110 mujeres fueron incluidas en el estudio distribuidas así: Liga contra el cáncer Leticia-Amazonas: n = 173, Hospital San Juan Bautista, Chaparral-Tolima: n = 174, Hospital Engativá-Bogotá: n = 921, Nuevo Hospital San Rafael, Girardot-Cundinamarca: n = 334 y Hospital San Andrés, Tumaco–Nariño: n = 508. Teniendo en cuenta que la legislación colombiana para la detección de neoplasia cervical, indica que la citología convencional no es requerida para mujeres mayores de 69 años (Olmos et al. 2007), cinco mujeres con edad entre 70 a 77 años fueron excluidas del estudio.

Las muestras cervicales para el test de Papanicolau fueron recogidas y procesadas siguiendo las pautas oficiales para servicios de salud de Colombia; para esta prueba, los hallazgos citológicos fueron clasificados según el sistema Bethesda (Solomon et al. 2002; Lacruz 2003; Olmos et al. 2007). Adicional al test de Papanicolau, se recolectaron muestras para la detección de ADN-VPV empleando un citobrush, el cual fue conservado a 4°C en etanol al 95% (Lema et al. 2001). Los resultados de las lesiones identificadas por el test Pap fueron obtenidos, junto con la historia clínica de las pacientes, vía correo certificado, ya que estos exámenes fueron leídos por personal experto de cada uno de los hospitales con los que se tiene convenio.

### **7.6.2 Procesamiento de Muestra Cervical**

Las muestras fueron lavadas una única vez con tampón fosfato salino (PBS) e incubadas en 100 µL de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.45% Nonidet p-40, 0.45% Tween 20, Proteinasa K 60 µg/mL) para su digestión enzimática, primero a 60°C por 1 hora y posteriormente a 95°C por 10 minutos (Nelson et al. 2000).

Todas las muestras fueron sometidas a un protocolo de PCR con primers específicos, para amplificar un segmento de 268 pb del gen constitutivo de *β-globina* humana, esto a fin de garantizar la presencia de ADN en buena calidad y cantidad (Saiki et al. 1985) (Tabla 3). Esta PCR se realizó en un volumen final de 10 µL y contenía: 1x de Buffer de amplificación, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Polimerasa (Bioline®), 100 µM de cada dNTP (Bioline®), 1 µM de cada primer y 0.8 µg/µL de albúmina sérica bovina (BSA) (Kreader 1996). Las condiciones de termociclado consistieron de una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificación de: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos; por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 7 minutos (de Roda Husman et al. 1995).

Tipo de Primer	Primer	Secuencia ( 5'-3' )	Tamaño (pb)	Región	Referencia
<b>GH20</b>	Pr1	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	268		(Saiki et al. 1985)
<b>PC04</b>	Pr2	CAACTTCATCCACGTTCCACC			
<b>GP5+</b>	Pr1	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	150	L1	(de Roda Husman et al. 1995)
<b>GP6+</b>	Pr2	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC			
<b>MY09</b>	Pr1	CGTCCMARRGGAWACTGATC	450	L1	(Manos et al. 1989)
<b>MY11</b>	Pr2	GCMCAGGGWCATAAYAATGG			
<b>VPH-16</b>	Pr1	TCAAAGCCACTGTGTCCTGA	120	E6	(Karlsen et al. 1996)
	Pr2	CGTGTTCTTGATGATCTGCAA			
<b>VPH -18</b>	Pr1	CGACAGGAACGACTCCAACGA	202	E6-E7	(Lee et al. 2001)
	Pr2	GCTGGTAAATGTTGATGATTAAC			
<b>VPH -31</b>	Pr1	CTACAGTAAGCATTGTGCTAT	155	E5	(Karlsen et al. 1996)
	Pr2	ACGTAATGGAGAGGTTGCAATAACCC			
<b>VPH -33</b>	Pr1	AACGCCATGAGAGGACACAAG	212	E7	(Karlsen et al. 1996)
	Pr2	ACACATAAACGAACGTGGTG			
<b>VPH -45</b>	Pr1	ACGGCAAGAAAGACTTCGCA	134	E6-E7	(Karlsen et al. 1996)
	Pr2	CACAACAGGTCAACAGGATC			
<b>VPH -58</b>	Pr1	CGAGGATGAAATAGGCTTGG	109	E7	(Karlsen et al. 1996)
	Pr2	ACACAAACGAACCGTGGTGC			
<b>VPH -6/11</b>	Pr1	TGCAAGAATGCACTGACCAC	334	E6-E7	(Sotlar et al. 2004)
	Pr2	TGCATGTTGTCCAGCAGTGT			

**Tabla 3. Primers empleados en el estudio (modificada de (Camargo et al. 2011)).**

### **7.6.3 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la Identificación del ADN del Virus de Papiloma Humano (VPH)**

Las muestras que resultaron positivas para la amplificación del gen constitutivo de  $\beta$ -globina humana, fueron sometidas a detección de ADN del VPH empleando dos sets de primers de detección genérica viral, ya que está demostrado que el uso de más de un sistema de identificación ofrecer un mayor robustez y sensibilidad en la detección de infecciones múltiples (infección con más de un tipo de VPH simultáneamente), así como la detección de un bajo número copias virales, en comparación con el uso de un solo set de primers, que puede llevar a subestimar la prevalencia viral (Iftner and Villa 2003; Fuessel

Haws et al. 2004). En el presente estudio fueron utilizados primers que anillan en una región conservada del gen *L1*: el primer set es conocido como GP5+/6+, que ha sido reportado como un sistema conveniente para detección de bajas copias virales (de Roda Husman et al. 1995; Remmerbach et al. 2004) y el segundo set fue MY09/11, que tiene mayor sensibilidad para la detección de coinfecciones; estos sets de primers han sido ampliamente utilizado en numerosos estudios de identificación del VPH (Manos et al. 1989; Qu et al. 1997) (Tabla 3).

La PCR con GP5+/6+ se realizó en un volumen final de 20 µL y contenía: 1x de Buffer de amplificación, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Polimerasa (Bioline®), 100 µM de cada dNTP (Bioline®), 2 µM de cada primer; las condiciones de termociclado consistieron de una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificación de: 94°C por 1 minuto, 40°C por 2 minutos y 72°C por 1.5 minutos; por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 7 minutos (de Roda Husman et al. 1995).

La amplificación con MY09/11 se realizó en un volumen final de 20 µL y contenía: 1x de Buffer de amplificación, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Polimerasa (Bioline®), 100 µM de cada dNTP (Bioline®), 2 µM de cada primer; las condiciones de termociclado consistieron de una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificación de: 94°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 7 minutos (Manos et al. 1989).

Para estas reacciones de PCR, fue empleado como control positivo ADN extraído de células Sf21 transfectadas con un vector que contenía el gen de *L1* de VPH-16, y como blanco de amplificación fue empleada agua destilada ultrapura (GIBCO). Las amplificaciones con los primers genéricos fueron realizadas dos veces, en diferentes tiempos, para descartar contaminación de las muestras y falsos positivos.

#### **7.6.4. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la Tipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH)**

Las muestras que resultaron positivas para uno o los dos sets de primers de identificación genérica, fueron posteriormente tipificadas con primers específicos dirigidos a los genes *E5*, *E6* y *E7*, que codifican para las proteínas tempranas del virus (Tabla 3). En este trabajo fueron evaluadas la prevalencias de dos tipos de bajo riesgo VPH-BR-6/-11 y seis tipos de alto riesgo VPH-AR-16, -18, -31, -33, -45 y -58, asociados con el ~90% de los CCU a nivel mundial (Parkin et al. 2008); adicionalmente, los tipos virales detectados en el presente estudio, han sido reportados previamente como los de mayor incidencia y prevalencia de infección en estudios realizados para Colombia (Molano et al. 2002).

La amplificación para VPH-16 se realizó en un volumen final de 15  $\mu$ L y contenía: 1x de Buffer de amplificación, 3 mM de  $MgCl_2$ , 1 U Taq Polimerasa (Bioline®), 100  $\mu$ M de cada dNTP (Bioline®), 40 pmol de cada primer; las condiciones de termociclado consistieron de una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificación de: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto; por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 10 minutos (Karlsen et al. 1996). Para la tipificación de VPH-18, la PCR fue corrida en condiciones similares a las descritas, con excepción de: 1.5 mM de  $MgCl_2$  y 30 pmol de cada primer, las condiciones de termociclado consistieron de una denaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificación de: 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 7 minutos (Lee et al. 2001).

La PCR que tipifica los tipos VPH-31 y -33 fue corrida en un volumen final de 10  $\mu$ L dentro de las siguientes condiciones: 1x de Buffer de amplificación, 4 mM de  $MgCl_2$ , 1 U Taq Polimerasa (Bioline®), 250  $\mu$ M de cada dNTP (Bioline®), 10 pmol de cada primer; las condiciones de termociclado consistieron de una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificación de: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto

y 72°C por 1 minuto; por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 5 minutos (Karlsen et al. 1996).

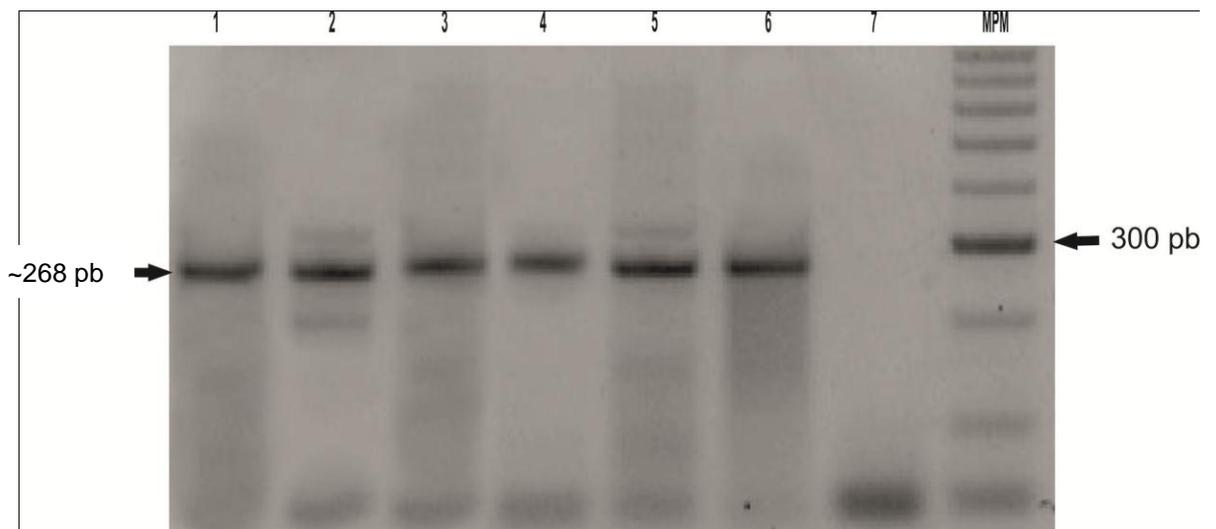
Las PCRs que tipificaron los tipos VPH-45 y -58 fueron corridas en condiciones similares a las descritas para VHP-31 pero con excepción de: 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 pmol de cada primer; las condiciones de termociclado fueron idénticas a las anteriormente referidas, a excepción de la temperatura de anillamiento que fue de 65 °C por 1 minuto (Karlsen et al. 1996).

Por último, la PCR empleada para tipificar VPH-6/11 se realizó en un volumen final de 15 µL y contenía: 1x de Buffer de amplificación, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Polimerasa (Bioline®), 200 µM de cada dNTP (Bioline®), 1 µM de cada primer; las condiciones de termociclado consistieron de una denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificación de: 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos; al final, se realizó un paso de elongación a 72°C por 4 minutos (Sotlar et al. 2004).

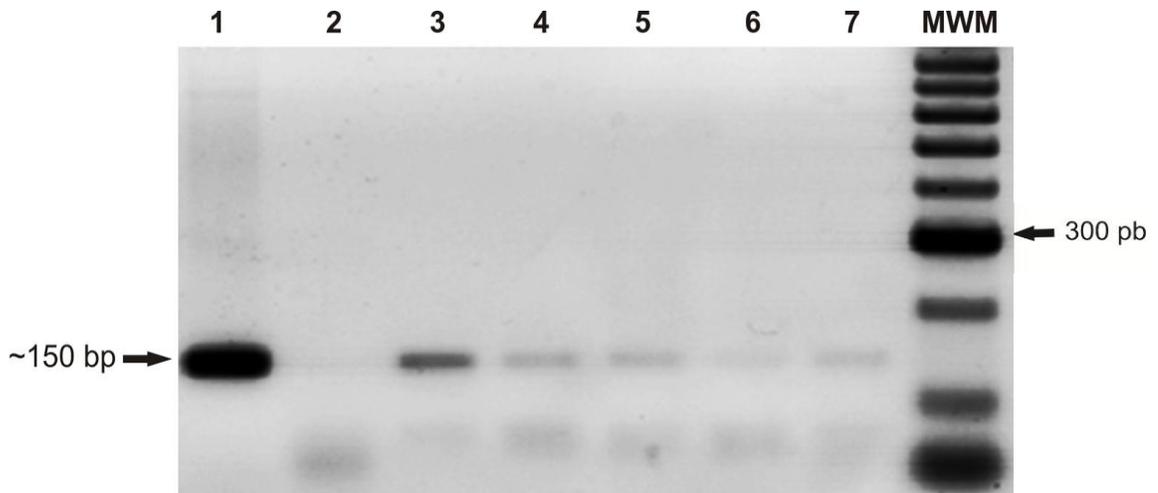
Como control positivo para los tipos VPH-18, -31, -45, -58 fueron utilizados genes sintéticos (Orjuela et al. 2007), mientras que para VPH-6/11, -16 y -33 fueron empleados muestras infectadas; como blanco de amplificación fue empleada agua destilada ultrapura (GIBCO®).

