DINÁMICA DE LA CARGA VIRAL DE SEIS TIPOS DE VPH DE ALTO RIESGO EN PRESENCIA DE INFECCIONES POR *Chlamydia trachomatis*

INDIRA MARIA BAEZ MURCIA

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la salud

Bogotá, Colombia

2019

DINÁMICA DE LA CARGA VIRAL DE SEIS TIPOS DE VPH DE ALTO RIESGO EN PRESENCIA DE INFECCIONES POR *Chlamydia trachomatis*

Estudiante

Indira María Báez Murcia

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)

Directora:

Sandra Milena Camargo Pinzón B.Sc., M.Sc.

Línea de Biología y Epidemiología Molecular de VPH

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)

Co-Director

Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez M.D., Dr.Sc.

Jefe del Departamento de Biología Molecular e Inmunología

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la salud

Bogotá, Colombia

2019

A Dios

"¡Oh la profundidad de las riquezas y de la sabiduría y del conocimiento de Dios!
¡Cuán inescrutables son sus juicios e ininvestigables sus caminos!" (Romanos 11:33).

AGRADECIMIENTOS

Mi Madre y hermanos por ser mi motivación y apoyo.

A mi esposo Stiven Peña y mis hijos motor de mi vida.

A mi directora Sandra Milena Camargo, mi codirector Manuel Alfonso Patarroyo y a todos los que guiaron este trabajo, particularmente Sara Cecilia Soto de León.

A la Gobernación del Amazonas por apoyar y patrocinar la formación a nivel de posgrado en Colombia, (proyecto BPIN-233, acuerdo especial 021 sistema general de regalías).

A mis compañeros de maestría: Constanza Forero, Rodrigo Cubidez, Danyela Valero y Mauricio Chaparro.

A la FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA por brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis y darme las herramientas necesarias para complementar mi formación académica.

A la universidad del Rosario y los docentes del área de genética por formarnos.

CONTENIDO

RESUMEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....…….11

JUSTIFICACIÓN…….....14

ESTADO DEL CONOCIMIENTO……...….. 16

OBJETIVOS……..……...44

METODOLOGIA…… …44

Población de estudio y consideraciones éticas……...……..44

Obtención de las muestras, procesamiento y análisis molecular……..……45

Tipificación de VPH…….45

Carga viral…….……...46

Detección *C. trachomatis* ……..……...…… ..48

Análisis estadísticos……..48

RESULTADOS……...…….50

DISCUSION…….67

CONCLUSION……..……..73

BIBLIOGRAFÍA…….….74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de las tasas de incidencia estimada de cáncer de cáncer de cérvix en el mundo……..…16

Figura 2. Mapa de las tasas de mortalidad estimada de cáncer de cáncer de cérvix en el mundo……..…17

Figura 3. Tendencia de las tasas estandarizadas de mortalidad en algunos países de américa latina 2000-2012……18

Figura 4. Árbol filogenético de los tipos de VPH basado en la región L1…..……...23

Figura 5. Estructura VPH……..……..……..….25

Figura 6. Organización genómica del VPH……...…….26

Figura 7. Ciclo de vida de VPH-AR……...……..…….29

Figura 8. Proteínas E6 y E7 del VPH-AR y su rolen el desarrollo de cáncer…….30

Figura 9. Prevalencia de VPH-AR e incidencia de cáncer relacionadas con la edad……..32

Figura 10. Historia natural de la infección por VPH……...……...……33

Figura 11. Prevalencia de los tipos de VPH en diferentes regiones de Colombia…….37

Figura 12. Clasificación de *Chlamydia trachomatis* basada en tropismo tisular 39

Figura 13. Ciclo de vida *Chlamydia trachomatis*…...……...……40

Figura 14. Porcentaje de VPH y distribución tipo especifica de 6 tipos de VPH-AR en la linea de base y a traves de los seguimientos …….....55

Figura 15. Porcentaje de mujeres infectadas por *Ct* durante el estudio ……56

Figura 16. La probabilidad de riesgo de que una mujer sin VPH en línea de base adquiera la infección por *C. trachomatis* ……..……55

Figura 17. Distribución VPH en presencia o ausencia de *Ct*……..58

Figura 18. Mediana de la carga viral de los tipos de VPH presencia o ausencia de *Ct* ..58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de clasificación Bethesda. 2014……..……..……19

Tabla 2. Criterio clasificación para la definición de especie, tipo subtipo y variante, identidad de la secuencia de nucleótidos L1……...22

Tabla 3. Genotipo del VPH, tropismo y enfermedad asociada……...24

Tabla 4. Funciones y características de las proteínas del VPH……...27

Tabla 5. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* relacionado con la presencia de VPH..41

Tabla 6. Estudios del rol de *Chlamydia trachomatis* y el desarrollo del cáncer cervical……..……...41

Tabla 7. Cebadores empleados en la qPCR ……..…….……..46

Tabla 8. Concentraciones de los diferentes reactivos empleados para la PCR en tiempo real…..…….....47

Tabla 9. Cebadores usados en la PCR convencional para identificación de *Chlamydia trachomatis*..……....48

Tabla 10. Distribución sociodemográfica y de factores de riesgo de acuerdo con los diferentes tipos infección por VPH ……..……...51

Tabla 11. Distribución de los hallazgos citológicos, colposcópicos, VPH y *C. trachomatis* de acuerdo al seguimiento…...……53

Tabla 12. Distribución de la carga viral total y de acuerdo a la presencia de *C. trachomatis*……..……59

Tabla 13. Estimación estadística generalizada (GEE) para VPH-16, 18 y -31…….…….62

Tabla 14. Estimación estadística generalizada (GEE) para VPH-133, -45 y -58…….…….64

Tabla 15. Modelo Cox……...…….66

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS:

Abreviatura	Término
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ITS	Infección de transmisión sexual.
FIDIC	Fundación Instituto de inmunología.
EPI	Enfermedad Pélvica Inflamatoria.
VPH	Virus de Papiloma Humano.
ADN	Acido desoxiribonucleico.
ARN	Ácido Ribonucleico.
CC	Cancer cervical.
VPH-AR	Virus de Papiloma humano de alto riesgo.
Ct	*Chlamydia trachomatis.*
TEM	Transición epitelio mesenquimal.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction.
LEI-BG	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.
LEI-AG	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.
ORF	Marcho abierto de lectura , siglas en inglés de Open Reading Frame.
Pb	Pares de bases.
URR	Región reguladora corriente arriba.
ORI	Origen de replicación.
LCR	Región Larga de control.
PL	Promotor región tardía.
PE	Promotor región temprana.
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical intraepitelial.
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, siglas en inglés de Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance.
CR	Cuerpo reticular.
CE	Cuerpo elemental.
TBS	Sistema de clasificación de Bethesda siglas en ingles: the Bethesda system.
CCE	carcinoma de células escamosas.
ADC	Adenocarcinoma.
VPH-AR	Virus de Papiloma Humano de alto riesgo.
VPH-BR	Virus de Papiloma Humano de bajo riesgo.