### 7.6.5 Visualización de los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

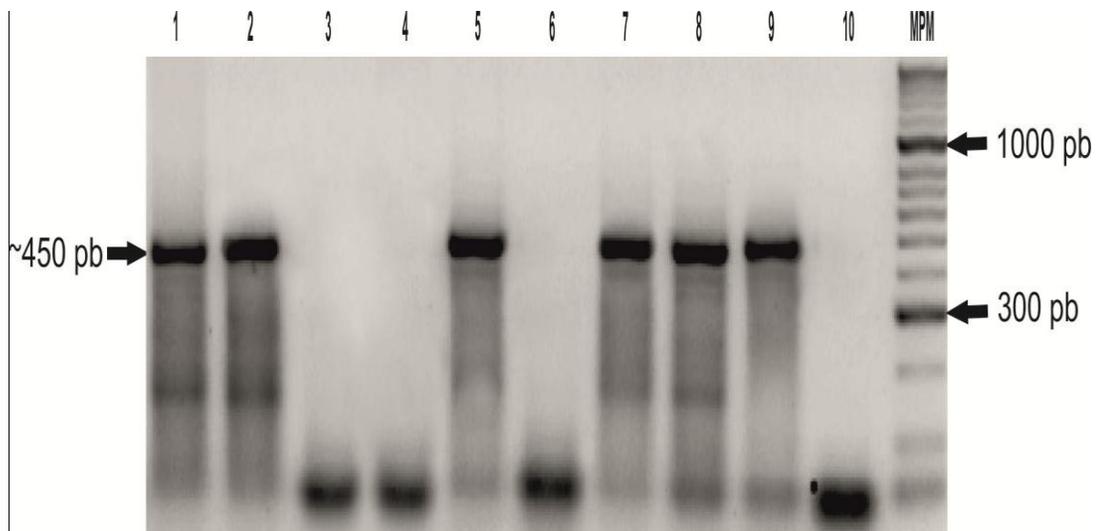
Todos los productos de la PCR fueron visualizados por medio de un corrido en un gel de agarosa al 2%, teñidos con SYBR safe (agente intercalante, DNA Gel stain 10000x, Invitrogen®) (Ver figuras 5, 6, 7, 8 y 9).



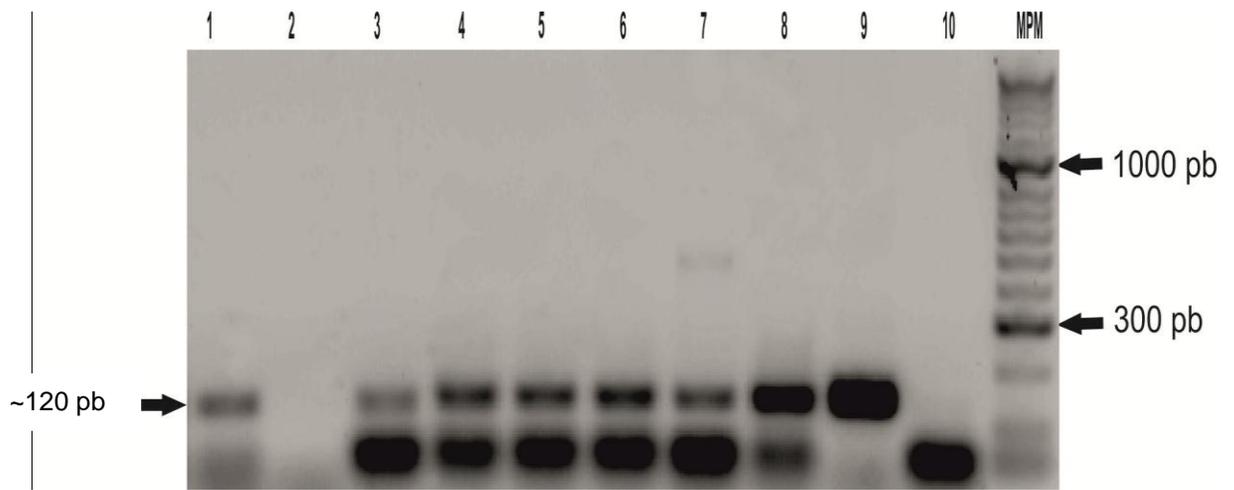
**Fig 5.** Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 268 pb del gen de  $\beta$ -globina. Carril 1 a 5 muestras amplificadas de mujeres que ingresaron al estudio, carril 6 control positivo, carril 7 blanco de amplificación, carril 8 patrón de peso molecular (HyperLadder II/ lane. Bioline).



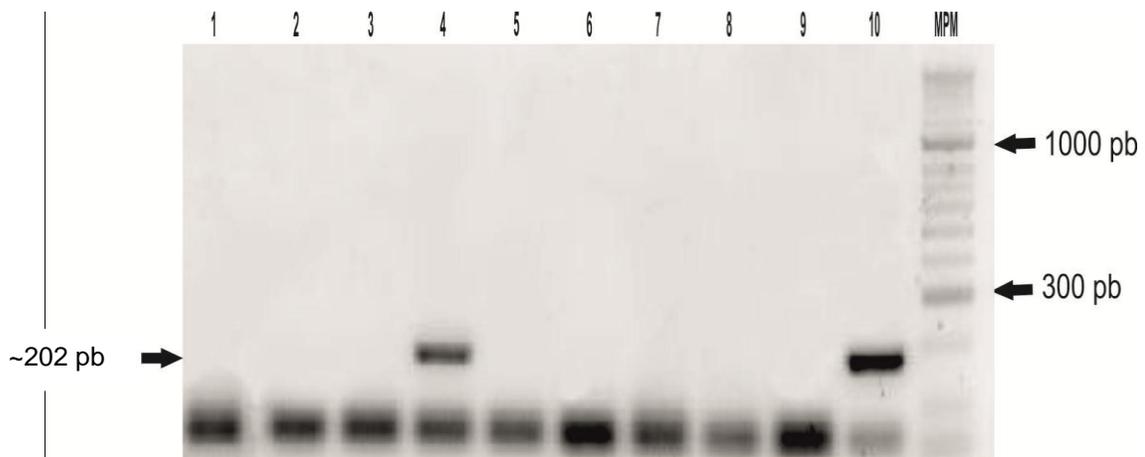
**Fig 6.** Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 150 pb de región conservada del gen *L1*. Carril 3 a 7 muestras amplificadas de mujeres que ingresaron al estudio, carril 1 control positivo, carril 2 blanco de amplificación, carril 8 patrón de peso molecular (HyperLadder II/ lane. Bioline).



**Fig 7.** Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 450 pb de región conservada del gen *L1*. Carril 1 a 8 muestras amplificadas de mujeres que ingresaron al estudio, carril 9 control positivo, carril 10 blanco de amplificación, carril 11 patrón de peso molecular (HyperLadder II/ lane. Bioline).



**Fig 8.** Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 120 pb dirigidos al gen *E6*, que codifican para las proteínas tempranas del virus. Carril 1 a 8 muestras amplificadas de mujeres que ingresaron al estudio, carril 9 control positivo, carril 10 blanco de amplificación, carril 11 patrón de peso molecular (HyperLadder II/ lane. Bioline).



**Fig 9.** Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 202 pb dirigidos a los genes *E6-E7*, que codifican para las proteínas tempranas del virus. Carril 1 a 8 muestras amplificadas de mujeres que ingresaron al estudio, carril 9 blanco de amplificación, carril 10 control positivo, carril 11 patrón de peso molecular (HyperLadder II/ lane. Bioline).

### 7.6.6 Análisis Estadístico

Todas las frecuencias se presentaron en porcentajes, con sus intervalos de confianza (IC) al 95%. Las diferencias en proporciones fueron evaluadas usando  $\chi^2$  y test exacto de Fisher. Variables como edad, método anticonceptivo, gestaciones, edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales, estado civil, etnia y región geográfica (ciudad) fueron tratadas como variables categóricas.

Para el análisis de asociación, fue establecida una dirección teórica donde la variable dependiente fue el resultado de infección-coinfección y las variables independientes fueron aquellas establecidas previamente como categóricas. La fuerza de asociación fue medida empleando ORs con sus respectivos IC al 95%.

Se realizó regresión logística binomial para evaluar las relaciones entre factores de riesgo e infección (tomado como un resultado binomial). Además, una regresión logística para datos ordinales fue utilizada para la estimación de ORs ajustados, teniendo en cuenta la presencia de cualquiera de los tres niveles de infección (no infección - única - múltiple). Un modelo logístico ordinal se llevó a cabo para evaluar la asociación entre las variables dependientes (estado de infección), y la interacción entre las variables de gestaciones, número de compañeros sexuales, raza y región geográfica; para este propósito, se utilizó un modelo “stepwise” usando 0.15 como probabilidad de entrada al modelo y 0.2 como probabilidad de salida; todas las pruebas de hipótesis fueron fijadas a un nivel de significación del 5%. Los diferentes procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el programa STATA11®.

## **8. ASPECTOS ÉTICOS, CONSENTIMIENTO Y CONFIDENCIALIDAD**

A todas las mujeres que aceptaron voluntariamente ingresar al estudio, se les tomó una muestra de tejido cervical, por medio del mismo colector de células (citobrush) utilizado para la citología, este examen de rutina no implica ningún riesgo para la mujer. Estos cepillos son colectados y transportados en un adecuado medio de preservación y dirigidos al laboratorio de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) para los análisis respectivos. Cada muestra llegó identificada con su respectivo nombre, número de cédula, lugar de origen (ciudad) y número de historia clínica. Al llegar al laboratorio, estos datos fueron consignados en un libro y una base de datos electrónica a partir de las cuales se les asignó un número consecutivo según el orden de llegada. Estos datos fueron conocidos únicamente por el investigador que envía el resultado a cada hospital, puesto que los mismos fueron empleados por el ginecólogo tratante como guía de manejo de cada mujer; todas las muestras son manejadas por número consecutivo y manteniendo la confidencialidad de los nombres.

Según las “PAUTAS INTERNACIONALES PARA LA EVALUACIÓN ÉTICA DE LOS ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS”, preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), es fundamental identificar de forma precisa a toda persona estudiada y luego de establecerse las identidades para compilar las tablas estadísticas, se debe borrar la información de identificación personal, con la finalidad de proteger la privacidad y confidencialidad; todo esto fue realizado y contemplado en nuestros estudios y en el momento de configurar los datos para las publicaciones (CIOMS and OMS 1991).

Con el material biológico que llega por paciente, lo primero que se realizó fue guardar una alícuota de las células en el medio de preservación y su posterior mantenimiento a -4°C, en una citoteca; a las mujeres se les informó que la muestra estaba a su disposición, en el caso que desearan retirarla de las instalaciones de la FIDIC. La metodología a utilizar con el resto de la muestra, fue realizar una extracción de ADN, a fin de ser la materia prima para la identificación y tipificación viral. El único procedimiento que involucra amplificación de ADN genómico de origen humano es el que se realiza con la finalidad de establecer si la muestra que llega presenta ADN celular en buena cantidad y calidad, por lo que se realiza la amplificación de un gen constitutivo celular (gen de  $\beta$ -globina humana).

Los estudios a desarrollar con estos resultados son de tipo epidemiológico; esto indica que son básicamente observacionales con encuestas y resultados de exámenes médicos rutinarios, como lo es el test de Papanicolau.

Todas las mujeres que aceptaron participar en el presente estudio firmaron un consentimiento informado y llenaron un cuestionario que considera características socio-demográficas, conducta sexual y factores de riesgo (Anexo 1); estos datos fueron recolectados antes de realizar el examen ginecológico. Ya que este trabajo involucró diferentes centros hospitalarios bajo el marco de un estudio multicéntrico, todos los procedimientos que se llevaron a cabo fueron aprobados y supervisados por el comité de ética de cada Hospital involucrado. El protocolo fue basado en las normas establecidas por las instituciones participantes y sus correspondientes Comités de Ética; la información recolectada para fines del estudio se consideró confidencial.

Adicionalmente, siendo esta una investigación en la cual el sujeto de estudio comprendió seres humanos, para el objeto, la población fue compuesta exclusivamente por mujeres, prevaleciendo en ellas el criterio del respeto a su dignidad, la protección de sus derechos y su bienestar. Esta investigación se justificó en los principios científicos y éticos, está fundamentada en hallazgos clínicos y epidemiológicos reportados previamente en la literatura científica a nivel mundial.

Basados en la Resolución No 008430 de 1993, establecida por el Ministerio de Salud de la República de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y

administrativas para la investigación en salud, los siguientes aspectos fueron contemplados durante el desarrollo de este estudio:

- El aspecto más importante fue la seguridad de los beneficiarios y establecimiento claro de los riesgos (los cuales para efectos de estos trabajos son mínimos).
- El establecimiento de un Consentimiento Informado y por escrito del sujeto de investigación.
- Fue realizada por profesionales con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano bajo la supervisión y responsabilidad de entidades de salud, que contaban con los recursos humanos y materiales necesarios que garantizar el bienestar del sujeto de investigación.
- El proyecto se ejecutó sólo cuando se obtuvo la autorización del representante legal de la institución investigadora y de la institución donde se estableció el convenio para la ejecución de la misma.

Con respecto a los beneficios obtenidos para las mujeres que participan en el estudio, está el conocer si presentan o no infección por VPH, así como del tipo viral infectante; adicionalmente, estos resultados son una importante herramienta para los ginecólogos tratantes, ya que les permiten una mayor precisión en el diagnóstico y tratamiento a seguir.

## 9. RESULTADOS

Un total de 2,110 mujeres aceptaron participar en el estudio, de las cuales fueron excluidas del análisis estadístico 295 muestras (14%) por presentar resultado negativo para la amplificación del gen de *β-globina* humana y 5 muestras (0.2%) por haber sido tomadas en mujeres mayores de 69 años.

Un total 1,810 mujeres (con edades entre 14-69 años, media = 38.9, DS= 11.9) fueron sometidas a la identificación del ADN viral y sus datos, empleados en los análisis estadísticos del presente trabajo. La distribución por ciudad fue: 7.7% muestras provenientes de Leticia-Amazonas, 8.2% de Chaparral-Tolima, 44% del Hospital de Engativá-Bogotá, 17.6% de Girardot-Cundinamarca y 22.5% de Tumaco-Nariño (Tabla 4).

Los hallazgos citológicos (test Pap) fueron clasificados según el sistema Bethesda; de acuerdo con este criterio, 92 pruebas (5.1%) presentaron resultado insatisfactorio o perdido, 1,563 (86.4%) fueron negativas para lesiones intraepiteliales o malignidad y 155 (8.5%) mostraron anomalías citológicas, siendo este último porcentaje ligeramente superior a lo reportado para otras poblaciones colombianas (Uribe et al. 2006). A su vez, los hallazgos citológicos anormales fueron: 92 (5.1%) muestras con resultado de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), 50 (2.7%) presentaron lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL) y 13 (0.7%) fueron reportadas con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (H-SIL).

Variable	Regiones <sup>b</sup>					
	Leticia- Amazonas (n=139)	Chaparral- Tolima (n=149)	Engativá- Bogotá (n=796)	Girardot- Cundinamarca (n=320)	Tumaco- Nariño (n=406)	Total (n=1,810)
<b>Edad</b>	39.7[17-68] DS=12.0	35.7[15-66] DS =10.9	39.9[17-69] DS =12.1	41.0[16-69] DS =12.2	35.8[14-62] DS =10.3	38.8[14-69] DS =11.8
<b>Raza (%)</b>						
Blanca	24.6	7.1	9.7	52.7	3.9	17.0
Indígena	25.4	1.4	0.1	0.4	1.7	2.6
Mestizo	46.4	90.0	86.3	42.5	13.8	59.2
Negra	3.6	1.5	3.9	4.4	80.6	21.2
<b>Estado civil (%)</b>						
Soltera	14.1	7.0	26.6	16.8	1.4	16.7
Casada	22.4	36.6	26.7	24.8	9.4	22.9
Unión Libre	46.3	49.4	33.0	46.3	88.5	50.2
Separada	12.7	4.9	11.0	8.6	0.0	7.7
Viuda	4.5	2.1	2.7	3.5	0.7	2.5
<b>Edad primera relación sexual (%)</b>						
<15	34.1	30.2	21.8	18.2	31.7	25.0
16-17	21.8	24.6	23.1	30.3	29.9	25.9
18-19	24.9	21.2	26.0	22.2	23.8	24.4
>19	19.3	24.0	29.0	29.3	14.6	24.7
<b>Gestaciones (%)</b>						
Ninguna	9.2	0.9	7.9	7.4	4.7	6.7
1-2	29.0	27.1	41.9	35.6	28.1	35.7
2-3	31.3	42.4	36.1	37.8	31.6	35.4
>4	30.5	29.6	14.1	19.2	35.6	22.2
<b>Hallazgo citológico (%)</b>						
Normal	99.3	98.7	83.4	95.3	96.0	91.0
Anormal	0.7	1.3	16.6	4.7	4.0	9.0
<b>Número de compañeros sexuales (%)</b>						
1	39.1	45.8	41.1	52.0	39.4	42.8
2-3	42.2	45.1	46.2	42.8	53.3	46.8
>3	18.7	9.1	12.7	5.2	7.3	10.4
<b>Método anticonceptivo (%)</b>						
Ninguno	44.7	37.6	45.0	41.9	36.8	42.1
Anticonceptivos orales	6.8	4.5	3.2	10.9	5.3	5.4
Cirugía	31.1	39.2	24.9	33.3	39.4	31.1
Condón	4.5	3.6	6.1	5.0	1.7	4.6
DIU (Dispositivo intrauterino)	3.0	14.2	15.1	8.6	8.6	11.5
Anticonceptivos inyectables	9.9	0.9	5.7	0.3	8.2	5.3
<b>Fuma (%)</b>						
Si	9.3	4.0	14.0	11.6	7.6	11.0
No	90.7	96.0	86.0	88.4	92.4	89.0

<sup>a</sup> media [rango]; DS =desviación estándar

<sup>b</sup> El número de mujeres para cada región corresponde a las muestras de ADN de buena calidad (positivo para  $\beta$ -globina humana)

Los valores se expresan en porcentajes, excepto Edad.

**Tabla 4. Perfil demográfico de las 1,810 mujeres incluidas en el estudio con amplificación positiva para el gen de  $\beta$ -globina humana (modificada de (Camargo et al. 2011)).**

Las muestras positivas para el gen  $\beta$ -globina fueron analizadas con los dos sets de primers genéricos, a fin de identificar la presencia de ADN de VPH (tomando como positiva la amplificación con GP5+/6+, MY09/11 o ambas). Se detectaron como positivas para el virus 897 (49.6%) mujeres, de éstas, 581 mujeres (64.8%) presentaron coinfección. Utilizando el set de primers genéricos GP5+/6+ hubo amplificación positiva para 457 (25.2%) muestras, mientras que empleando el sistema de identificación MY09/11, hubo amplificación positiva en 702 (38.8%) muestras (Tabla 5).

GP5+/6+	MY09/11		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	913	440	1,353
Positivo	195	262	457
Total	1,108	702	1,810

**Tabla 5. Detección de ADN de VPH empleando dos sets de primers de identificación genérica (GP5+/6+ y MY09/11)**

Las frecuencias de infección con VPH para cada ciudad fueron: en Leticia 85 mujeres (61.1%; IC 95%: 42.05-69.08), en Chaparral 81 mujeres (54.3%; IC 95%: 46.01-62.53), en Engativá 367 mujeres (46.1%; IC 95%: 42.48-49.51), en Girardot 165 mujeres (51.6%; IC 95%: 46.09-57.29) y en Tumaco 199 mujeres (49.0%; IC 95%: 44.05-54.23) (Tabla 6).

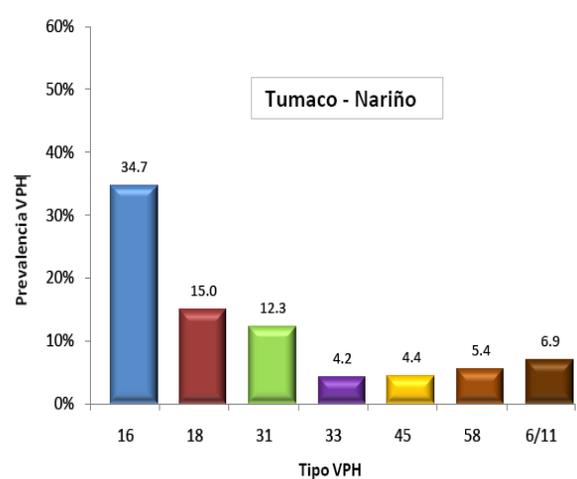
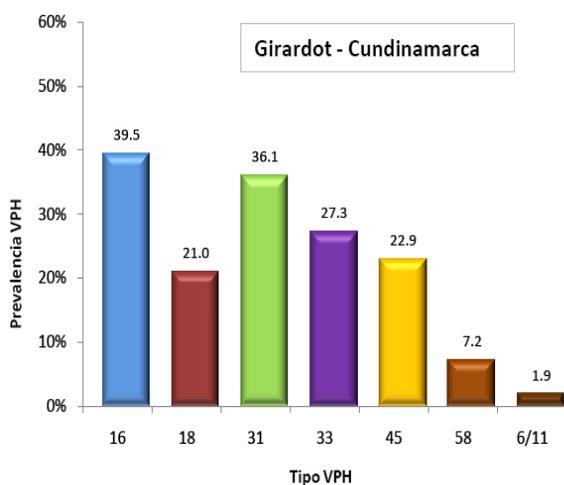
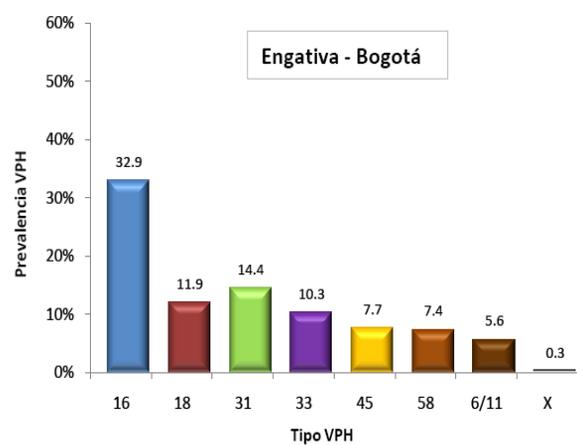
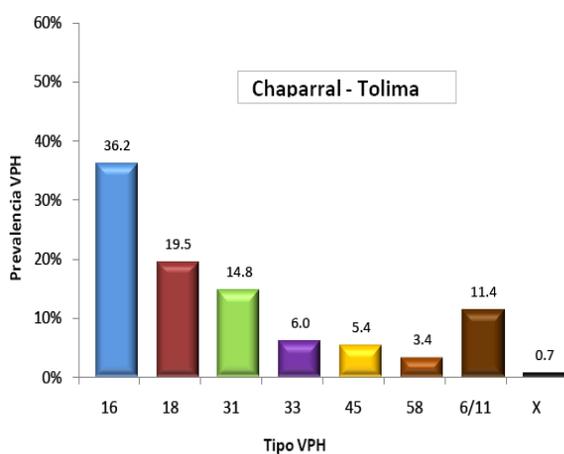
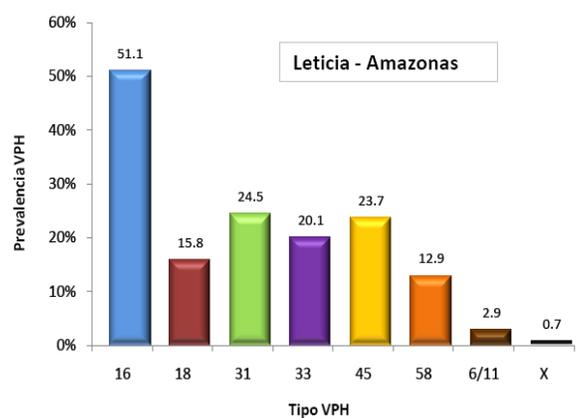
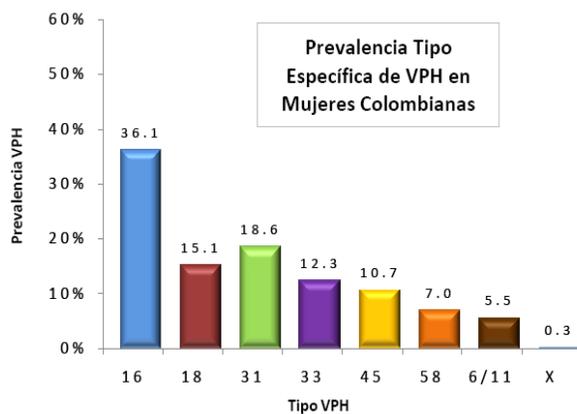
El tipo viral más frecuentemente encontrado fue VPH-16, seguido en orden decreciente por el VPH-31, -18, -33, -45, -58 y -6/11; adicionalmente, los VPH-BR fueron detectados solo en coinfección con virus de alto riesgo. Se observó una distribución similar de frecuencias de infección viral para Engativá, Leticia y Girardot, sin embargo, las mayores frecuencias de coinfección fueron encontradas en las dos últimas ciudades ( $p = 0.010$ ) (Tabla 6). En Chaparral y Tumaco, el VPH-18 fue el segundo tipo más prevalente, seguido en orden decreciente por VPH-31, -33, -45 y -58 (Fig. 5).

<b>Región</b>	<b>Sin Infección n (%)<sup>a</sup></b>	<b>Infección Única n (%)<sup>a</sup></b>	<b>Infección Múltiple n (%)<sup>a</sup></b>	<b>Total</b>
Leticia-Amazonas	54 (38.9)	19 (13.7)	66 (47.4)	139
Chaparral-Tolima	68 (45.6)	31 (20.9)	50 (33.5)	149
Engativá-Bogotá	429 (53.8)	153 (19.3)	214 (26.9)	796
Girardot-Cundinamarca	155 (48.4)	19 (6.0)	146 (45.6)	320
Tumaco-Nariño	207 (51.0)	94 (23.2)	105 (25.8)	406
<b>Total</b>	<b>913 (50.4)</b>	<b>316 (20.2)</b>	<b>533 (29.4)</b>	<b>1,810</b>

<sup>a</sup> Los porcentajes se calculan por filas

**Tabla 6. Frecuencias relativas de infección por VPH única y múltiple de acuerdo a las diferentes regiones (modificada de (Camargo et al. 2011)).**

Cuando se analizaron las infecciones por VPH y el sitio de origen de las mujeres, fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre las distintas ciudades (Figura 10). El porcentaje más alto de VPH-16 (en referencia a los demás VPH detectados) se observó en Leticia-Amazonas ( $p = 0.004$ ) y el de VPH-18, en Girardot-Cundinamarca y Chaparral-Tolima ( $p = 0.001$ ). VPH-31, -33 y -45 fueron detectados con mayor frecuencia en Girardot-Cundinamarca y Leticia-Amazonas ( $p = 0.000$ ), mientras que el VPH-58 fue identificado predominantemente en Girardot-Cundinamarca, Leticia Amazonas y Engativá-Bogotá ( $p = 0.002$ ). Por último, VPH-6/11 fue detectado con mayor frecuencia en Chaparral-Tolima ( $p = 0.000$ ).



**Fig 10. Distribución de la prevalencia de los diferentes tipos de VPH entre 1,810 mujeres provenientes de diferentes regiones geográficas (modificada de (Camargo et al. 2011)).**

Con el fin de evaluar las asociaciones entre parejas de tipos de VPH, se calcularon OR crudos y ajustados; los resultados mostraron que mujeres infectadas con VPH tienen un incremento en la frecuencia de infección con otro tipo viral; esta asociación positiva se observó principalmente para VPH-31 y -33. Adicionalmente, se observó que VPH-16 se asocia con todos los tipos virales detectados en este estudio, VPH-18 con VPH-6/-11, VPH-31, VPH-33 y VPH-45, mientras VPH-6/-11 mostró asociación sólo con los tipos VPH-16 y -18 (Tabla 7). Al ajustar los ORs todas las asociaciones continuaron siendo estadísticamente significativas.

Cuando se calculó la asociación entre infección por VPH (definida como muestras positivas con uno o ambos sets de primers de identificación genérica) y los factores de riesgo asociados con el desarrollo de CCU (edad, método anticonceptivo, gestaciones, edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales, estado civil, etnia-raza y región geográfica), el análisis de regresión mostró a tres de estos factores como fuertemente asociados con cualquier infección por VPH: el número de embarazos, la ciudad y el número de parejas sexuales.

El primero de ellos, el número de embarazos, presentó una asociación de riesgo para mujeres que reportaron ningún embarazo en comparación con aquellas que tenían 4 o más embarazos a término. El siguiente factor asociado a riesgo fue la región geográfica de donde provenían las mujeres, donde el mayor riesgo fue observado en aquellas procedentes de Chaparral y Leticia, en comparación con las mujeres pertenecientes a Engativá. Por último, en cuanto al número de parejas sexuales, mujeres que reportaron dos a tres compañeros sexuales durante su vida, presentaron menor riesgo de infección con VPH, en comparación con aquellas que dijeron haber tenido solo un compañero sexual (Tabla 8).