RESUMEN

Diversos patógenos que se han asociado a las infecciones de transmisión sexual (ITS), siendo considerados de gran importancia a nivel mundial por el impacto y las consecuecias que generan, principalmente en términos de salud pública. Tal como la relación causal entre la persistencia de la infección de los tipos del virus de papiloma humano (VPH) considerado de alto riesgo, con el daño progresivo del cérvix y el desarrollo de cáncer cervical (CC). Se ha demostrado que la presencia únicamente del VPH no es suficiente para que esta progresión se genere, lo que ha sugerido que la presencia de otros cofactores pueden influir en el curso clínico y desenlace de la infección por VPH. En este estudio, se analizó la depuración y persistencia de la coexistencia de dos infecciones de transmisión sexual, una viral (VPH) y otra bacteriana (*Chlamydia trachomatis* - *Ct*) en una población de mujeres colombianas que asisten a los programas de promoción y prevención para el control del cáncer cervical. Fueron incluidas 310 mujeres, las cuales se les tomó durante un periodo de tres años muestras periodícamente, con una diferencia de 6 meses entre cada visita (±3 meses). En todas las mujeres incluidas se llevó a cabo la identificación y cuantificación molecular de 6 tipos de VPH de alto riesgo (VPH-16, -18, -31, -33, -45 y -58), así como la detección de la infección por *Ct*. Los resultados del estudio mostraron para la líne base (primera muestra) una frecuencia una infección por VPH de 71,3% y por *Ct* 28,1%, la coexistencia entre VPH y *Ct* fue del 26,2%; la mayor detección viral ocurrió en el seguimiento 2 (79,4%), mientras que para Ct fue en el seguimiento 4 (36,6%); en cuanto a la distribución tipo-específica,los tipos VPH-16 y -31 fueron los de mayor aparición a lo argo de los seguimientos, en cuanto a al número de copias de VPH los resulatdos mostraron que esta fue mayor en mujeres que cursaban simultáneamente con infección por *Ct* (mediana: 424, IQR: 19300), este comportamiento se observo para la mayor parte de los tipos virales con la excepción de HPV-33 donde la carga viral fue mayor en aquellas mujeres sin infección bacteriana (mediana: 3640, IQR: 101864). Una regresión logística con medidas repetidas en el tiempo GEE mostró que la carga de VPH es modulada por factores como el origen de las pacientes (para VPH-16), la étnia (para VPH-16), el método de planificación familiar (para VPH-16 y -45), número de gestaciones (para VPH-16, -18 y -33), menopausia (para VPH-16) y número de compañeros sexuales (para VPH-45). Finalmente, la fuerza de la asociación entre la presencia de *Ct* y el riesgo de tener una infección por VPH se cuantificó mediante el uso del estimador de riesgo hazard ratio (HR), se observaron de riesgo para la coexistencia con la Ct la detección de VPH (HR = 2,06; IC 95%: 1,46 a

2,89), infecciones por VPH-33 (HR = 1,45; IC 95%: 1,12 a 1,86) e infecciones por VPH-58 33 (HR = 1,37; IC 95%: 1,05 a 1,78). Este estudio longitudinal involucró mujeres de tres poblaciones heterogéneas socio-demográficamente de Colombia, proporcionaron datos sobre la distribución de la coinfección por dos de las ITS de mayor aparición a nivel mundial, por lo que la comprensión del papel que desempeñan otros patógenos resulta relevante y plantea nuevos retos en el abordaje e implementación de estrategias acertadas que mejoren y prolonguen la calidad de vida en la población.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que a nivel mundial diariamente más de un millón de personas contrae una infección de transmisión sexual (ITS), se ha demostrado que estas ITS comprometen la salud sexual y reproductiva afectando tanto a hombres como mujeres, llegando incluso a afectar recién nacidos (1-3). Dada la morbilidad de las ITS, éstas se han convertido en la quinta causa de consulta médica, generando un gran interés en el desarrollo de políticas de salud pública, por el gran impacto producido en la economía, debido a las incapacidades, sobrecostos a los sistemas de salud aque estas conllevan (4-6).

Se han identificado más de 30 patógenos entre bacterias, virus y parásitos como los principales causantes de las ITS, siendo las infecciones por el Virus de Papiloma Humano (VPH) las más comunes a nivel mundial. Anualmente mujeres entre 15 a 24 años presentan 14 millones de nuevas infecciones y se ha reportado una prevalencia del 11,52% de VPH en mujeres con citologías normales (7).

No obstante, la presencia del VPH es el principal factor etiológico en el desarrollo del Cáncer Cérvix (CC) (5, 8). De los 200 tipos de VPH clasificados hasta el momento, trece tipos virales han sido denominados como cancerígenos (VPH-AR-16, -18, ,31,-33, -35, -39, -45, -51 -52, -56, -58, -59 y -68) por su potencial oncogénico y las lesiones que causan (9-11). El CC es considerado la cuarta neoplasia más común en mujeres en el mundo (principalmente en edad fértil); a nivel mundial para el 2018 se reportaron 569.847 nuevos casos y 311.365 muertes, con tasas de incidencia y mortalidad de 15,2 y 7,1 casos por 100.000 habitantes respectivamente, siendo el 85% de los casos en países en vía de desarrollo (12-14).

En Colombia se reportan 1.986 muertes por CC anualmente, con tasas de incidencia de 18,7 y mortalidad de 8,0 casos por 100.000 habitantes, convirtiéndose en la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en nuestro país (12). Una de las razones por la que estas tasas son tan elevadas, es por la falta de seguimiento de los programas de propoción y prevención (p&P) del CC en nusetro país, por lo que muchas mujeres que cusan con infecciones persistentes por VPH, son detectadas cuando ya hay daño tisular presentando lesiones neoplasicas (15).

En cuanto a la historia natural de la infección por VPH se ha evidenciado que el 90% de las infecciones se resuelven espontáneamente en periodos de tiempo entre 12 a 24 meses, por lo tanto solo una pequeña fracción de éstas contribuyen en el desarrollo de lesiones a nivel de cérvix (13). Por lo que la patogénesis del CC puede estar condicionada a la presencia de otros cofactores de riesgo relacionados con el comportamiento del individuo, (como el número de compañeros sexuales, número de embarazos, hábitos de fumar, entre otros), o factores biológicos del individuo (como el microambiente vaginal, la susceptibilidad genética) o factores del virus (como la carga viral del VPH y los tipos virales) y finalmente las infecciones con otras ITS (16, 17).

Uno de los principales cofactores asociados al desarrollo de CC, es la infección por *Chlamydia trachomatis (Ct);* esta bacteria es considerada de transmisión sexual, con alta prevalencia a nivel mundial (18), anualmente se presentan cerca de 100 millones de casos y se han relacionado con adquisición de VPH (19) y la persistencia vral en el hospedero (20), por lo que de esta manera facilita las condiciones del tejido favoreciendo el VPH para que altere el metabolismo celular del hospedero, por lo que se presume que la presencia de Chlamydia y VPH simultáneamente, incrementan las tasas de transformación de lesiones precursoras cancerígenas (21-23).

Un meta-análisis con más de 4.291 casos de CC y 7.628 controles, reveló que la presencia simultánea de las infecciones por *Ct* y VPH incrementan el riesgo de desarrollar CC (24), por lo que se han venido dilucidando varias hipótesis sobre el efecto sinérgico de esta coexistencia. Hasta el momento, se ha demostrado *in vitro* que la infección por *Ct* induce la hipertrofia y metaplasia celular dañando la integridad epitelial, debido a que *Ct* puede modificar el tamaño celular ya sea por la alteración de la reorganización de la actina de la célula hospedero, además favorece la transformación del tejido cervical por acumulación de factores involucrados en los procesos inflamatorios (25, 26); se ha demostrado que *Ct* altera la transición epitelio-mesenquimal (TEM), la adhesión y diferenciación celular, produciendo inflamación crónica lo que facilita los procesos de invasión del VPH (21, 27, 28). Finalmente, se ha demostrado que esta infección bacteriana produce efectos antiapoptóticos, facilitando el crecimiento de células programadas para muerte celular (29-31).

En cuanto a la carga viral la información sobre su asociación con el desarrollo de lesiones cervicales ha sido contradictoria; existen estudios que sugieren una relación entre el aumento en el número de copias virales y la presencia de lesión cervical, donde buena parte del genoma de VPH se encuentra integrado al del hospedero (34, 35). Sin embargo, otros reportes indican que infecciones virales que cursan con infecciones persistentes con baja carga viral, presentan un peor pronóstico a nivel del cérvix, explicado bajo el concepto que infecciones en bajo número de copias hacen que el hospedero no monte una respuesta inmune eficiente que permita la eliminación del VPH, trayendo como consecuencia persistencia viral y la aparición de lesiones en el cérvix).

La coexistencia con otras ITS, afecta la multiplicidad y número de los microorganismos que están infectando la célula, afectando incluso la carga viral del VPH (36). Por ejemplo se ha reportado que la expresión del oncogén VPH-AR *E6* modula la multiplicación de *Ct*, por lo que se ha propuesto una relación sinérgica entre estos dos microrganismos, debido a que al reducir la presencia de *Ct* se podía entrar en un estado antigénicamente silencioso, promoviendo su supervivencia de los patógenos al limitar una respuesta inmune eficiente por parte del hospedero (37), Sin embargo, el efecto de la infección por Ct sobre la carga viral de VPH es aún desconocido.

En este contexto, la asociación entre VPH y CC se encuentra claramente establecida y se ha avanzado hacia la comprensión de la misma; la comprensión del papel que desempeñan las ITS distintas a VPH en el desarrollo de neoplasia cervical resulta importante y plantea nuevos retos en la implementación de estrategias acertadas que mejoren y prolonguen la calidad de vida en la población femenina.

JUSTIFICACION

En Colombia 1.986 mujeres mueren anualmente por Cáncer de cérvix (CC), convirtiéndose en la segunda causa de muerte en nuestro país (12), lo que hace necesario replantear la medidas de prevención existentes, asi como la generación de nuevos enfoques de prevención que permitan disminuir las tasas de mortalidad de nuestro país.

Aunque la infección persistente por tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo (VPH-AR), es el principal factor en el desarrollo de CC, su presencia no es suficiente, por lo que en el desarrollo de CC, son necesarios otros factores que involucrados en el curso clinico y desenlace de la infección viral (38, 39), entre dichos factores se encuentra el número de copias del VPH (40, 41), se ha demostrado que la carga viral alta pueden ser un marcador predictor en el desarrollo de CC, así como del avance de las lesiones preneoplásicas (41-43).

Otro factor relacionado con el desarroloo de CC es la coexistencia de VPH con otras infecciones de transmisión sexual (ITS), puesto que estudios sugieren que estas interacciones favorecen la permanencia, replicación e integración del virus en el hospedero, trayendo como consecuencia la aparición de anormalidad a nivel cervical (43).

En este contexto *Ct* constituye una infección bacteriana transmitida sexualmente, en nuestro país, la frecuencia de la infección es del 28%, siendo una de las infecciones bacterianas adquirida sexualmente más común (44). Muchas de estas infecciones pasan asintomáticas (cerca del 70% de las infecciones), por lo que no reciben tratamiento oportuno, lo que trae graves consecuencia para la salud sexual y reproductiva (44).

Adicionalmente, la infección por *Ct* y el VPH comparten la misma ruta de transmisión, que consiste en el contacto vía sexual por lo estas infecciones comparten factores de riesgo relacionados con el comportamiento sexual; adicionalmente estos patógenos presentan el mismo tropismo por el tejido que cubren los órganos sexuales, afectado primordialmente la células epiteliales, donde ademas de compartir metabolitos de la celula hospedera, actuan sinérgivamente para favorecer su persistencia en el organismo (45, 46).

Previamente, la Fundación Instituto de Colombia reportó que *Ct* presenta una prevalencia superior al 25% en mujeres colombianas que presentaban simultáneamente infección por VPH, de las cuales, las mujeres que presentaban infecciones por múltiples tipos virales tenían mayor riesgo en la adquisición de la *Ct* (3). Conocer la dinámica de la carga viral de 6 tipos de VPH-AR y si ésta se asocia con la presencia de *Ct* permitirá aportar en el conocimiento de las infecciones simultáneas por estas ITS en población colombiana, información relevante para el control de cáncer cervical.

ESTADO DEL CONOCIMIENTO

Cáncer Cérvix

El Cáncer Cérvix (CC) es la cuarta neoplasia más común a nivel mundial, con reportes de 569.847 casos nuevos por año, la distribución de la incidencia y mortalidad por esta causa varía de acuerdo a la situación socioeconómica de los países, concentrándose el 85% de las tasas de mortalidad en países en vía de desarrollo (figuras 1 y 2) (14).

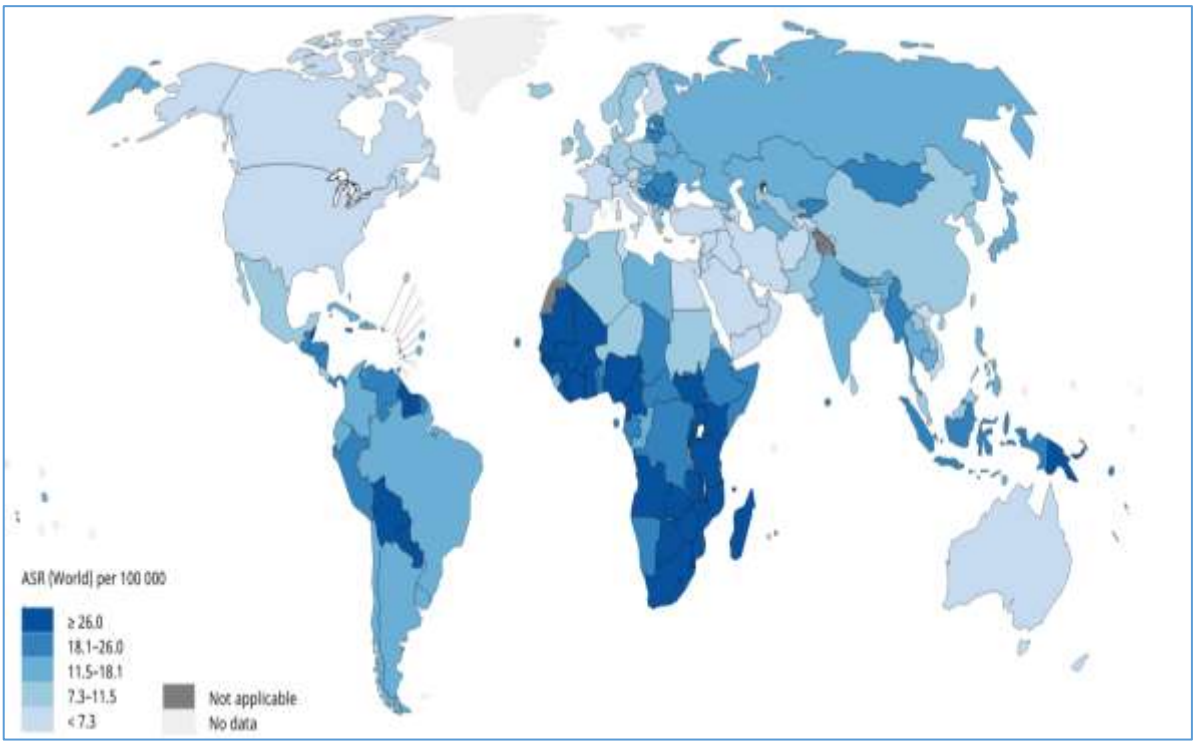

Figura 1. Mapa de las tasas de incidencia estimada de Cáncer Cérvix en el mundo (GLOBOCAN 2018).

La mortalidad en nuestro país es elevada, teniendo en cuenta que el CC es una enfermedad prevenible si se detecta a tiempo y se trata oportunamente (7). En paises desarrollados, los programas de P&P has sido exitosos, por ejemplo, la introducción en estados unidos de la prueba Papanicolaou o citología como principal prueba de tamización para el CC entre 1950 y 1960 logró una reducción en la mortalidad por esta causa (47, 48); no obstante para los países en vía de desarrollo esta neoplasia sigue siendo una de las más comunes entre las mujeres (49).

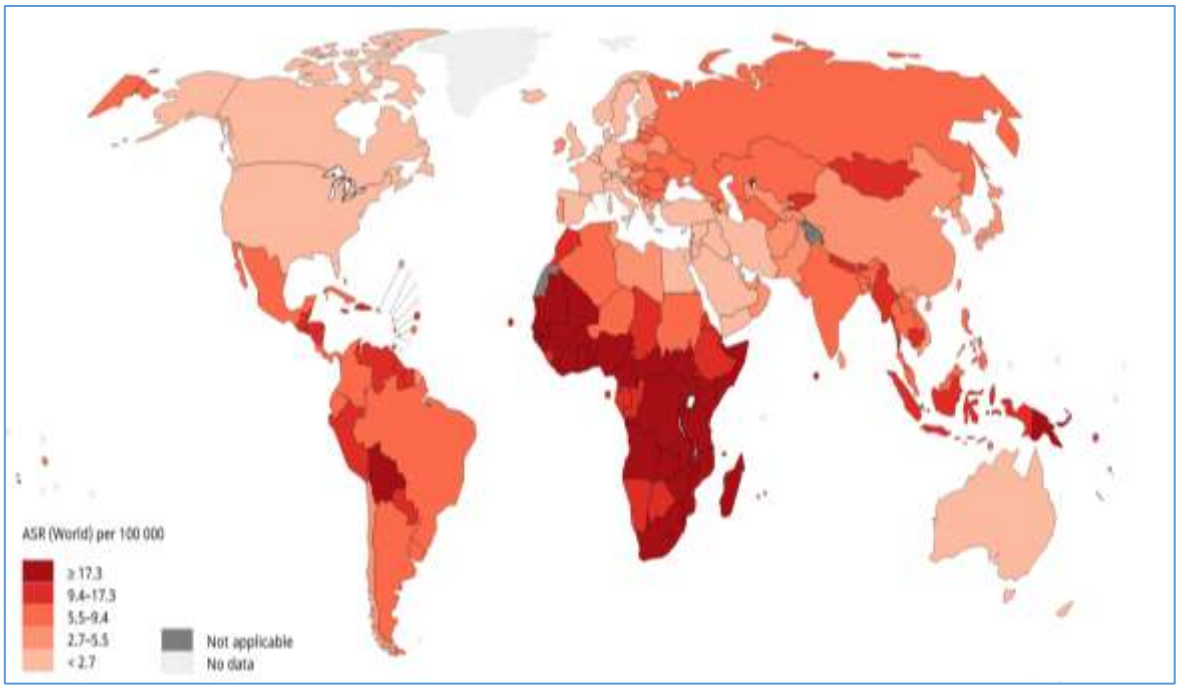

Figura 2. Mapa de las tasas de mortalidad estimada de cáncer cérvix en el mundo (GLOBOCAN 2018).