Tipo VPH, ORs	VPH-6/-11		VPH -58		VPH -45		VPH -33		VPH -31		VPH -18	
	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si
<b>VPH-16</b>												
No	195	49	181	63	185	59	168	76	121	123	168	76
Si	604	51	590	65	522	133	506	149	442	213	456	199
OR crudo	<b>1.91</b>		<b>1.88</b>		<b>4.79</b>		<b>4.20</b>		<b>4.09</b>		<b>6.22</b>	
(CI 95%) <sup>a</sup>	(1.27–2.86)		(1.31–2.70)		(3.47–6.63)		(3.12–5.64)		(3.19–5.24)		(4.67–8.28)	
OR <sup>b</sup>	<b>1.85</b>		<b>1.98</b>		<b>5.00</b>		<b>4.60</b>		<b>4.18</b>		<b>6.83</b>	
Ajustado (CI 95%)	(1.20–2.87)		(1.35–2.90)		(3.54–7.06)		(3.36–6.32)		(3.21–5.44)		(5.02–9.29)	
<b>VPH-18</b>												
No	551	73	519	105	489	135	480	144	394	230		
Si	248	27	252	23	217	58	194	81	168	107		
OR crudo	<b>2.18</b>		1.23		<b>2.78</b>		<b>4.04</b>		<b>3.62</b>			
(CI 95%) <sup>a</sup>	(1.37–3.47)		(0.77–1.97)		(1.98–3.90)		(2.96–5.52)		(2.74–4.79)			
OR <sup>b</sup>	<b>1.98</b>		1.26		<b>2.78</b>		<b>4.20</b>		<b>4.08</b>			
Ajustado (CI 95%)	(1.19–3.30)		(0.77–2.07)		(1.93–4.00)		(3.00–5.88)		(3.02–5.51)			
<b>VPH-31</b>												
No	487	75	499	63	463	99	498	64				
Si	312	25	272	65	243	94	176	161				
OR crudo	1.49		<b>5.27</b>		<b>5.38</b>		<b>20.21</b>					
(CI 95%) <sup>a</sup>	(0.93–2.39)		(3.65–7.63)		(3.93–7.37)		(14.54–28.09)					
OR <sup>b</sup>	1.63		<b>5.27</b>		<b>4.91</b>		<b>19.79</b>					
Ajustado (CI 95%)	(0.98–2.72)		(3.55–7.83)		(3.52–6.86)		(13.94–28.09)					
<b>VPH-33</b>												
No	584	90	590	84	553	121						
Si	215	10	181	44	153	72						
OR crudo	0.77		<b>4.30</b>		<b>5.71</b>							
(CI 95%) <sup>a</sup>	(0.39–1.51)		(2.89–6.39)		(4.08–7.99)							
OR <sup>b</sup>	0.97		<b>4.26</b>		<b>5.15</b>							
Ajustado (CI 95%)	(0.49–1.94)		(2.78–6.52)		(3.60–7.38)							
<b>VPH-45</b>												
No	617	89	619	87								
Si	182	11	152	41								
OR crudo	1.04		<b>4.70</b>									
(CI 95%) <sup>a</sup>	(0.54–1.98)		(3.13–7.05)									
OR <sup>b</sup>	1.20		<b>4.84</b>									
Ajustado (CI 95%)	(0.60–2.38)		(3.14–7.45)									
<b>VPH-58</b>												
No	677	94										
Si	122	6										
OR crudo	0.82											
(CI 95%) <sup>a</sup>	(0.35–1.92)											
OR <sup>b</sup>	0.64											
Ajustado (CI 95%)	(0.23–1.79)											

**Tabla 7. Asociaciones de acuerdo a las parejas de tipos de VPH**

Todos los factores descritos, fueron analizados según los datos de coinfección, siendo similares a aquellos observados para la sumatoria de infecciones únicas y múltiples por VPH, con excepción de la variable etnia, cuyas categorías presentaron diferencias. Dentro de ésta, las mujeres indígenas presentaron un mayor riesgo de coinfección por VPH al ser comparadas con las mujeres que respondieron ser blancas en la encuesta. Además, la ciudad a la que pertenecen, ya que las mujeres provenientes de Girardot y Leticia presentaron un mayor riesgo de contraer infecciones múltiples (Tabla 9).

Las variables evaluadas continuaron siendo significativas cuando fueron corridas con un modelo stepwise, en el que términos de interacción fueron incluidos para determinar si estos tenían algún efecto en el modelo; los resultados obtenidos fueron: embarazos-nuliparidad (OR ajustado: 1.56; IC 95%: 1.07-2,29), de 2 a 3 compañeros sexuales (OR ajustado: 0.81; IC 95%: 0.67-0.98), la etnia indígena (OR ajustado: 2.26; IC 95%: 1.13-4.52) y, por último, las dos ciudades: Girardot (OR ajustado: 1.60; IC 95%: 1.23-2.07) y Leticia (OR ajustada: 1.92; IC 95%: 1.28-2.88).

Factores de riesgo	Infección con VPH (única y múltiple) n (%)	ORs crudos (95% CI)	ORs ajustados (95% CI)
<b>Edad</b>			
<24	115 (52.0)	1.00 (---)	
25-34	235 (50.9)	0.95 (0.69 – 1.32)	0.98 (0.68 – 1.42)
35-44	238 (47.2)	0.82 (0.60 – 1.13)	0.92 (0.61 – 1.37)
45-54	194 (48.3)	0.86 (0.62 – 1.43)	0.95 (0.61 – 1.47)
>55	95 (51.6)	0.98 (0.66 – 1.45)	1.04 (0.61 – 1.76)
<b>Método anticonceptivo</b>			
Ninguno	357 (49.1)	1.00 (---)	
Anticonceptivo oral	48 (51.6)	1.10 (0.71– 1.69)	1.09 (0.68– 1.74)
Cirugía	255 (47.5)	0.93 (0.74 – 1.17)	0.94 (0.73 – 1.23)
Condón	40 (50.0)	1.03 (0.65 – 1.64)	1.01 (0.61 – 1.67)
DIU (Dispositivo intrauterino)	102 (51.5)	1.09 (0.80 – 1.50)	1.06 (0.75 – 1.50)
Anticonceptivos inyectables	51 (55.4)	1.28 (0.83 – 1.99)	1.20 (0.74 – 1.92)
<b>Gestaciones</b>			
Ninguna	68 (58.7)	<b>1.47 (1.00 – 2.17)</b>	<b>1.78 (1.04 – 3.04)</b>
1-2	305 (49.0)	0.97 (0.80 – 1.18)	1.14 (0.82 – 1.60)
3-4	309 (50.1)	1.03 (0.84 – 1.25)	1.18 (0.88 – 1.58)
>4	181 (46.8)	1.00 (---)	
<b>Edad primera relación sexual</b>			
<15	207 (47.6)	1.00 (---)	
16-17	236 (51.9)	1.20 (0.92 – 11.56)	1.22 (0.92 – 1.62)
18-19	209 (48.9)	1.06 (0.81 – 1.39)	1.13 (0.84 – 1.52)
>19	212 (48.9)	1.06 (0.81 – 1.39)	1.04 (0.75 – 1.44)
<b>Número de compañeros sexuales</b>			
1	385 (51.7)	1.00 (---)	
2-3	376 (46.1)	<b>0.80 (0.65 – 0.97)</b>	<b>0.79 (0.63 – 0.99)</b>
>3	92 (51.1)	0.97 (0.70 – 1.35)	0.96 (0.66 – 1.39)
<b>Estado civil</b>			
Soltera	144 (48.3)	1.00 (---)	
Casada	206 (50.5)	1.09 (0.80 – 1.47)	1.06 (0.74 – 1.54)
Unión libre	444 (49.5)	1.04 (0.80 – 1.36)	1.05 (0.76 – 1.46)
Separada	61 (44.2)	0.84 (0.56 – 1.27)	0.93 (0.59 – 1.47)
Viuda	27 (61.3)	1.69 (0.88 – 3.25)	1.72 (0.82 – 3.59)
<b>Raza</b>			
Blanca	152 (50.3)	1.00 (---)	
Indígena	30 (65.2)	1.85 (0.96 – 3.54)	2.03 (0.90 – 4.58)
Mestizo	517 (49.0)	0.95 (0.73 – 1.22)	1.01 (0.81 – 1.50)
Negra	182 (48.1)	0.91 (0.67 – 1.24)	0.92 (0.58 – 1.46)
<b>Ciudad</b>			
Engativa	367 (46.1)	1.00 (---)	
Chaparral	81 (54.3)	1.23 (0.88 – 1.72)	<b>1.66 (1.01 – 2.71)</b>
Girardot	165 (51.6)	1.01 (0.86 – 1.40)	1.25 (0.91 – 1.72)
Leticia	85 (61.1)	<b>1.66 (1.16 – 2.37)</b>	<b>1.82 (1.14 – 2.91)</b>
Tumaco	199 (49.0)	0.97 (0.77 – 1.21)	1.26 (0.83 – 1.93)

<sup>a</sup> Valores con p <0.05 son indicados en negrita

<sup>b</sup> OR ajustado por edad, método anticonceptivo, gestaciones, edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales, estado civil, etnia-raza y región geográfica

**Tabla 8. Factores de riesgo asociados a infección por VPH en cualquier estado (única y múltiple) (modificada de (Camargo et al. 2011)).**

Factores de riesgo	Infección múltiple n (%) <sup>c</sup>	ORs crudos (95% CI)	ORs ajustados (95% CI)
<b>Edad</b>			
<24	81 (70.4)	1.00 (---)	
25-34	140 (59.6)	0.90 (0.66 – 1.22)	0.95 (0.67 – 1.34)
35-44	142 (59.6)	0.77 (0.57 – 1.04)	0.86 (0.58 – 1.25)
45-54	138 (71.1)	0.90 (0.65 – 1.23)	0.96 (0.63 – 1.46)
>55	69 (72.6)	1.02 (0.70 – 1.48)	1.03 (0.62 – 1.70)
<b>Método anticonceptivo</b>			
Ninguno	226 (63.31)	1.00 (---)	
Anticonceptivo oral	34 (70.8)	1.17 (0.77– 1.77)	1.09 (0.70 – 1.71)
Cirugía	159 (62.3)	0.92 (0.74 – 1.13)	0.98 (0.76 – 1.25)
Condón	31 (77.5)	1.06 (0.68 – 1.65)	1.04 (0.65 – 1.66)
DIU (Dispositivo intrauterino)	68 (66.6)	1.07 (0.80 – 1.44)	1.09 (0.78 – 1.52)
Anticonceptivos inyectables	31 (60.7)	1.15 (0.77 – 1.71)	1.13 (0.73 – 1.75)
<b>Gestaciones</b>			
Ninguna	43 (63.27)	<b>1.64 (1.11 –2.43)</b>	<b>1.67 (1.01 – 2.76)</b>
1-2	199 (65.2)	1.09 (0.85 – 1.39)	1.12 (0.81 – 1.54)
3-4	195(63.1)	1.08 (0.85 –1.38)	1.10 (0.83 – 1.45)
>4	120 (66.3)	1.00 (---)	
<b>Edad primera relación sexual</b>			
<15	138 (66.6)	1.00 (---)	
16-17	163 (69.0)	1.20 (0.93 – 1.54)	1.18 (0.90 – 1.55)
18-19	130 (62.2)	1.07 (0.83 – 1.38)	1.12 (0.84 – 1.48)
>19	131 (61.7)	1.07 (0.83 – 1.38)	1.01 (0.74 – 1.38)
<b>Número de compañeros sexuales</b>			
1	268 (69.6)	1.00 (---)	
2-3	230 (61.1)	<b>0.80 (0.66 – 0.97)</b>	<b>0.79 (0.64 - 0.98)</b>
>3	56 (60.8)	0.93 (0.69 – 1.27)	0.87 (0.61 – 1.23)
<b>Estado civil</b>			
Soltera	101 (70.1)	1.00 (---)	
Casada	139 (67.4)	1.00 (0.75 – 1.33)	0.95 ( 0.67 –1.35)
Unión libre	271 (61.0)	0.88 (0.69 – 1.14)	0.93 ( 0.67 –1.27)
Separada	37 (60.6)	0.77 (0.52 – 1.15)	0.81 ( 0.52 –1.27)
Viuda	18 (66.6)	1.48 (0.82 – 2.67)	1.51 (0.76 – 3.00)
<b>Raza</b>			
Blanca	115 (75.6)	1.00 (---)	
Indígena	25 (83.3)	<b>1.96 (1.07 –3.59)</b>	<b>2.51 (1.20 – 5.22)</b>
Mestizo	328 (63.40)	0.82 (0.64 – 1.05)	1.14 (0.85 – 1.53)
Negra	100 (54.9)	<b>0.71 (0.53 – 0.95)</b>	0.99 (0.64 – 1.53)
<b>Ciudad</b>			
Engativa	214 (58.3)	1.00 (---)	
Chaparral	50 (61.7)	1.27 (0.92 – 1.76)	1.45 (0.92 – 2.26)
Girardot	146 (88.4)	<b>1.66 (1.29 – 2.15)</b>	<b>1.68 (1.23 –2.29)</b>
Leticia	66 (77.6)	<b>2.08 (1.47 – 2.93)</b>	<b>2.05 (1.33 – 3.16)</b>
Tumaco	105 (52.7)	0.98 (0.79 –1.23)	1.10 (0.74 – 1.63)

<sup>a</sup> Valores con p <0.05 son indicados en negrita

<sup>b</sup> OR ajustado por edad, método anticonceptivo, gestaciones, edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales, estado civil, etnia-raza y región geográfica

**Tabla 9. Factores de riesgo asociados a coinfección por VPH (modificada de (Camargo et al. 2011)).**

## 10. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se encontraron frecuencias de infección y coinfección por VPH mayores a las reportadas en estudios realizados previamente en Colombia (Munoz et al. 2004; Molano et al. 2005; Sierra-Torres et al. 2006; Sierra-Torres et al. 2006). Esta diferencia puede argumentarse en los métodos y técnicas utilizados para obtener los datos de infección por VPH, ya que la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección viral, ha sido reportada como uno de los métodos que brinda mejores valores de sensibilidad comparada con otros empleados con el propósito de detectar ADN viral (Hubbard 2003; Iftner and Villa 2003).

Las frecuencias de infección y coinfección viral podrían haber sido subestimadas en estudios previos debido a la utilización de un único set de primers genéricos. El uso de más de un set de primers se ha recomendado en el diseño de estrategias que tienen como objetivo la identificación de VPH, ya que brindan mayor robustez en la detección del virus y aumentan la sensibilidad en estudios epidemiológicos (Karlsen et al. 1996; Remmerbach et al. 2004). Los dos sistemas de detección viral genérica empleados en el presente trabajo, han sido ampliamente utilizados en numerosos estudios de identificación del VPH y se han reportado como convenientes para la detección tanto de bajas copias virales, como en mujeres que cursan con infección por más de un virus simultáneamente (Qu et al. 1997; Remmerbach et al. 2004).

Adicionalmente, las distintas frecuencias de infección aquí encontradas, pueden deberse a las particularidades genéticas y/o socio-culturales de la población reclutada (Fuessel Haws et al. 2004). De igual manera, prevalencias elevadas de infección por el VPH han sido reportadas en otros estudios llevados a cabo en diferentes regiones alrededor del mundo. En países africanos, como las Comoras, Congo, Djibouti, Eritrea y Etiopía se han reportado porcentajes de infección viral que van del 23.0% al 35.4% (WHO 2007). En algunos países Europeos como Francia e Italia, prevalencias igualmente elevadas de 45.3% y 68.9%, respectivamente, han sido descritas (Pannier-Stockman et al. 2008; Bello et al. 2009), al igual que en algunos países de América Latina (ver Tabla 2).

Una mayor frecuencia de infección y coinfección se encontró en las ciudades de Girardot y Leticia; en estas poblaciones, buena parte de la economía está basada en el turismo,

por lo que estas mujeres pueden estar expuestas a comportamientos sexuales de riesgo que favorecen la adquisición de múltiples infecciones, tanto con VPH, como con otras enfermedades de transmisión sexual (de Sanjose et al. 1996; Leon et al. 2009). Además, la mayoría de la población indígena incluida en el presente trabajo provino de la ciudad de Leticia y este grupo de mujeres mostraron tener un mayor riesgo de presentar coinfección también.