Para los países latinoamericanos en un periodo de 12 años se presentó una tendencia en la disminución de las tasas de mortalidad, aunque en el último informe de globocan del 2018, específicamente para Colombia, la disminución en dichas cifras no fue considerable (50). por lo que se presentaron 92.136 casos y 37.640 defunciones al año, tasas de mortalidad 3 veces más altas que las de Norteamérica (figura 3). Por lo tanto, analizar las diferencias entre los programas de prevención y detención entre estos países y examinar más a fondo los factores de riesgos entre las poblaciones, podría dar un guía acerca de las estrategias a implementar para disminuir la mortalidad por esta neoplasia (51, 52).

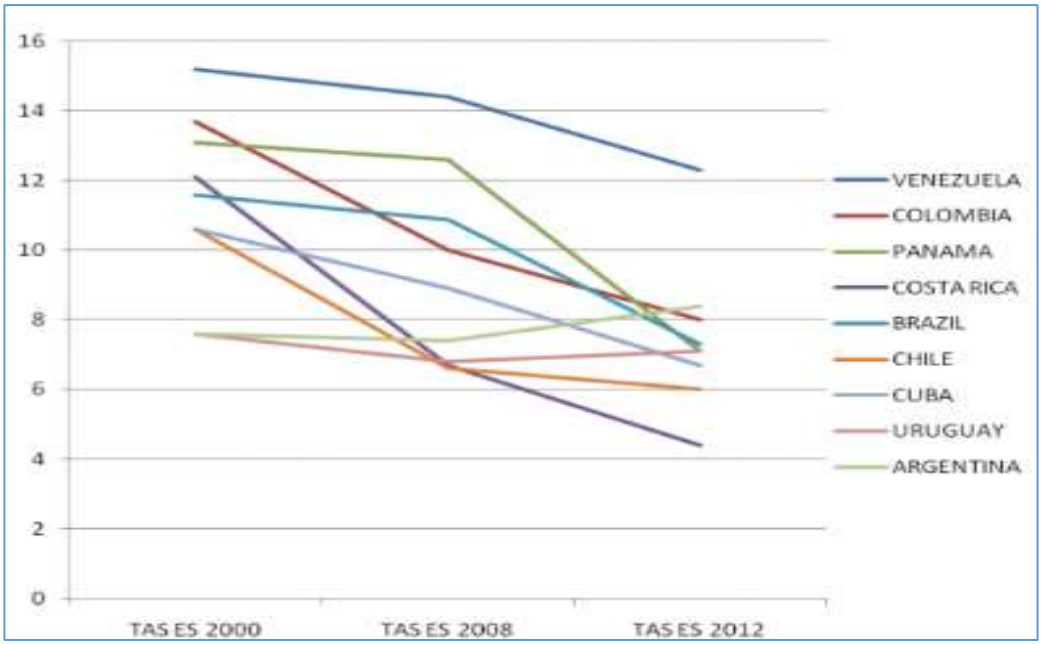

Figura 3. Tendencia de las tasas estandarizadas de mortalidad en algunos países de américa latina 2000-2012 (Tomada de Capote, 2015).

Existen dos tipos principales de células que cubren el cérvix: las células escamosas no queratinizadas localizadas en el exocérvix y las células glandulares ubicadas en el endocérvix, las cuales forman una hilera de células cilíndricas (53, 54). El punto en el que estos tipos de células se encuentran, se conoce como zona de transformación y es central para entender la patogénesis del cáncer escamoso cervical, ya que es en esta zona donde se lleva a cabo la metaplasia escamosa del cuello uterino, el cual consiste en el reemplazo fisiológico del epitelio columnar del endocérvix, por el epitelio escamoso estratificado, proceso que es aprovechado por el VPH para su replicación (55).

La prueba de Papanicolaou ha sido una prueba de tamización y prevención de cáncer efectiva y de bajo costo, esta ha sido ampliamente empleada para obtener células cervicales, con el fin de realizar los análisis histológicos necesarias para determinar algún tipo de neoplasia (56), por lo tanto durante décadas se ha tratado de establecer una guía para que los reportes de los hallazgos encontrados, sean lo mejor descriptivos y

universales (57, 58), por lo que actualmente el sistema de clasificación de Bethesda (TBS) ha sido aceptado para la presentación de los hallazgos citológicos (Tabla 1) (59).

Tabla 1. Sistema de clasificación Bethesda. 2014 (59).

TIPO DE ESPECIMEN	**Indican el tipo de muestra (convencional, liquida, otras**
Espécimen Adecuado	• Satisfactorio para la evaluación. • Insatisfactorio para la evaluación.
Categorización General	• Negativa para lesión intraepitelial o maligna. • Anormalidad en células epiteliales. • Otros.
Interpretación Y Resultados	• Negativa para lesión intraepitelial o maligna • Anormalidades en células epiteliales Células escamosas: • ASC-US de significancia indeterminada. • Lesión intraepitelial de bajo grado • Lesión intraepitelial de alto grado • Carcinoma de células escamosas. Células glandulares: • Atípicas (células endocervicales, células endometriales, células glandulares. • Adenocarcinoma endocervical in situ. • Adenocarcinoma.
Otras Neoplasias Malignas	Otros tipos de cáncer que no afectan al cuello uterino, tales como el melanoma maligno, los sarcomas y los linfomas.

Los dos tipos más comunes de cáncer de CC se conocen como el carcinoma de células escamosas (69% de los casos) y el adenocarcinoma, el cual se origina en las células del exocervix (25% de los casos). De los distintos tipos virales, el VPH-16 es él más prevalente y se encuentra en el 59.3% de los casos de carcinoma de células escamosas y en el 36.3% de los casos de adenocarcinoma; el VPH 18 es el segundo tipo más común en CC, siendo asociado y apareciendo con mayor frecuencia en adenocarcinoma (36.8%), seguido en menor proporcion de aparición (13.2%) en el carcinoma de células escamosas del CC, (60). Las lesiones precancerosas que progresan a estadios malignos, son clasificadas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) o lesión escamosa intraepitelial (LEI) (58), estas además se categorizan de acuerdo al grado de lesión, siendo de bajo grado (NIC1 o LEIBG) o de alto grado (NIC2/3 o LEIAG) (61).

En la interpretación y los resultados se tiene en cuenta los siguientes criterios:

- *Negativa para lesión intraepitelial o maligna:* Se reporta cuando no existe evidencia de neoplasia celular, se debe indicar si las muestras presentan microrganismos, cambios celulares reactivos, atrofia, o los estados glandulares post-histerectomía (59).
- *Células escamosas atípicas de importancia indeterminada ASCUS:* Indica que hay una ausencia de una conclusión determinada. Por lo tanto, la muestra no puede clasificarse con seguridad como normal o anormal, esto ocurre generalmente debido a un cambio celular cuantitativo o cualitativo insuficiente (62).
- *Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEIBG):* Estas lesiones pertenecen a una categoría de células displásicas superficiales e intermedias. Hay presencia de unas pocas células displásicas superficiales que tienen abundante citoplasma translúcido claro con un núcleo ligeramente agrandado que ocupa menos de un tercio del área total de la célula. La cromatina nuclear es finamente granular, está distribuida uniformemente y solo es ligeramente hipercromática. Este estadio se asocia con virus de papiloma de bajo riesgo y un menor riesgo de progresión (63).
- *Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LEIAG)*: Estas generalmente se localizan en la mucosa endocervical en la zona de transformación y se extienden a las invaginaciones del epitelio columnar. Se caracterizan citológicamente por una mezcla de células displásicas y cancerosas, los frotis son más ricos en células anormales, hay una mayor variación en la población celular y las células displásicas parabasales se encuentran comúnmente. La morfología celular revela células más pequeñas del tipo de células intermedias y parabasales que ocurren individualmente o en agregados sincitiales con bordes celulares indistintos y núcleos superpuestos, este estadío se observa en la displasia grave y el carcinoma in situ. Los núcleos en las lesiones de alto grado son agrandados, redondos u ovalados, ocupando dos tercios del área total de la célula y la cromatina es finamente granular (57, 59, 61, 63).
- *Carcinoma de células escamosas invasivo***:** La morfología celular revela pequeñas células redondas ovaladas dispuestas en agregados sincitiales con bordes celulares indistintos y polaridad celular alterada. la cromatina nuclear es hipercromática y aproximadamente granular, observándose nucléolos en tumores menos diferenciados. Adicionalmente, las células glandulares típicas de importancia indeterminada (AGUS) demuestran cambios más allá de los encontrados en el proceso reactivo

benigno, pero son insuficientes para el diagnóstico de adenocarcinoma (57, 59, 61, 63).