La elevada prevalencia de infección viral reportada, no implica necesariamente un gran porcentaje de hallazgos citológicos anormales (ASC-US, L-SIL y H-SIL) en las mujeres infectadas. Esto se fundamenta en que en este trabajo, la detección viral está determinada por la amplificación del gen que codifica para la proteína de cápside L1, la cual se encuentra en mayor cantidad durante replicación activa del VPH. Se ha demostrado que a medida que el grado de lesión aumenta en severidad, el ADN viral se encuentra principalmente integrado a las células huésped y la transcripción de la proteína L1 se pierde o se encuentra en bajas concentraciones (Choo et al. 1987; Jeon et al. 1995; Depuydt et al. 2007; Rauber et al. 2008).

Con respecto a las prevalencias tipo específicas, el tipo VPH-16 aparece como el más prevalente, siendo detectado en aproximadamente el 50% de los casos, seguido por HPV-18, detectado en el 20% de casos; sin embargo, se ha reportado que la prevalencia de otros tipos de VPH-AR y de VPH-BR puede variar significativamente entre diferentes regiones geográficas, principalmente en mujeres con hallazgo citológico normal (Liu et al. 2004; WHO 2007; Parkin et al. 2008). En este trabajo, la distribución tipo-específica mostró al tipo VPH-16 como el más prevalente en todas las ciudades incluidas en el estudio; la frecuencia de los otros tipos virales fue variable dependiendo de la ciudad evaluada. Las variaciones han sido explicadas gracias al efecto que producen los diferentes genotipos en el sistema inmune del hospedero, a los factores genéticos y a las características medio-ambientales a las cuales se ven enfrentadas las poblaciones (Clifford et al. 2005; Clifford et al. 2006).

Adicionalmente, nuestros resultados mostraron al tipo VPH-31 como el que le sigue en frecuencia de aparición al VPH-16; este tipo viral también ha sido reportado como el segundo más prevalente en Europa y en pacientes que presentan algún tipo de lesión (Clifford et al. 2005; Antonishyn et al. 2008).

Ha sido completamente demostrado que el riesgo de adquirir una posterior infección por VPH se incrementa en mujeres ya infectadas con un tipo de VPH; esto ha sido observado principalmente en infecciones con tipos de alto riesgo, sin que necesariamente estas coinfecciones tengan una estrecha relación filogenética (Molano et al. 2002; Rousseau et al. 2003; Mendez et al. 2005). Estas coinfecciones podrían ser el resultado de la deficiencia del sistema inmunológico al depurarlas, lo que facilita la persistencia del virus en el sitio de la infección (Rousseau et al. 2003). Los tipos VPH-16 y -18 se encontraron asociados con la presencia de casi cualquier otro tipo viral de los detectados en este estudio, lo que concuerda con lo reportado previamente, donde mujeres infectadas con estos dos tipos virales, tienen un mayor riesgo de adquirir otras coinfecciones (Rousseau et al. 2001).

Se encontró que el tipo VPH-31 presenta alta frecuencia de infección y se determinó que tiene co-ocurrencia con el tipo VPH-33. Previamente se había demostrado que a pesar que VPH-33 no es muy frecuente en algunas poblaciones, su incremento en la carga viral se asocia con lesiones de mal pronóstico (HSILs) (Khouadri et al. 2007). Adicionalmente, un estudio previo ha señalado que el significado clínico de VPH-31 ha sido subestimado (Antonishyn et al. 2008), haciendo interesante la asociación aquí encontrada entre VPH-31 y VPH-33, para realizar futuros estudios que permitan evaluar la relevancia clínica de este hallazgo.

En cuanto a las características socioeconómicas descritas en la encuesta, la etnia indígena mostró una alta asociación con la ocurrencia de infecciones múltiples, asociación atribuible a las particularidades culturales de esta etnia, como el inicio temprano de la actividad sexual, un menor acceso a los programas de prevención de enfermedades de transmisión sexual, diferencias de comportamiento asociados a los grupos étnicos (Kenney 1996; Soto-De Leon et al. 2009) y características biológicas intrínsecas, tales como la distribución de alelos de HLA (Cervantes et al. 2003), lo cual no ha sido evaluado en estas poblaciones étnicas, pero puede ser también causante de predisposición de las indígenas a la coinfección viral.

Con respecto a la predisposición del huésped en la infección por VPH, se ha planteado que los polimorfismos en el grupo de alelos de HLA, podrían modular la susceptibilidad genética e influenciar la adquisición de ciertos tipos de VPH (Cervantes et al. 2003), lo

cual hace que diferencias étnicas sean consideradas al evaluar la predisposición a la infección viral y el desarrollo de lesiones cervicales.

El número de parejas sexuales es otro factor de riesgo asociado a infecciones. En los análisis del presente trabajo, el haber declarado en la entrevista tener de 2 a 3 compañeros sexuales durante la vida, resultó ser un factor protector en su asociación con infecciones por VPH. Esta misma asociación fue observada en un estudio realizado entre mujeres hispanas, asiáticas y afro-americanas, en el que se encontró que la relación entre número de compañeros sexuales y la prevalencia de infección por VPH-AR varía según la etnia; estos autores reportaron que las mujeres afroamericanas e hispanas que dijeron tener más compañeros sexuales, mostraron estar menos expuestas a tener una identificación viral positiva (Javanbakht et al. 2010). La justificación podría estar dada sobre la base de competencia entre los virus presentes en un mismo nicho celular.

En la actualidad no ha sido posible esclarecer si la exposición a un mayor número de virus como resultado de la conducta sexual crea una competencia entre ellos de manera positiva o negativa (Mejlhede et al. 2010). Algunos estudios realizados en queratinocitos primarios indican que la coexistencia de distintos tipos de alto riesgo en una misma célula es posible, puesto que la replicación viral puede ser mantenida de forma episomal estable. Las distintas interacciones entre los tipos se llevan a cabo, pero a menudo en detrimento de uno o ambos tipos de virus infectantes, ya que para sus procesos de replicación emplean factores celulares similares, lo que posiblemente conduce al déficit de algunos de estos (McLaughlin-Drubin and Meyers 2004).

Finalmente, otro factor de riesgo que se asoció tanto a infección como a coinfección fue el número de embarazos. Los resultados muestran que las mujeres que reportaron ninguna gestación tenían un mayor riesgo de infección viral, en comparación con las que tuvieron más de cuatro gestaciones. Esta asociación podría explicarse a partir del hecho que las mujeres sin gestaciones son más propensas a involucrarse en prácticas sexuales de riesgo (tener mayor número de compañeros sexuales). Adicionalmente, los anticonceptivos hormonales pueden ser empleados con mayor frecuencia entre las mujeres sin embarazos y este tipo de método anticonceptivo ha sido descrito como un modulador de la infección viral y de la progresión de la enfermedad.

La actividad de los anticonceptivos hormonales en la replicación viral, se debe a que en la región larga de control (LCR), además de los factores de transcripción viral, se unen factores celulares (estimulando o suprimiendo la actividad de genes virales), de los cuales al menos tres han sido caracterizados como elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), siendo uno de estos la progesterona (consumida en forma de anticonceptivo oral), y la cual, al ser reconocida por receptores en LCR, promueve el aumento de la transcripción de los genes *E6* y *E7* (Castellsague et al. 2002; Ghanem et al. 2011)

Para poblaciones de América Latina, algunos estudios se han dirigido a identificar los factores de riesgo, clasificándolos en dos grupos: los denominados a corto plazo y que se asocian con un mayor riesgo de infección por el VPH (como edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales) y los conocidos como a largo plazo, que se asocian con un mayor riesgo de persistencia de la infección del VPH, la cual conlleva al desarrollo de cáncer cervical (como el uso de anticonceptivos orales, el número de gestaciones y el consumo de cigarrillos) (Almonte et al. 2008).

No obstante, aún no están claramente identificados los factores riesgo asociados a la adquisición de infecciones únicas o múltiples. De manera interesante, los resultados obtenidos en este trabajo para infección y coinfección, no muestran diferencias con respecto a sus asociaciones a los diferentes factores de riesgo o protección evaluados, lo que concuerda con análisis reportados previamente en un estudio de cohorte llevado a cabo en Brasil (Rousseau et al. 2003). Lo anterior podría ser atribuible al hecho que todos los tipos de VPH tienen el mismo modo de transmisión (la actividad sexual) y ha sido establecido que las coinfecciones dependen principalmente de la preexistencia de otros tipos virales (Mejlhede et al. 2009).

Una limitante del presente estudio es su diseño, ya que al ser de tipo transversal, no permitió determinar si el tiempo de exposición a más de un tipo de VPH-AR juega un papel importante en la progresión de las lesiones del cuello uterino, o si la infección con alguno de estos tipos predispone y/o aumenta la probabilidad de adquirir otro genotipo viral. Este diseño no permite caracterizar completamente la cronología de estos eventos, ni si una infección ocurre posterior o simultáneamente.

Los resultados del presente trabajo mostraron que la frecuencia de todos los tipos virales identificados varió, no solo entre las ciudades incluidas en el estudio, sino entre los diferentes grupos étnicos analizados. Esto sugiere que dichas frecuencias de infección y coinfección viral están fuertemente influenciadas por aspectos demográficos. Adicionalmente, sería pertinente determinar si la susceptibilidad de un grupo étnico en particular está asociada factores como características genéticas intrínsecas de cada población, aspectos culturales y/o ambientales particulares, que en última instancia modulan la respuesta inmune del huésped.

Como este estudio incluyó mujeres con características socio-culturales y geográficas diversas, comparados con los previamente realizados para Colombia, se obtuvieron datos de prevalencias destacables como la elevada frecuencia de infección con VPH-AR-31, importante ya que éste contribuye a tasas altas de incidencia de CCU (Hindryckx et al. 2006; Antonishyn et al. 2008; Baldez da Silva et al. 2009).

Las diferencias en las prevalencias de los VPH-AR deben ser consideradas en futuros estudios que pretendan seleccionar las vacunas a ser aplicadas en nuestro país. Además, este tipo de estudios epidemiológicos son relevantes para poder anticipar y analizar el impacto que los programas de vacunación puedan tener sobre la población femenina, dado que la actualmente las vacunas disponibles no protegen contra todos los tipos de VPH-AR y la inmunidad cruzada frente a otros tipos de alto riesgo (no incluidos en las preparaciones comerciales) se reduce después de un año de la vacunación (Ault 2007).

## 11. CONCLUSIONES

Las frecuencias de infección y coinfección de VPH halladas en este estudio son mayores que las reportadas previamente para Colombia. Los resultados mostraron que mujeres infectadas con VPH-AR tienen un incremento en la frecuencia de infección con otro tipo viral; esta asociación positiva se observó principalmente para VPH-16 y -31.

La distribución tipo específica para VPH varía según la región geográfica analizada. Se encontró que el tipo VPH-31 es el segundo en prevalencia luego de VPH-16, principalmente en las ciudades de Leticia y Girardot, ciudades que presentan porcentajes elevados de coinfección.

De todos los factores de riesgo analizados, los embarazos, el número de compañeros sexuales, la etnia y la región geográfica mostraron estar asociados significativamente tanto a infecciones únicas como a múltiples.

La etnia indígena incluida en el presente estudio mostró los mayores valores de susceptibilidad a la infección con más de un tipo viral de manera simultánea, al ser comparada con los datos de infección en mujeres blancas.

## **12. RECOMENDACIONES**

Estos hallazgos hacen necesario el diseño de estudios de cohorte que permitan determinar si la exposición a uno o más virus juega un papel importante en la progresión de lesiones cervicales o si la infección por algún tipo viral incrementa la probabilidad de adquirir otro genotipo (relacionado filogenéticamente o no).

Estudios adicionales de tipo longitudinal, permitirían diferenciar entre las infecciones adquiridas simultáneamente o las adquiridas de manera subsecuente, al permitir caracterizar la cronología de los eventos de infección. Se necesita incluir un mayor grupo de mujeres de etnia indígena, con el fin de determinar la posible susceptibilidad de este grupo a la coinfección viral.

### 13. BILIOGRAFÍA

ALMONTE M, ALBERO G, MOLANO M, CARCAMO C, GARCIA PJ and PEREZ G. (2008). *Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean*. Vaccine 26 L16-36.

ANTONISHYN NA, HORSMAN GB, KELLN RA, SAGGAR J and SEVERINI A. (2008). *The impact of the distribution of human papillomavirus types and associated high-risk lesions in a colposcopy population for monitoring vaccine efficacy*. Arch Pathol Lab Med 132: 54-60.

ARBYN M, BERGERON C, KLINKHAMER P, MARTIN-HIRSCH P, SIEBERS AG and BULTEN J. (2008). *Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis*. Obstet Gynecol 111: 167-177.

ARNHEIM N and ERLICH H. (1992). *Polymerase chain reaction strategy*. Annu Rev Biochem 61: 131-156.

AU WW, ABDOU-SALAMA S, SIERRA-TORRES CH and AL-HENDY A. (2007). *Environmental risk factors for prevention and molecular intervention of cervical cancer*. Int J Hyg Environ Health 210: 671-678.

AULT KA. (2007). *Human papillomavirus vaccines and the potential for cross-protection between related HPV types*. Gynecol Oncol 107: S31-33.

BALDEZ DA SILVA MF, CHAGAS BS, GUIMARAES V, KATZ LM, FELIX PM, MIRANDA PM, LIMA AA, ARRAES LC, MARTINS DB, LIMA FILHO JL, STOCCO RC, CROVELLA S, FREITAS AC and BECAK W. (2009). *HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil*. Genet Mol Res 8: 1437-1443.

BALERIOLA C, MILLAR D, MELKI J, COULSTON N, ALTMAN P, RISMANTO N and RAWLINSON W. (2008). *Comparison of a novel HPV test with the Hybrid Capture II (hcII)*

and a reference PCR method shows high specificity and positive predictive value for 13 high-risk human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 42: 22-26.

BAYO S, BOSCH FX, DE SANJOSE S, MUNOZ N, COMBITA AL, COURSAGET P, DIAZ M, DOLO A, VAN DEN BRULE AJ and MEIJER CJ. (2002). *Risk factors of invasive cervical cancer in Mali*. *Int J Epidemiol* 31: 202-209.

BELLO BD, SPINILLO A, ALBERIZZI P, CESARI S, GARDELLA B, D'AMBROSIO G, ROCCIO M and SILINI EM. (2009). *Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: Prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions*. *J Med Virol* 81: 703-712.

BERMUDEZ A. (2005). *Can we do the same in the developing world?* *Gynecol Oncol* 99: S192-196.