- *Adenocarcinoma:* Un diagnóstico de adenocarcinoma en el examen de frotis indica un tumor invasivo, que podría ser de origen endocervical, endometrial, grupos de células con efecto tridimensional y formas de roseta. los núcleos son excéntricos y muestran una variación significativa en el tamaño con un cambio a hipercromatismo moderado, cromatina irregular y núcleos prominentes (57-59, 61, 63).

Si bien el VPH está presente en la mayoría de los CC, la presencia de este organismo no conlleva obligatoriamente a la enfermedad (50). Estudios sobre la historia natural de la infección han evidenciado que del total de mujeres que adquieren la infección por VPH en algún momento de su vida, la mayor parte de ellas presenta una adecuada respuesta inmune que le permite eliminar la infección viral, por lo que en aproximadamente el 90% de éstas depuran eficientemente el VPH en un lapso de 12 a 24 meses (64). No obstante, las mujeres que no logran depurar el virus y presentan persistencia desarrollan lesiones intraepitelial de bajo grado (LSIL), de este grupo solamente entre el 20 al 40% de las mujeres la infección se mantiene persistente, limitando la resolución de la lesión, y progresando a lesiones intraepiteliales de alto grado (65).

Como se describió previamente se ha identificado la presencia de ADN del VPH-AR en aproximadamente el 99,7% de los tumores de CC (66-68), lo cual ha permitido establecer la asociación del VPH como el principal factor de riesgo para adquirir la neoplasia. Esto ha llevado a implementar más de 193 pruebas comerciales diferentes, que detectan el VPH en muestras provenientes de cérvix, aunque de esta pruebas solo 69 (35,7%), han sido respaldados por la evaluación analítica y clínica (69, 70). Entre las distintas pruebas, la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa tiene los niveles de especificidad y sensibilidad más elevados, además permite la detección de ADN viral, así como su cuantificación (71).

Generalidades Virus de Papiloma Humano (VPH).

Taxonomía del VPH: La familia Papillomaviridae está compuesta de 49 géneros y más de 200 tipos de papilomavirus, los cuales se han asociado a las lesiones en la piel (verrugas), en mucosas (condilomas), y procesos malignos en el epitelio como cérvix,

vagina, ano, cabeza, cuello y piel (72). Los Virus de Papiloma que infectan humanos se han agrupado en cinco géneros diferentes distribuidos de la siguiente manera: Alphapapillomaviruses, Betapapillomaviruses, Gammapapillomaviruses, Mupapillomaviruses y Nupapillomavirusalpha (Figura 4) (72).

La clasificación de los VPH, se basa en la proteína de la cápside L1, la cual ha sido seleccionada porque es altamente conservada, por lo tanto si la secuencia de esta región comparte menos del 90% es clasificado en otro tipo de VPH, si la identidad es entre el 90 al 98% se clasifica como subtipo y una identidad mayor al 98% se agrupa como variante virar (Tabla 2) (73).

Tabla 2. Criterio clasificación para la definición de especie, tipo subtipo y variante, identidad de la secuencia de nucleótidos L1**.**

CLASIFICACION	IDENTIDAD SECUENCIA L1 (%)
Especie	60-70
Tipo	71-89
Subtipo	90-98
Variante	>98

Por otra parte, en cuanto al origen de los VPH, estudios lograron aislar ADN de VPH de un *Actinopterygii*, lo que podrá indicar que desde hace aproximadamente 420 millones de años este virus ha venido co-evoluciónando con diversas especies, adicionalmente se ha detectado en mamíferos, aves y reptiles (74).

Los papilomavirus infecta principalmente el tejido epidermal, tomando como ventaja los diversos nichos ecológicos producto de la amplia gama de epidermis en los vertebrados. En cuanto a la especificidad del nicho, se ha demostrado que el epitelio cutáneo es infectado por los cinco géneros de VPH, pero solo el género *alpha* tiene tropismo tanto para el epitelio cutáneo, como el mucoso (75), teniendo en este último, un rol clínico importante debido a que los tipos virales oncogénicos (de alto riesgo asociados al cáncer), se encuentran agupados filogenéticamente en este género y dentro de las especies 9 y 7 (Figura 4 y Tabla 3) (76-78).

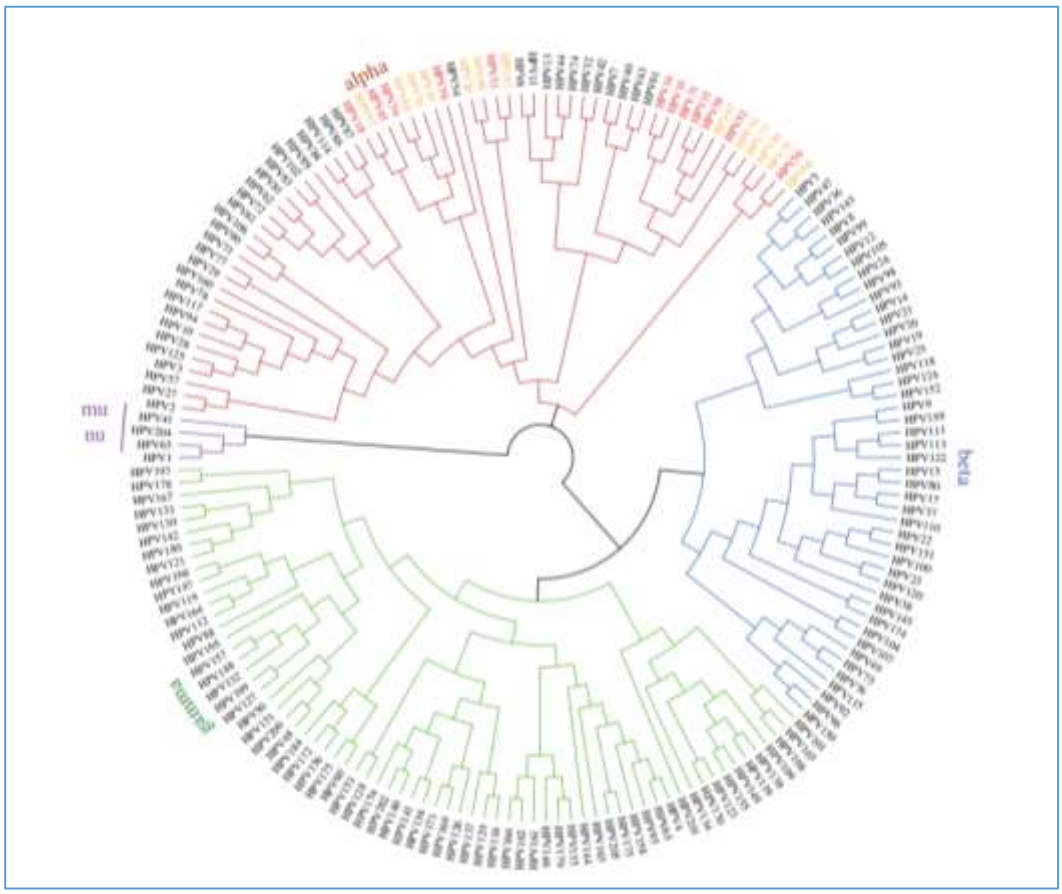

Figura 4: Árbol filogenético de los tipos de VPH basado en la región L1 (tomado de McBride AA. 2017 (74))

Tabla 3. Genotipo del VPH, tropismo y enfermedad asociada (Tomado y traducido de Harden 2017).

Género	especie	Tipo representativo de VPH	Tropismo	Enfermedad asociada
Alfa-VP	α1	32	Mucosal	Neoplasia intraepitelial, carcinoma invasivo
	α2	3,10,28	Cutánea	Verrugas planas
	α4	2,27,57	Cutánea	Verrugas comunes
	α7	18,39,45,59,68	Mucosa	Neoplasia intraepitelial, carcinoma invasivo
	α9	16,31,33,35,52,58	Mucosa	Neoplasia intraepitelial, carcinoma invasivo
	α10	6,11	Mucosa	Condiloma puntiagudo
Beta-VP	β1c	5,8,12,14,19,20,21,24,25,36,47	Cutánea	Epidermodisplasia verruciformes
	β2	9,15,17,22,23,37,38	Cutánea	Epidermodisplasia verruciformes
	β3	49	Cutánea	Epidermodisplasia verruciformes
Gama-VP	γ1	4,65	Cutánea	Verrugas
	γ4	60	Cutánea	Verrugas
Mu-VP	μ1	1	Cutánea	Verrugas plantar
	μ2	63	Cutánea	Verrugas
Nu-VP	N	41	Cutánea	Verrugas

Estructura y genética VPH: Los VPH se caracterizan por ser pequeños (entre 53 a 60 nm), carecen de envoltura y su genoma consiste en una molécula de ADN, bicatenario circular, que se asocia con las proteínas de la histona (H2a, H2b, H3 y H4) de la célula, en un complejo similar al de la cromatina y representado en color gris en la figura 5 (en gris todas las proteínas de la estructura celular utilizada del hospedero para su ensamblaje), este codifica sus propias proteínas virales por medio de mRNAs policistronico y representados en color amarillo (79).

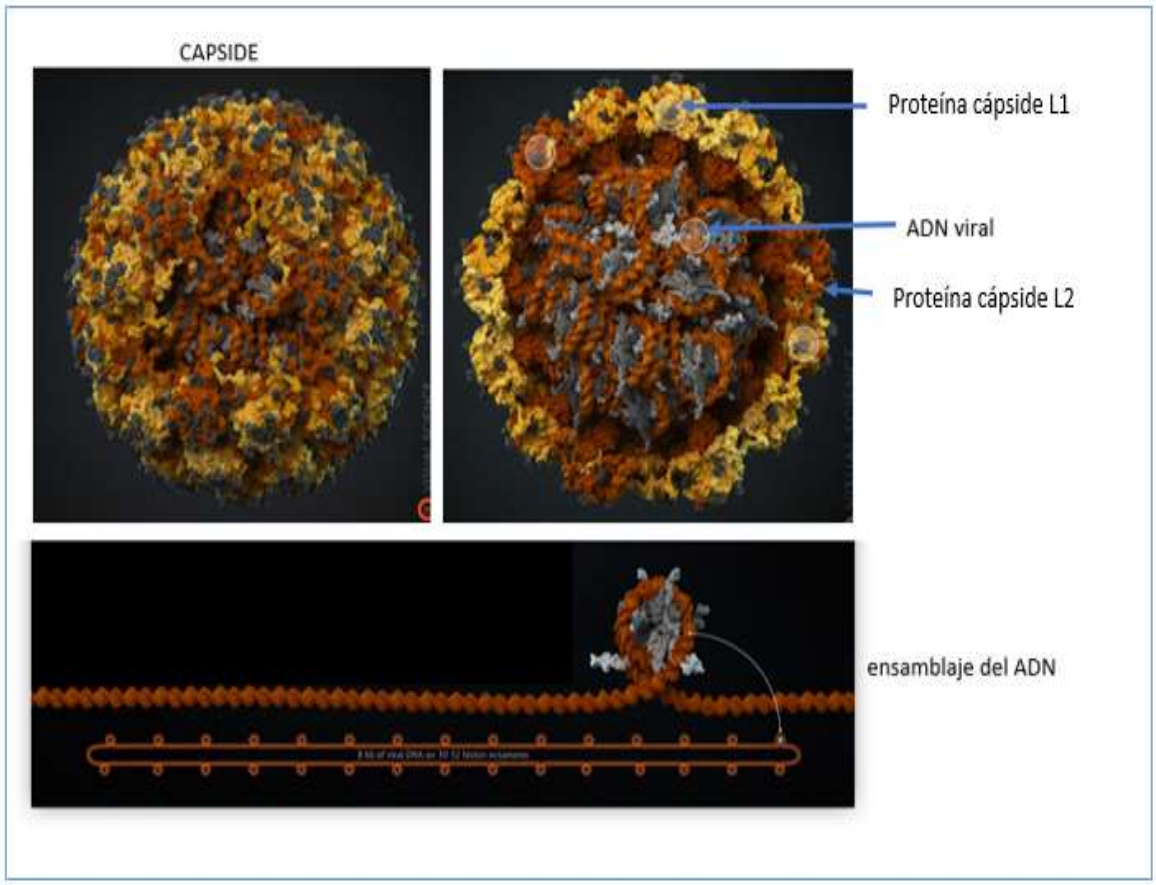

Figura 5. Estructura del VPH. Tomado y modificado de https://www.visual-science.com/ru/projects/human-papillomavirus/3d-model/

El tamaño de su genoma oscila entre 6800 a 8400 pares de bases (pb), cuenta con ocho marcos de lecturas abiertos (ORF de las siglas del inglés Open Reading Frame), dividido en tres regiones, una región de control (URR de las siglas del inglés Upstream Regulatory Region) la cual no codifica para ningúna proteína, una region de genes tempranos (genes *E1-E3*, *E4-E7*), donde se encuentran aquellos relacionados con los procesos oncogénicos, y finalmente una región de genes tardíos (genes *L1* y *L2*), responsables de la composición de la cápsula viral (Figura 6) (80).

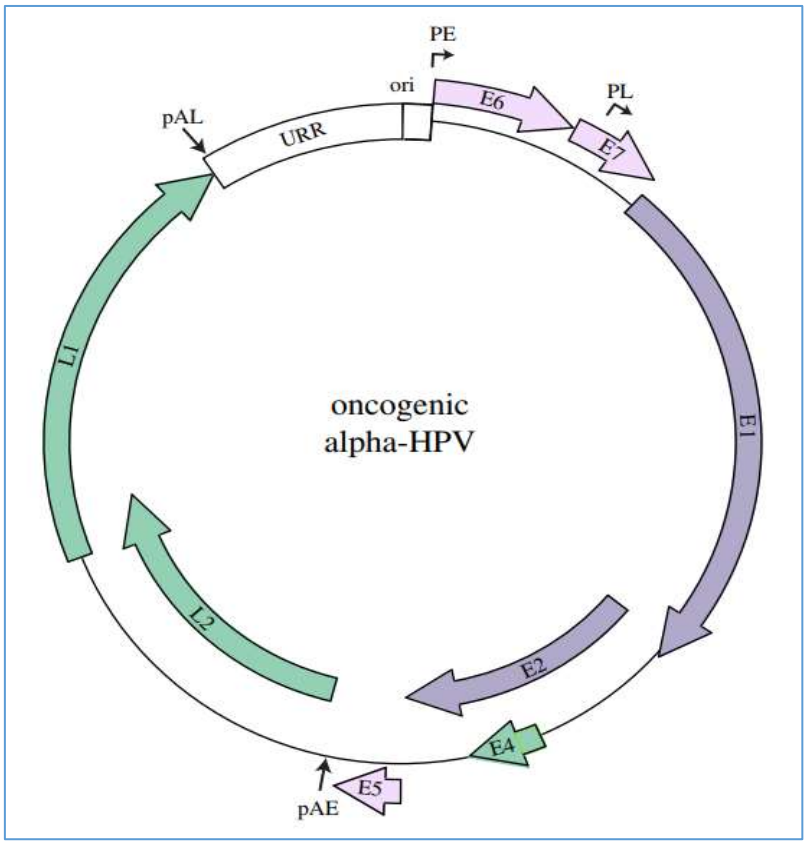

Figura 6: Organización genómica del VPH (tomado de varisicio 2017), Región reguladora corriente arriba (URR:upstream regulatory region), origen de replicación (ori), promotor de la región tardía (PL), promotor de la región temprana (PE), sitios de poliadenilación tardíos y temprano (pAE y pAL)

Región de control: esta región se encuentra corriente arriba de la región temprana y comprende entre 10 al 15 % del genoma viral, en esta región está presentes dominios de unión de diversos factores de transcripción como: AP1, cEBP NF1, YY1, Oct1, TEF1 (TF1), TFIID, Sp1, el receptor glucocorticoide y el receptor de la progesterona (GR/PR), desempeñando funciones esenciales en la expresión viral, además está compuesto de motivos amplificadores de expresión como M33 y el motivo m29, que cumplen roles de represores transcripcionales (80).