BERNARD HU. (2005). *The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses*. *J Clin Virol* 32 Suppl 1: S1-6.

BOLLMANN R, MEHES G, TORKA R, SPEICH N, SCHMITT C and BOLLMANN M. (2003). *Determination of features indicating progression in atypical squamous cells with undetermined significance: human papillomavirus typing and DNA ploidy analysis from liquid-based cytologic samples*. *Cancer* 99: 113-117.

BONTKES HJ, VAN DUIN M, DE GRUIJL TD, DUGGAN-KEEN MF, WALBOOMERS JM, STUKART MJ, VERHEIJEN RH, HELMERHORST TJ, MEIJER CJ, SCHEPER RJ, STEVENS FR, DYER PA, SINNOTT P and STERN PL. (1998). *HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants*. *Int J Cancer* 78: 166-171.

BORDEAUX J, FORTE S, HARDING E, DARSHAN MS, KLUCEVSEK K and MOROIANU J. (2006). *The I2 minor capsid protein of low-risk human papillomavirus type 11 interacts with host nuclear import receptors and viral DNA*. *J Virol* 80: 8259-8262.

BOTEZATU A, SOCOLOV D, GOIA CD, IANCU IV, UNGUREANU C, HUICA I and ANTON G. (2009). *The relationship between HPV16 and HPV18 viral load and cervical lesions progression*. Roum Arch Microbiol Immunol 68: 175-182.

BOULET GA, BENOY IH, DEPUYDT CE, HORVATH CA, AERTS M, HENS N, VEREECKEN AJ and BOGERS JJ. (2009). *Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia  $\geq 2$  in a liquid-based cytology setting?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18: 2992-2999.

BURCHELL AN, WINER RL, DE SANJOSE S and FRANCO EL. (2006). *Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. Vaccine 24 Suppl 3: S3/52-61.

BURD EM. (2003). *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clin Microbiol Rev 16: 1-17.

CAMARGO M, SOTO-DE LEON SC, SANCHEZ R, MUNOZ M, BELTRAN M, VEGA E, PEREZ-PRADOS A, PATARROYO ME and PATARROYO MA. (2011). *Detection by PCR of Human Papillomavirus in Colombia: comparison of GP5+/6+ AND MY09/11 primer sets*. Submitted J Virol Methods.

CAMARGO M, SOTO-DE LEON SC, SANCHEZ R, PEREZ-PRADOS A, PATARROYO ME and PATARROYO MA. (2011). *Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia*. Ann Epidemiol 21: 204-213.

CARTER JJ, KOUTSKY LA, HUGHES JP, LEE SK, KUYPERS J, KIVIAT N and GALLOWAY DA. (2000). *Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection*. J Infect Dis 181: 1911-1919.

CASTELLSAGUE X, BOSCH FX and MUNOZ N. (2002). *Environmental co-factors in HPV carcinogenesis*. Virus Res 89: 191-199.

CASTLE PE, PORRAS C, QUINT WG, RODRIGUEZ AC, SCHIFFMAN M, GRAVITT PE, GONZALEZ P, KATKI HA, SILVA S, FREER E, VAN DOORN LJ, JIMENEZ S, HERRERO R and HILDESHEIM A. (2008). *Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods*. J Clin Microbiol 46: 3437-3445.

CERVANTES J, LEMA C, VALENTINA HURTADO L, ANDRADE R, HURTADO GOMEZ L, TORRICO L, ZEGARRA L, QUIROGA G, ASTURIZAGA D, DULON A, PRADA R, PANOSO W, YASHIKI S, FUJIYOSHI T and SONODA S. (2003). *HLA-DRB1\*1602 allele is positively associated with HPV cervical infection in Bolivian Andean women*. Hum Immunol 64: 890-895.

CIOMS and OMS. (1991). *International guidelines for ethical review of epidemiological studies*. Law Med Health Care 19: 247-258.

CLIFFORD G, FRANCESCHI S, DIAZ M, MUNOZ N and VILLA LL. (2006). *Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases*. Vaccine 24 Suppl 3: S26-34.

CLIFFORD GM, GALLUS S, HERRERO R, MUNOZ N, SNIJDERS PJ, VACCARELLA S, ANH PT, FERRECCIO C, HIEU NT, MATOS E, MOLANO M, RAJKUMAR R, RONCO G, DE SANJOSE S, SHIN HR, SUKVIRACH S, THOMAS JO, TUNSAKUL S, MEIJER CJ and FRANCESCHI S. (2005). *Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis*. Lancet 366: 991-998.

CLIFFORD GM, SMITH JS, PLUMMER M, MUNOZ N and FRANCESCHI S. (2003). *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis*. Br J Cancer 88: 63-73.

COGLIANO V, BAAN R, STRAIF K, GROSSE Y, SECRETAN B and EL GHISSASSI F. (2005). *Carcinogenicity of human papillomaviruses*. Lancet Oncol 6: 204.

CORTES-GUTIERREZ EI, CERDA-FLORES RM, LEAL-KLEVEZAS DS, HERNANDEZ-GARZA F and LEAL-GARZA CH. (2003). *Validating polymerase chain reaction for detecting HPV in cervical intraepithelial neoplasia*. *Anal Quant Cytol Histol* 25: 115-118.

COUTLEE F, GRAVITT P, KORNEGAY J, HANKINS C, RICHARDSON H, LAPOINTE N, VOYER H and FRANCO E. (2002). *Use of PGMV primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples*. *J Clin Microbiol* 40: 902-907.

COUTLEE F, MAYRAND MH, ROGER M and FRANCO EL. (2009). *Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids*. *Public Health Genomics* 12: 308-318.

COUTLEE F, ROULEAU D, FERENCZY A and FRANCO E. (2005). *The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 16: 83-91.

CUZICK J, ARBYN M, SANKARANARAYANAN R, TSU V, RONCO G, MAYRAND MH, DILLNER J and MEIJER CJ. (2008). *Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries*. *Vaccine* 26 Suppl 10: K29-41.

CHAIWONGKOT A, PIENTONG C, EKALAKSANANAN T, KONGYINGYONES B, THINKHAMROP J, YUENYAO P and SRIAMPORN S. (2007). *Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells*. *Asian Pac J Cancer Prev* 8: 279-282.

CHEUNG JL, CHEUNG TH, NG CW, YU MY, WONG MC, SIU SS, YIM SF and CHAN PK. (2009). *Analysis of human papillomavirus type 18 load and integration status from low-grade cervical lesion to invasive cervical cancer*. *J Clin Microbiol* 47: 287-293.

CHOO KB, PAN CC and HAN SH. (1987). *Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable*

*retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. Virology 161: 259-261.*

CHRISTENSEN ND (2002). Papillomaviruses. Pennsylvania State University, Hershey, Pennsylvania, USA.

CHRISTENSEN ND, CLADEL NM, REED CA, BUDGEON LR, EMBERS ME, SKULSKY DM, MCCLEMENTS WL, LUDMERER SW and JANSEN KU. (2001). *Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. Virology 291: 324-334.*

CHRISTENSEN ND, DILLNER J, EKLUND C, CARTER JJ, WIPF GC, REED CA, CLADEL NM and GALLOWAY DA. (1996). *Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. Virology 223: 174-184.*

DALSTEIN V, MERLIN S, BALI C, SAUNIER M, DACHEZ R and RONSIN C. (2009). *Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. J Virol Methods 156: 77-83.*

DE RODA HUSMAN AM, WALBOOMERS JM, VAN DEN BRULE AJ, MEIJER CJ and SNIJDERS PJ. (1995). *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J Gen Virol 76 ( Pt 4): 1057-1062.*

DE SANJOSE S, BOSCH FX, MUNOZ N, TAFUR L, GILI M, IZARZUGAZA I, IZQUIERDO A, NAVARRO C, VERGARA A, MUNOZ MT, ASCUNCE N and SHAH KV. (1996). *Socioeconomic differences in cervical cancer: two case-control studies in Colombia and Spain. Am J Public Health 86: 1532-1538.*

DE VILLIERS EM. (2003). *Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. Int J Cancer 103: 705-708.*

DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU and ZUR HAUSEN H. (2004). *Classification of papillomaviruses*. *Virology* 324: 17-27.

DEPUYDT CE, BOULET GA, HORVATH CA, BENOY IH, VEREECKEN AJ and BOGERS JJ. (2007). *Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types*. *J Cell Mol Med* 11: 881-891.

DIXON EP, PAHEL GL, ROCQUE WJ, BARNES JA, LOBE DC, HANLON MH, ALEXANDER KA, CHAO SF, LINDLEY K and PHELPS WC. (2000). *The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity*. *Virology* 270: 345-357.

DOORBAR J. (2005). *The papillomavirus life cycle*. *J Clin Virol* 32 Suppl 1: S7-15.

DUENSING S, LEE LY, DUENSING A, BASILE J, PIBOONNIYOM S, GONZALEZ S, CRUM CP and MUNGER K. (2000). *The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10002-10007.

FERENCZY A and FRANCO E. (2002). *Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia*. *Lancet Oncol* 3: 11-16.

FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C and PARKIN DM. (2010). *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. *Int J Cancer* 127: 2893-2917.

FERRERA A, VELEMA JP, FIGUEROA M, BULNES R, TORO LA, CLAROS JM, DE BARAHONA O and MELCHERS WJ. (2000). *Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras*. *Int J Epidemiol* 29: 817-825.

FUESSEL HAWS AL, HE Q, RADY PL, ZHANG L, GRADY J, HUGHES TK, STISSER K, KONIG R and TYRING SK. (2004). *Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples.* J Virol Methods 122: 87-93.

GANGULY N and PARIHAR SP. (2009). *Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis.* J Biosci 34: 113-123.

GHANEM KG, DATTA SD, UNGER ER, HAGENSEE M, SHLAY JC, KERNDT P, HSU K and KOUTSKY LA. (2011). *The association of current hormonal contraceptive use with type-specific HPV detection.* Sex Transm Infect 87: 385-388.

GLOBOCAN. (2008). *GLOBOCAN (IARC) Section of Cancer Information. Information.* Available at: <http://globocan.iarc.fr> (Date accessed February 1st 2010).

GRAVITT PE, KOVACIC MB, HERRERO R, SCHIFFMAN M, BRATTI C, HILDESHEIM A, MORALES J, ALFARO M, SHERMAN ME, WACHOLDER S, RODRIGUEZ AC and BURK RD. (2007). *High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease.* Int J Cancer 121: 2787-2793.

GRAVITT PE, SCHIFFMAN M, SOLOMON D, WHEELER CM and CASTLE PE. (2008). *A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17: 1248-1254.

GUO M, SNEIGE N, SILVA EG, JAN YJ, COGDELL DE, LIN E, LUTHRA R and ZHANG W. (2007). *Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma.* Mod Pathol 20: 256-266.

HARTIKAINEN J. (2001). *The Papanicolaou test: its utility and efficacy in cancer detection.* Contemp Nurse 11: 45-49.

HERRERO R, HILDESHEIM A, RODRIGUEZ AC, WACHOLDER S, BRATTI C, SOLOMON D, GONZALEZ P, PORRAS C, JIMENEZ S, GUILLEN D, MORALES J, ALFARO M, CYR J, MORRISEY K, ESTRADA Y, CORTES B, MORERA LA, FREER E, SCHUSSLER J, SCHILLER J, LOWY D and SCHIFFMAN M. (2008). *Rationale and design of a community-based double-blind randomized clinical trial of an HPV 16 and 18 vaccine in Guanacaste, Costa Rica*. *Vaccine* 26: 4795-4808.

HINDRYCKX P, GARCIA A, CLAEYS P, GONZALEZ C, VELASQUEZ R, BOGERS J, VAN RENTERGHEM L and CUVELIER CA. (2006). *Prevalence of high risk human papillomavirus types among Nicaraguan women with histological proved pre-neoplastic and neoplastic lesions of the cervix*. *Sex Transm Infect* 82: 334-336.

HO L, CHAN SY, BURK RD, DAS BC, FUJINAGA K, ICENOGLE JP, KAHN T, KIVIAT N, LANCASTER W, MAVROMARA-NAZOS P and ET AL. (1993). *The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations*. *J Virol* 67: 6413-6423.

HO L, TAY SK, CHAN SY and BERNARD HU. (1993). *Sequence variants of human papillomavirus type 16 from couples suggest sexual transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasia*. *J Infect Dis* 168: 803-809.

HUBBARD RA. (2003). *Human papillomavirus testing methods*. *Arch Pathol Lab Med* 127: 940-945.

HUDELIST G, MANAVI M, PISCHINGER KI, WATKINS-RIEDEL T, SINGER CF, KUBISTA E and CZERWENKA KF. (2004). *Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade*. *Gynecol Oncol* 92: 873-880.

HUGHES FJ and ROMANOS MA. (1993). *E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase*. *Nucleic Acids Res* 21: 5817-5823.

HUIBREGTSE JM, SCHEFFNER M and HOWLEY PM. (1993). *Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53*. Mol Cell Biol 13: 775-784.

HUSNJAK K, GRCE M, MAGDIC L and PAVELIC K. (2000). *Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens*. J Virol Methods 88: 125-134.

IFTNER T and VILLA LL. (2003). *Chapter 12: Human papillomavirus technologies*. J Natl Cancer Inst Monogr: 80-88.

IKENBERG H, GISSMANN L, GROSS G, GRUSSENDORF-CONEN EI and ZUR HAUSEN H. (1983). *Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis*. Int J Cancer 32: 563-565.

ILLADES-AGUIAR B, ALARCON-ROMERO LDEL C, ANTONIO-VEJAR V, ZAMUDIO-LOPEZ N, SALES-LINARES N, FLORES-ALFARO E, FERNANDEZ-TILAPA G, VENCES-VELAZQUEZ A, MUNOZ-VALLE JF and LEYVA-VAZQUEZ MA. (2010). *Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico*. Gynecol Oncol 117: 291-296.

ILLADES-AGUIAR B, CORTES-MALAGON EM, ANTONIO-VEJAR V, ZAMUDIO-LOPEZ N, ALARCON-ROMERO LDEL C, FERNANDEZ-TILAPA G, HERNANDEZ-SOTELO D, TERAN-PORCAYO MA, FLORES-ALFARO E and LEYVA-VAZQUEZ MA. (2009). *Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors*. Cancer Detect Prev 32: 300-307.

JACOBS MV, WALBOOMERS JM, SNIJDERS PJ, VOORHORST FJ, VERHEIJEN RH, FRANSEN-DAALMEIJER N and MEIJER CJ. (2000). *Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types*. Int J Cancer 87: 221-227.

JAGU S, KARANAM B, GAMBHIRA R, CHIVUKULA SV, CHAGANTI RJ, LOWY DR, SCHILLER JT and RODEN RB. (2009). *Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines*. J Natl Cancer Inst 101: 782-792.

JAVANBAKHT M, GORBACH PM, AMANI B, WALKER S, CRANSTON RD, DATTA SD and KERNDT PR. (2010). *Concurrency, sex partner risk, and high-risk human papillomavirus infection among African American, Asian, and Hispanic women*. Sex Transm Dis 37: 68-74.

JEON S, ALLEN-HOFFMANN BL and LAMBERT PF. (1995). *Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells*. J Virol 69: 2989-2997.

JOSEFSSON AM, MAGNUSSON PK, YLITALO N, SORENSEN P, QWARFORTH-TUBBIN P, ANDERSEN PK, MELBYE M, ADAMI HO and GYLLENSTEN UB. (2000). *Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study*. Lancet 355: 2189-2193.

JUNES-GILL K, SICHERO L, MACIAG PC, MELLO W, NORONHA V and VILLA LL. (2008). *Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil*. J Med Virol 80: 1639-1645.

KALANTARI M, BLENNOW E, HAGMAR B and JOHANSSON B. (2001). *Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas*. Diagn Mol Pathol 10: 46-54.

KAMPER N, DAY PM, NOWAK T, SELINKA HC, FLORIN L, BOLSCHER J, HILBIG L, SCHILLER JT and SAPP M. (2006). *A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes*. J Virol 80: 759-768.

KARLSEN F, KALANTARI M, JENKINS A, PETTERSEN E, KRISTENSEN G, HOLM R, JOHANSSON B and HAGMAR B. (1996). *Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus*. J Clin Microbiol 34: 2095-2100.

KAWANA Y, KAWANA K, YOSHIKAWA H, TAKETANI Y, YOSHIIKE K and KANDA T. (2001). *Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm*. J Virol 75: 2331-2336.

KENNEY JW. (1996). *Ethnic differences in risk factors associated with genital human papillomavirus infections*. J Adv Nurs 23: 1221-1227.

KHOUADRI S, VILLA LL, GAGNON S, KOUSHIK A, RICHARDSON H, MATLASHEWSKI G, ROGER M, FERENCZY AS, FRANCO EL and COUTLEE F. (2007). *Viral load of episomal and integrated forms of human papillomavirus type 33 in high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix*. Int J Cancer 121: 2674-2681.

KJELLBERG L, HALLMANS G, AHREN AM, JOHANSSON R, BERGMAN F, WADELL G, ANGSTROM T and DILLNER J. (2000). *Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection*. Br J Cancer 82: 1332-1338.

KLAES R, WOERNER SM, RIDDER R, WENTZENSEN N, DUERST M, SCHNEIDER A, LOTZ B, MELSHEIMER P and VON KNEBEL DOEBERITZ M. (1999). *Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes*. Cancer Res 59: 6132-6136.

KLUMPP DJ and LAIMINS LA. (1999). *Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1*. Virology 257: 239-246.

KNIFE D, LAMB R, HOWLEY P, GRIFFIN D and MARTIN M (2006). Chapter 62: Papillomaviruses, Section II: Specific Virus Families. Fields Virology. Philadelphia, United States, Lippincott Williams & Wilkins: 3091.

KORNEGAY JR, ROGER M, DAVIES PO, SHEPARD AP, GUERRERO NA, LLOVERAS B, EVANS D and COUTLEE F. (2003). *International proficiency study of a consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement.* J Clin Microbiol 41: 1080-1086.

KREADER CA. (1996). *Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein.* Appl Environ Microbiol 62: 1102-1106.

LACRUZ C. (2003). *Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolaou a Bethesda 2001).* Rev Esp Patol 36: 5-10.

LEE YM, LEU SY, CHIANG H, FUNG CP and LIU WT. (2001). *Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer.* J Microbiol Immunol Infect 34: 87-91.

LEMA CH, HURTADO LV, SEGURONDO D, ROMERO F, DULON A, ASTURIZAGA D, PANOSO W, GARCIA G, FUJIYOSHI T, YASHIKI S, LI HC, LOU H, CERVANTES J, GOMEZ LH and SONODA S. (2001). *Human Papillomavirus Infection among Bolivian Amazonian Women.* Asian Pac J Cancer Prev 2: 135-141.

LEON S, SANCHEZ R, PATARROYO MA, CAMARGO M, MEJIA A, URQUIZA M and PATARROYO ME. (2009). *Prevalence of HPV-DNA and anti-HPV antibodies in women from Girardot, Colombia.* Sex Transm Dis 36: 290-296.

LIAW KL, HILDESHEIM A, BURK RD, GRAVITT P, WACHOLDER S, MANOS MM, SCOTT DR, SHERMAN ME, KURMAN RJ, GLASS AG, ANDERSON SM and SCHIFFMAN M. (2001). *A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types.* J Infect Dis 183: 8-15.

LIU J, ROSE B, HUANG X, LIAO G, CARTER J, WU X and THOMPSON C. (2004). *Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in high- versus low-incidence regions*. Gynecol Oncol 94: 803-810.

LONGWORTH MS and LAIMINS LA. (2004). *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev 68: 362-372.

LOPÉZ A and LIZANO M. (2006). *Cancer de cuello uterino y el virus de papiloma humano: la historia que no termina*. 31-55.

LORINCZ AT. (1996). *Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening*. J Obstet Gynaecol Res 22: 629-636.

LOWE J, PANDA D, ROSE S, JENSEN T, HUGHES WA, TSO FY and ANGELETTI PC. (2008). *Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1*. Virol J 5: 150.

MAGNUSSON PK and GYLLENSTEN UB. (2000). *Cervical cancer risk: is there a genetic component?* Mol Med Today 6: 145-148.

MANOS MM, TING Y, WRIGHT DK, LEWIS AJ, BROKER TR and WOLINSKY SM. (1989). *The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses* Cancer Cells 7: 209-214.

MCBRIDE A, ROMANCZUK H and HOWLEY P. (1991). *The papillomavirus E2 regulatory proteins*. J Biol Chem 266: 18411-18414.

MCLAUGHLIN-DRUBIN ME and MEYERS C. (2004). *Evidence for the coexistence of two genital HPV types within the same host cell in vitro*. Virology 321: 173-180.

MCMURRAY HR, NGUYEN D, WESTBROOK TF and MCANCE DJ. (2001). *Biology of human papillomaviruses*. Int J Exp Pathol 82: 15-33.

MEJLHEDE N, BONDE J and FOMSGAARD A. (2009). *High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women*. APMIS 117: 108-114.

MEJLHEDE N, PEDERSEN BV, FRISCH M and FOMSGAARD A. (2010). *Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy?* APMIS 118: 346-352.

MENDEZ F, MUNOZ N, POSSO H, MOLANO M, MORENO V, VAN DEN BRULE AJ, RONDEROS M, MEIJER C and MUNOZ A. (2005). *Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines*. J Infect Dis 192: 1158-1165.

MO LZ, MONNIER-BENOIT S, KANTELIP B, PETITJEAN A, RIETHMULLER D, PRETET JL and MOUGIN C. (2008). *Comparison of AMPLICOR and Hybrid Capture II assays for high risk HPV detection in normal and abnormal liquid-based cytology: use of INNO-LiPA Genotyping assay to screen the discordant results*. J Clin Virol 41: 104-110.

MOBERG M, GUSTAVSSON I and GYLLENSTEN U. (2003). *Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer*. J Clin Microbiol 41: 3221-3228.

MOBERG M, GUSTAVSSON I, WILANDER E and GYLLENSTEN U. (2005). *High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma*. Br J Cancer 92: 891-894.

MOLANO M, POSSO H, MENDEZ F, MURILLO R, VAN DEN BRULE A, RONDEROS M, MUNOZ A, MEIJER C and MUNOZ N. (2005). *Historia Natural de la infección por el virus de papiloma Humano en una cohorte de Bogotá, D.C., Colombia*. Revista Colombiana de Cancerología 9: 209-226.

MOLANO M, POSSO H, WEIDERPASS E, VAN DEN BRULE AJ, RONDEROS M, FRANCESCHI S, MEIJER CJ, ARSLAN A and MUNOZ N. (2002). *Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology*. Br J Cancer 87: 324-333.

MOLIJN A, KLETER B, QUINT W and VAN DOORN LJ. (2005). *Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections*. J Clin Virol 32 Suppl 1: S43-51.

MOROIANU J. (1997). *Molecular mechanisms of nuclear protein transport*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 7: 61-72.

MOSCICKI AB, SCHIFFMAN M, KJAER S and VILLA LL. (2006). *Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer*. Vaccine 24 Suppl 3: S42-51.

MUNGER K, BALDWIN A, EDWARDS KM, HAYAKAWA H, NGUYEN CL, OWENS M, GRACE M and HUH K. (2004). *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. J Virol 78: 11451-11460.

MUNGER K, BASILE JR, DUENSING S, EICHTEN A, GONZALEZ SL, GRACE M and ZACNY VL. (2001). *Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein*. Oncogene 20: 7888-7898.

MUNOZ N, CASTELLSAGUE X, DE GONZALEZ AB and GISSMANN L. (2006). *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine 24S3: S1-S10.

MUNOZ N, MENDEZ F, POSSO H, MOLANO M, VAN DEN BRULE AJ, RONDEROS M, MEIJER C and MUNOZ A. (2004). *Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results*. J Infect Dis 190: 2077-2087.

NELSON JH, HAWKINS GA, EDLUND K, EVANDER M, KJELLBERG L, WADELL G, DILLNER J, GERASIMOVA T, COKER AL, PIRISI L, PETEREIT D and LAMBERT PF. (2000). *A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples*. J Clin Microbiol 38: 688-695.

NUNEZ-TROCONIS J, DELGADO M, GONZALEZ J, MINDIOLA R, VELASQUEZ J, CONDE B, WHITBY D and MUNROE DJ. (2009). *Prevalence and risk factors of human*

*papillomavirus infection in asymptomatic women in a Venezuelan urban area. Invest Clin* 50: 203-212.

OCHOA FL and MONTOYA LP. (2003). *Mortalidad por Cáncer en Colombia en el año 2000: Cuando aumentar no es mejorar. Revista CES MEDICINA* 17: 7-22.

OJEDA J, MUÑOZ R, PARDO M, GUEVARA M and HERNANDEZ T. (2008). *Comparacion de la toma de citología cervical con calidad satisfactoria con el método Cervex-brush o Cervex-mex Ginecol Obstet Mex* 76: 381-385.

OLMOS M, ACOSTA J, PRECIADO S, ARIAS S, BALLESTEROS M, CASTILLO J, CHICAIZA L, DÍAZ J, GAMBOA O, GARCIA M, GÓMEZ A, GONZÁLEZ M, HERNÁNDEZ G, HERNÁNDEZ G, LUNA J, MOLANO M, MURILLO R, ORTIZ N, PIÑEROS M, SÁNCHEZ R, TOVAR S, TRUJILLO L, VENEGAS M and WIESNER C (2007). *Recomendaciones para la tamización de neoplasias del cuello uterino en mujeres sin antecedentes de patología cervical (preinvasora o invasora) en Colombia. Bogota D.C., Colombia, Instituto Nacional de Cancerología (INS):* 64.

ORJUELA K, AMADOR C and PATARROYO MA. (2007). *Synthetic genes: a tool for identifying human papillomavirus genotypes by hybridization and polymerase chain reaction-based assays. Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 101-104.

PANNIER-STOCKMAN C, SEGARD C, BENNAMAR S, GONDRY J, BOULANGER JC, SEVESTRE H, CASTELAIN S and DUVERLIE G. (2008). *Prevalence of HPV genotypes determined by PCR and DNA sequencing in cervical specimens from French women with or without abnormalities. J Clin Virol* 42: 353-360.

PARDO C, MURILLO R, PIÑEROS M and CASTRO MA. (2003). *New Cancer Cases at the Instituto Nacional de Cancerología, Colombia, 2002. Revista Colombiana de Cancerología* 7: 4-19.

PARKIN DM, ALMONTE M, BRUNI L, CLIFFORD G, CURADO MP and PINEROS M. (2008). *Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region*. Vaccine 26 Suppl 11: L1-15.

PISTA A, OLIVEIRA A, BARATEIRO A, COSTA H, VERDASCA N and PAIXAO MT. (2007). *Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal*. J Med Virol 79: 1889-1897.

POLJAK M, BRENCIC A, SEME K, VINCE A and MARIN IJ. (1999). *Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer*. J Clin Microbiol 37: 796-797.

QU W, JIANG G, CRUZ Y, CHANG CJ, HO GY, KLEIN RS and BURK RD. (1997). *PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems*. J Clin Microbiol 35: 1304-1310.

QUINT KD, DE KONING MN, VAN DOORN LJ, QUINT WG and PIROG EC. (2010). *HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix*. Gynecol Oncol 117: 297-301.

RAMANAKUMAR AV, GONCALVES O, RICHARDSON H, TELLIER P, FERENCZY A, COUTLEE F and FRANCO EL. (2010). *Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women*. BMC Infect Dis 10: 326.

RAUBER D, MEHLHORN G, FASCHING PA, BECKMANN MW and ACKERMANN S. (2008). *Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 140: 258-262.

REMMERBACH TW, BRINCKMANN UG, HEMPRICH A, CHEKOL M, KUHNDEL K and LIEBERT UG. (2004). *PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets.* J Clin Virol 30: 302-308.

ROUSSEAU MC, ABRAHAMOWICZ M, VILLA LL, COSTA MC, ROHAN TE and FRANCO EL. (2003). *Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 12: 1029-1037.

ROUSSEAU MC, PEREIRA JS, PRADO JC, VILLA LL, ROHAN TE and FRANCO EL. (2001). *Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection.* J Infect Dis 184: 1508-1517.

SAFAEIAN M, HERRERO R, HILDESHEIM A, QUINT W, FREER E, VAN DOORN LJ, PORRAS C, SILVA S, GONZALEZ P, BRATTI MC, RODRIGUEZ AC and CASTLE P. (2007). *Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 Assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5,683 young women in Guanacaste, Costa Rica.* J Clin Microbiol 45: 1447-1454.

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA and ARNHEIM N. (1985). *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science 230: 1350-1354.

SANTOS C, MUNOZ N, KLUG S, ALMONTE M, GUERRERO I, ALVAREZ M, VELARDE C, GALDOS O, CASTILLO M, WALBOOMERS J, MEIJER C and CACERES E. (2001). *HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru.* Br J Cancer 85: 966-971.

SHAFTI-KERAMAT S, HANDISURYA A, KRIEHLER E, MENEGUZZI G, SLUPETZKY K and KIRNBAUER R. (2003). *Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses.* J Virol 77: 13125-13135.

SIERRA-TORRES CH, ACOSTA-ARAGÓN MP and OREJUELA-ARISTIZABAL L. (2006). *Papillomavirus and factors associated with high-risk, cervical intra-epithelial neoplasia in Cauca, Colombia.* Revista de Salud Pública 8.