Genes y proteínas virales tempranas: esta región codifica para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7. *E1* codifica una helicasa viral dependiente de ATP necesaria para la replicación y amplificación del ADN, mientras que *E2* codifica activadores transcripcionales, estas proteínas desempeñan papeles fundamentales en la replicación viral (81, 82), El gen de la proteína E4 está dentro de la región codificante de *E2* y se expresa principalmente como una proteína de fusión E1^E4, durante las últimas etapas del ciclo de vida del VPH, esta además se une a los filamentos de citoqueratina, alterando

su estructura, por lo que se cree que juega un papel en el escape viral de las capas epiteliales, ayudando además a evadir las defensas epiteliales del hospedero (83, 84).

E5 codifica para una proteína hidrofóbica transmembranal que interactúa con los receptores de tirosin quinasa y las proteínas transmembranales de señalización célular, juega además un rol importante en la apoptosis y evasión de la respuesta inmune (85), finalmente E6 y E7 son las oncoproteínas primarias las cuales tienen como papel principal dirigir la entrada al ciclo celular. Las principales diferencias entre los tipos virales clasificados como de alto y bajo riesgo, se deben a variaciones en las proteínas E6 y E7 (86-88).

Proteínas tardías: estas proteína forman la cápside viral e intervienen en el reconocimiento y unión celular; la proteína L1 es la de mayor abundancia en la cápside, mientras que la L2 es menor cantidad, esta última además contribuye a la infectividad, el tráfico viral, la encapsulación del ADN viral y la liberación del virión (72, 89).

Tabla 4. Funciones y características de las proteínas del VPH (Tomada de santos et al. (90))

Tipo de proteína	Nombre	Función de la proteína
No estructurales	E1	Tiene funciones de helicasa, es esencial para la replicación y la transcripción
	E2	Esencial para replicación y transcripción viral, segregación genómica y encapsidacion.
	E4	Regulación la expresión de genes tardíos, controla maduración y salida viral
	E5	Estimula la actividad transformarte de E6 y E7 promueve la fusión celular generando aneuploidía e inestabilidad cromosómica, contribuye a la invasión de la respuesta inmunitaria
	E6	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo la apoptosis, interactúa con proteínas del sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus; activa la expresión de la telomerasa.
	E7	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores PRB, incrementa la actividad de quinasas dependiente de ciclina; afecta la expresion de genes de fase S por interaccion directa con

		factores de trascipcion E2F y con histonas desacetilasas; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria.
Estructurales	L1	Proteína principal de la cápside. Reconoce receptores sobre la célula hospedera; es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes.
	L2	Proteína secundaria de la cápside. Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones.

Ciclo de vida del VPH: el VPH requiere de epitelios estratificados para llevar a cabo su ciclo de vida, el cual se lleva a cabo entre 2 a 3 semanas, correspondiente con el tiempo que tarda las células epiteliales basales en madurar y progresar a la capa superior (176). La infección del VPH inicia en las células basales, y va progresando a medida que el epitelio se va diferenciando y ascendiendo, diversos procesos de expresión génica y maduración se van desarrollando, este ciclo se lleva en diferentes fases:

Infección por VPH: Inicialmente el VPH infecta células indiferenciadas epiteliales de la capa basal, las cuales se caracterizan por ser mitóticamente activas, dado que estas células están protegidas por varias capas de células diferenciadas no son fácilmente accesibles, por lo tanto se requiere de la presencia de una microruptura del tejido, que le permita la exposición de las células inferiores de la capa epitelial basal (Figura 7) (28).

Una vez el virus entra en contacto con la célula blanco ocurre su unión por medio proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), esta se da por contacto de L1 y HSPG induciendo cambios conformacionales en la cápside viral (85), y activación de otros receptores que internalizan el virus (91). Posteriormente, el VPH queda susceptible a la escisión por furin-proteasas, la internalización de cápsides desde la superficie de la célula es asincrónica y puede tomar de dos a cuatro horas (72, 92, 93); una vez dentro de la célula basal, el genoma viral se mantiene como un episoma (circular) de bajo número de copias, si persiste la infección por VPH, aumenta el número de episomas víricos por célula y aumenta la probabilidad de integración del genoma viral en el genoma del hospedero.

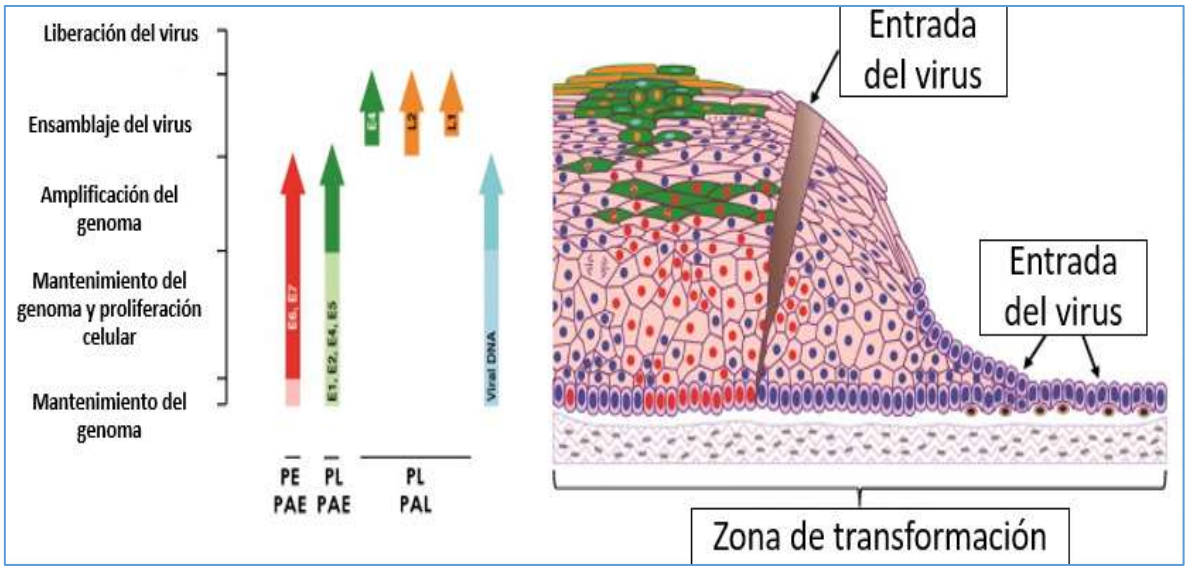

Figura 7. Ciclo de vida de los VPH-AR. PAE: Posición del sitio de poliadenización temprana; PAL: Posición del sitio de poliadenización tardía ; PE: promotor temprano, PL: promotor tardío (Tomada de John Doorbar 2012).

Replicación y expresión del genoma viral: un proceso clave en la transformación celular y formación de células malignas, es el evento de integración del ADN del virus al genoma del hospedero, este proceso se da cuando el número de copias virales han alcanzado un umbral (entre 50 a 100 copias), proteínas E1 y E2 son las primeras en ser sintetizadas y mientras se van replicando, la formación de las células hijas del hospedero hace que las células infectadas migren hacia la superficie epitelial (90). En las capas intermedias del epitelio cervical, se expresa la proteína E4 viral y típicamente están en las fases S o G2 del ciclo celular (94), la expresión de E2 disminuye, por lo que se expresan los oncogenes *E6* y *E7* y ocurre la integración del genoma viral la del hospedero, por lo que se describe que una de las funciones de E2 es la regulación de la transcripción de E6 y E7 (89) (Figura 8).

La pérdida de E2 aumenta los niveles de oncoproteínas E6 y E7, lo que fomenta la supervivencia celular a medida que las células continúan dividiéndose, llevando a la inestabilidad genómica y anomalías cromosómicas, como los procesos de metilación continúan acumulándose, aumenta la probabilidad del desarrollo tumoral (95), E6 y E7 contribuyen al ciclo de vida del VPH al modificar el entorno celular para permitir la

amplificación del genoma viral en células terminalmente diferenciadas, las cuales en condiciones de normalidad serían incompetentes para la replicación del ADN (96, 97).