SIERRA-TORRES CH, ARBOLEDA-MORENO YY and OREJUELA-ARISTIZABAL L. (2006). *Exposure to wood smoke, HPV infection, and genetic susceptibility for cervical neoplasia among women in Colombia*. Environ Mol Mutagen 47: 553-561.

SLUPETZKY K, SHAFTI-KERAMAT S, LENZ P, BRANDT S, GRASSAUER A, SARA M and KIRNBAUER R. (2001). *Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops*. J Gen Virol 82: 2799-2804.

SMITH JL, CAMPOS SK, WANDINGER-NESS A and OZBUN MA. (2008). *Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating*. J Virol 82: 9505-9512.

SOLOMON D, DAVEY D, KURMAN R, MORIARTY A, O'CONNOR D, PREY M, RAAB S, SHERMAN M, WILBUR D, WRIGHT T, JR. and YOUNG N. (2002). *The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology*. JAMA 287: 2114-2119.

SOTLAR K, DIEMER D, DETHLEFFS A, HACK Y, STUBNER A, VOLLMER N, MENTON S, MENTON M, DIETZ K, WALLWIENER D, KANDOLF R and BULTMANN B. (2004). *Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR*. J Clin Microbiol 42: 3176-3184.

SOTO-DE LEON SC, CAMARGO M, SANCHEZ R, LEON S, URQUIZA M, ACOSTA J, MONSALVE D, RODRIGUEZ LE, PATARROYO ME and PATARROYO MA. (2009). *Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia*. Clin Microbiol Infect 15: 100-102.

STOPPLER MC, CHING K, STOPPLER H, CLANCY K, SCHLEGEL R and ICENOGLE J. (1996). *Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation*. J Virol 70: 6987-6993.

SWINDLE CS and ENGLER JA. (1998). *Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1*. J Virol 72: 1994-2001.

TABORA N, BAKKERS JM, QUINT WG, MASSUGER LF, MATUTE JA, MELCHERS WJ and FERRERA A. (2009). *Human papillomavirus infection in Honduran women with normal cytology*. *Cancer Causes Control* 20: 1663-1670.

THOMAS KK, HUGHES JP, KUYPERS JM, KIVIAT NB, LEE SK, ADAM DE and KOUTSKY LA. (2000). *Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types*. *J Infect Dis* 182: 1097-1102.

THOMPSON DA, BELINSKY G, CHANG TH, JONES DL, SCHLEGEL R and MUNGER K. (1997). *The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints*. *Oncogene* 15: 3025-3035.

TORNESELLO ML, LOSITO S, BENINCASA G, FULCINITI F, BOTTI G, GREGGI S, BUONAGURO L and BUONAGURO FM. (2011). *Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix*. *Gynecol Oncol* 121: 32-42.

URIBE C, DÍAZ L, ORTIZ R and MEZA E. (2006). *Pap Smear Prevalence and that of Pre-Malignant and Malignant Cervical Lesions Amongst Women Living in the Carmen Initiative Demonstration Area, Bucaramanga, Colombia*. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57: 10-18.

URQUIZA M, GUEVARA T, ESPEJO F, BRAVO MM, RIVERA Z and PATARROYO ME. (2005). *Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions*. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 224-232.

VILLA L. (2006). *CHAPTER 1 Biology of genital human papillomaviruses*. *Int J Gynaecol Obstet* 94: S3-S7.

WALBOOMERS JM, JACOBS MV, MANOS MM, BOSCH FX, KUMMER JA, SHAH KV, SNIJDERS PJ, PETO J, MEIJER CJ and MUNOZ N. (1999). *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. *J Pathol* 189: 12-19.

WANG SS and HILDESHEIM A. (2003). *Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression*. J Natl Cancer Inst Monogr: 35-40.

WHITTAKER GR. (2003). *Virus nuclear import*. Adv Drug Deliv Rev 55: 733-747.

WHO. (2007). *HPV and cervical cancer in the 2007 report*. Vaccine 25 Suppl 3: C1-230.

WIESNER-CEBALLOS C, VEJARANO-VELANDIA M, CAICEDO-MERA JC, TOVAR-MURILLO SL and CENDALES-DUARTE R. (2006). *La citología de cuello uterino en Soacha, Colombia: representaciones sociales, barreras y motivaciones*. Revista de Salud Pública 8: 185-196.

WOODMAN CB, COLLINS SI and YOUNG LS. (2007). *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer 7: 11-22.

XI LF, KIVIAT NB, HILDESHEIM A, GALLOWAY DA, WHEELER CM, HO J and KOUTSKY LA. (2006). *Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence*. J Natl Cancer Inst 98: 1045-1052.

XI LF, KOUTSKY LA, GALLOWAY DA, KUYPERS J, HUGHES JP, WHEELER CM, HOLMES KK and KIVIAT NB. (1997). *Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia*. J Natl Cancer Inst 89: 796-802.

YOSHIOKA N, INOUE H, NAKANISHI K, OKA K, YUTSUDO M, YAMASHITA A, HAKURA A and NOJIMA H. (2000). *Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras*. J Virol 74: 1008-1013.

ZUR HAUSEN H. (1976). *Biochemical approaches to detection of Epstein-Barr virus in human tumors*. Cancer Res 36: 678-680.

ZUR HAUSEN H. (2002). *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer 2: 342-350.

## 14. ANEXOS

### Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO Y CUESTIONARIO PARA MUJERES QUE ACEPTEN PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Participante N°

 <b>FIDIC</b>	<p>PROYECTO "COMPARACION DE LA PRUEBA SEROLOGICA DE ELISA DE ANTICUERPOS ANTI-VPH CON LA CITOLOGIA Y CON LA DETECCION DEL ADN VIRAL, AL SER UTILIZADAS COMO PRUEBAS DE TAMIZACION PARA LA DETECCION DE INFECCION PERSISTENTE POR EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO"</p> <p><b>FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA</b></p>
---	--

Solo ingresará al estudio previo a la firma de este consentimiento informado. Se le recuerda que su participación es totalmente voluntaria.

El virus de papiloma humano o VPH causa el **cáncer de útero**.

Es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres del mundo y el primero en países en vías de desarrollo como el nuestro.

Su participación en este estudio es una generosa contribución al desarrollo de la ciencia y a la mejoría de la salud de nuestros semejantes, así como su propio beneficio.

#### Procedimientos a seguir

**Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, previa evaluación médica, se le solicitará la donación de una (1) muestra de sangre de 5 cc y una (1) muestra citológica cervicovaginal para análisis de ADN viral que se tomara en el momento de realizar la colposcopia.**

#### Período de participación

**Tiempo necesario para la toma de la muestra de sangre (Aproximadamente 5 minutos).**

#### Riesgos

Este estudio se considera de bajo riesgo. El volumen de sangre por individuo es mínimo (5cc). Se puede tener algo de dolor o enrojecimiento en el área de la veno-punción y en raras ocasiones se presenta sensación de mareo de la que se recupera espontáneamente. La toma de la muestra cervical no presenta molestias adicionales a la colposcopia.

#### Beneficios

Usted recibirá a través de su servicio de salud, el resultado de laboratorio de la seropositividad o no para el **Virus del Papiloma Humano**. Esto ayudará a su médico tratante para la toma de decisión en su caso particular. Además significa un nuevo conocimiento acerca de los mecanismos de defensa del ser humano contra la infección por **Virus del Papiloma Humano** y hace parte del proceso de evaluación de la prueba que podría, en el futuro, ser la base para el desarrollo de métodos de diagnóstico más precisos y posibles vacunas.

#### Confidencialidad

Su nombre no será usado en ningún informe de este estudio.

#### Hallazgos nuevos de importancia para su salud

**Cualquier información adicional e importante encontrada durante el periodo de duración del estudio, que pudiese resultar importante para su salud, le será comunicada inmediatamente.**

***IMPORTANTE:*** Si existe alguna parte de este documento que no entienda, por favor pregunte a uno de los investigadores antes de firmar.

Por medio de la presente constancia, en pleno y normal uso de mis facultades mentales, otorgo en forma libre mi consentimiento a la FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA para que me sea practicada la prueba de tamizaje para la detección de anticuerpos contra el virus del papiloma humano (VPH), mediante la técnica ELISA.

Declaro que se me ha suministrado información sobre la prueba y aspectos concernientes a la infección por el VPH, dentro del desarrollo de un trabajo de investigación que busca detectar este virus en la muestra de mi sangre que se toma cuando la citología vaginal presenta resultados anormales para recibir posteriormente las indicaciones que se requieran en el manejo de esta infección.

La información acerca del resultado de esta prueba se maneja con confidencialidad por parte del equipo de salud que participa de la investigación.

**Soy consciente que la sangre que donaré y la colaboración que prestaré, será utilizada con fines de investigación solamente y que nadie obtendrá ningún tipo de lucro con ellas. Soy también consciente que mi participación en este estudio no representa ningún peligro para mi salud y que el procedimiento para la toma de la muestra es seguro.**

**Nombre:** \_\_\_\_\_ **Identificación** \_\_\_\_\_

**Dirección:** \_\_\_\_\_

**Lugar y fecha:** \_\_\_\_\_

**Testigo 1** \_\_\_\_\_

Firma e identificación del testigo: \_\_\_\_\_

Parentesco con Relación con el sujeto de investigación \_\_\_\_\_

**Testigo 2** \_\_\_\_\_

Firma e identificación del testigo: \_\_\_\_\_

Parentesco con Relación con el sujeto de investigación \_\_\_\_\_

**BOGOTA,** \_\_\_\_\_



PROYECTO  
"COMPARACION DE LA PRUEBA SEROLOGICA DE ELISA DE ANTICUERPOS ANTI-VPH CON LA CITOLOGIA  
Y CON LA DETECCION DEL ADN VIRAL, AL SER UTILIZADAS COMO PRUEBAS DE TAMIZACION PARA LA  
DETECCION DE INFECCION PERSISTENTE POR EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO"

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA

1. Fecha		2. Ciudad:		3. Participante N°:			
4. Nombres y Apellidos:				5. Cédula:			
6. Dirección de residencia habitual			7. Teléfono Fijo:		8. Teléfono Celular:		
9. Ha pensado cambiar de residencia en los próximos dos años: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No							
10. Esta dispuesta a continuar un seguimiento clínico cada seis meses durante dos años: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No							
11. Fecha de Nacimiento: D/M/A			12. Edad:		13. Con cuántas personas de su familia vive:		
14. Cuanto promedian sus ingresos mensuales:		15. Nivel de escolaridad: <input type="checkbox"/> Analfabeta <input type="checkbox"/> Primaria <input type="checkbox"/> Secundaria <input type="checkbox"/> Técnica <input type="checkbox"/> Universitaria					
16. Raza: <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Blanca <input type="checkbox"/> Mestiza <input type="checkbox"/> Otra: Cual : _____							
17. Estado civil: <input type="checkbox"/> Soltera <input type="checkbox"/> Unión libre <input type="checkbox"/> Casada <input type="checkbox"/> Separada <input type="checkbox"/> Viuda							
18. Ha fumado alguna vez:	<input type="checkbox"/> Si	19. Actualmente Fuma:		20. Hace cuanto tiempo fuma? <input type="checkbox"/> Menos 1 año <input type="checkbox"/> Mas de 3 años		21. Cuantos cigarrillos fuma al día: <input type="checkbox"/> 1 - 5 <input type="checkbox"/> 10 - 20	
	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No		22. Cuando fumó, por cuanto tiempo lo hizo: <input type="checkbox"/> Menos 1 año <input type="checkbox"/> 1 a 3 años <input type="checkbox"/> Mas de 3 años		<input type="checkbox"/> 5 - 10 <input type="checkbox"/> Mas de 20	
23. Ha tenido relaciones sexuales: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		24. Edad primera relación sexual:		25. Vida sexual activa: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No			
26. N° de compañeros sexuales: <input type="checkbox"/> Ninguno <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> Mas de 3							
27. Cual es su método más frecuente de planificación, usado en los últimos 5 años:		<input type="checkbox"/> 1. Sin Método <input type="checkbox"/> 3. Ant orales <input type="checkbox"/> 5. Condón <input type="checkbox"/> 7. Norplant o Jadell		<input type="checkbox"/> 2. D.I.U <input type="checkbox"/> 4. Inyectables <input type="checkbox"/> 6. Cirugía <input type="checkbox"/> 8. Otro Cual: _____			
28. Gestaciones: _____ Partos: _____ Vivos: _____ Abortos: _____		<input type="checkbox"/> Embarazo <input type="checkbox"/> Menopausia					
29. Alguna vez ha tenido infección de transmisión sexual por:		<input type="checkbox"/> 1. Vaginitis <input type="checkbox"/> 2. Chlamydia <input type="checkbox"/> 3. VPH Cervical <input type="checkbox"/> 4. Trichomona		<input type="checkbox"/> 5. Gonorrea <input type="checkbox"/> 6. HIV <input type="checkbox"/> 7. Sífilis <input type="checkbox"/> 8. Ninguna <input type="checkbox"/> 9. Otra Cual: _____			
30. Citologías previas: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Primera vez		31. Fecha última citología. D/M/A		Resultado: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal			
32. Alguna vez le practicaron:		<input type="checkbox"/> Conización del Cuello Uterino <input type="checkbox"/> Radioterapia <input type="checkbox"/> Crioterapia		<input type="checkbox"/> Cauterización del Cuello Uterino <input type="checkbox"/> Histerectomía <input type="checkbox"/> Biopsia <input type="checkbox"/> Ninguna			
33. Citología compatible con:		<input type="checkbox"/> 4. Lesión intraepitelial escamosa de Alto grado (LEI AG)					
<input type="checkbox"/> 0. ASC-US		<input type="checkbox"/> 5. Cáncer: _____					
<input type="checkbox"/> 1. ASC-H		<input type="checkbox"/> 6. Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad					
<input type="checkbox"/> 2. AGC (Atipias de células glandulares)		<input type="checkbox"/> 7. Muestra Insatisfactoria					
<input type="checkbox"/> 3. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI BG)							
34. Colposcopia: <input type="checkbox"/> Satisfactoria <input type="checkbox"/> Insatisfactoria							
<input type="checkbox"/> 0. Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad		<input type="checkbox"/> 3. Lesión intraepitelial escamosa de Alto grado (LEI AG)					
<input type="checkbox"/> 1. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI BG)		<input type="checkbox"/> 4. Cáncer: _____					
35. Biopsia: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No							
<input type="checkbox"/> 0. Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad		<input type="checkbox"/> 2. Lesión intraepitelial escamosa de Alto grado (LEI AG)					
<input type="checkbox"/> 1. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI BG)		<input type="checkbox"/> 3. Cáncer: _____					
Observaciones:							
Firma del Responsable: _____							

Cra 50 N° 26-00 Bogotá - Colombia  
315 8919 /324 4671-2 Ext. 135-134 Fax: 3244671 Ext. 108  
[www.fidic.org.co](http://www.fidic.org.co)