En particular, E6 y E7 dirigen la proliferación celular en las capas basal y parabasal causando un aumento progresivo en el tamaño del área infectada. La proteína E7 del papilomavirus se dirigen a la pRB supresor tumoral del retinoblastoma, degradando esta última a través del sistema ubiquitina-proteasoma (98). E7 provoca la liberación de miembros de la familia E2F de los complejos represores transcripcionales unidos a proteínas chaperonas; esto da como resultado la activación constitutiva de los programas de expresión génica modulada E2F que controlan la síntesis de ADN y la proliferación celular, adicionalmete, algunas E7 evita desencadenar la detención de G1 durante la diferenciación de células epiteliales mediante la inactivación de los inhibidores de CDK2, CDKN1A y CDKN1B tal como se representa en la figura 8 (99, 100). Por otra parte, la proteína E6 de VPH de alto riesgo inactivan el supresor tumoral p53 al dirigirlo hacia la degradación proteasomal a través de la ubiquitina ligasa E3, UBE3A (E6AP).

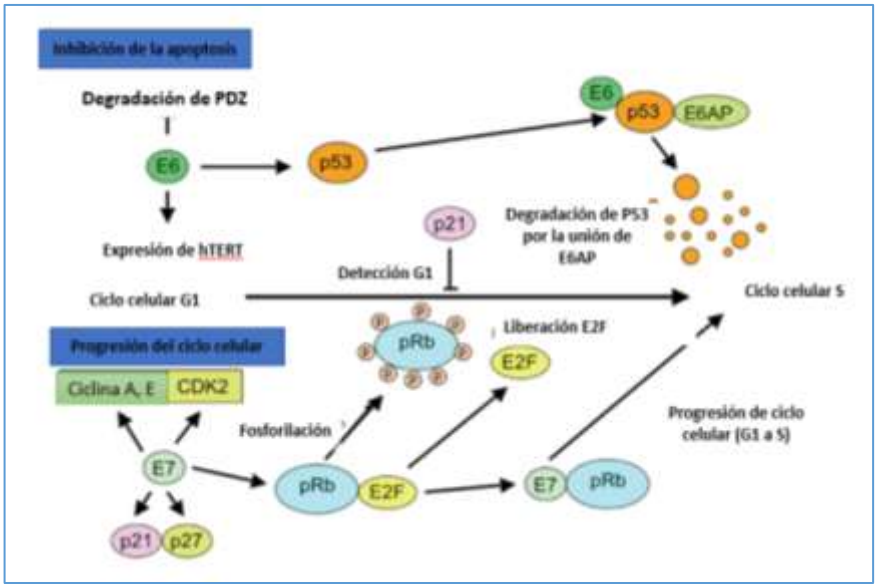

Figura 8. Proteínas E6 y E7 del VPH-AR y su rol en el desarrollo del cáncer (Tomado de Senba y col. 2012 (108))

Esta acción bloquea las actividades antiproliferativas y pro-apoptóticas de p53 en respuesta al daño del ADN y al estrés celular causado por la entrada aberrante de la fase S (101, 102) La expresión de E6 también regula positivamente la actividad de la telomerasa, permitiendo el mantenimiento de la integridad de los telómeros a pesar de las divisiones celulares repetidas, además, las proteínas E6 se dirigen al dominio PDZ celular

que contiene proteínas que regulan el contacto celular y las vías de señalización (103-105).

Finalmente, la infección por VPH induce una respuesta al daño del ADN (DDR), por lo que los VPH secuestran las vías de señalización ATR y ATM DDR para su diferenciación (106-108).

Ensamblaje y maduración del VPH: las actividades de replicación viral ocurren en todas las capas del epitelio, pero los viriones solo se ensamblan y liberan en la capa celular más superficial (109). En las capas epiteliales superiores, las células abandonan el ciclo celular, y en un subconjunto de las células que expresan E4, se sintetizan las proteínas L1 y L2 viral, lo que permite el empaquetamiento del genoma viral (110).

La finalización del ciclo de vida del VPH involucra la expresión de la proteína L2, la salida de la célula del ciclo celular y finalmente la expresión de la proteína de la cubierta principal L1,para permitir el empaquetamiento del genoma (106-108). La encapsidación del genoma implica el reclutamiento de L2 a las regiones de replicación a través de E2, antes de la expresión de L1 y el ensamblaje de la cápside icosoédrica en el núcleo (109).

La maduración de las partículas virales ocurre en las capas superiores del epitelio escamoso terminalmente diferenciado, donde las partículas se exponen a un ambiente oxidante (111). Este proceso de maduración implica la acumulación de enlaces disulfuro entre las proteínas L1, dando como resultado la condensación de la cápside, aumentando así su estabilidad y resistencia a la digestión proteolítica. Los VPH no son líticos y la diseminación vírica ocurre debido a la pérdida normal de la integridad nuclear y citoplásmica durante la diferenciación terminal del queratinocito infectado. E4 también puede contribuir a la liberación del virión uniéndose a los filamentos de citoqueratina y alterando su estructura (112, 113).

Se cree que los niveles de expresión de E6 y E7 aumentan a partir de la neoplasia intraepitelial cervical grado 1 a 3 (CIN1 a CIN3) y que estos cambios en la expresión génica subyacen directamente al fenotipo neoplásico, También se cree que la desregulación vírica observada en CIN2 / 3 facilita la integración del episomal viral en el

cromosoma de la célula hospedero, lo que puede desregular aún más la expresión de E6 y E7 (103).

***Historia natural de la infección por el virus de papiloma humano*:** El VPH es adquirido por contacto directo con personas que ya se encuentran infectadas, siendo obtenido principalmente por vía sexual, la población con mayor riesgo y tasas de prevalencia más altas son los jóvenes sexualmente activos, generalmente entre 17 y 25 años (Figura 9).

Este pico va descendiendo al aumentar los años, lo que se ha relacionado con la respuesta inmune y el aumento de la capacidad del hospedero por eliminar el virus, quedando un porcentaje (entre el 3 al 5%) de mujeres con infección viral persistente, lo que corresponde al grupo que van a presentar los mayores riesgos de desarrollar la neoplasia(114).

En cuanto a la incidencia de cáncer cervical, entre los 35 a 40 años se presenta el pico más alto, un segundo pico de incidencia de CC empieza en mujeres que tienen más de 55 años, lo que también se ha asociado a la disminución en la respuesta inmune relacionado con la edad y salida del virus de su estado de latencia lo que conlleva al desarrollo de cambios a nivel celular (115-117).

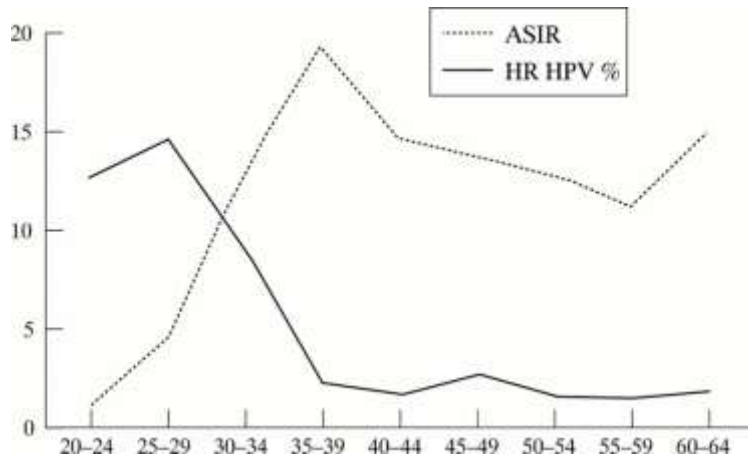

Figura 9. Prevalencia de VPH-AR e incidencia de cáncer relacionadas con la edad. tomada y modificada de Bosch y col, 2002 (115) ASIR: incidencia de Cancer cervical (siglas en ingles: age specific incidence rate).

En el momento de la infección, el virus aprovecha las hendiduras existentes del epitelio estratificado, necesario para infectar las células basales (118). En algunas mujeres la

infección puede progresar a lesión intraepitelial de bajo grado (NIC 1) y ser detectado en la citología; otro grupo de mujeres la infección no afecta el tejido celular y pasa desapercibida para las técnicas de tamización, el 80% de todas las infecciones se resuelven sin ningún tipo de tratamiento en un periodo de 12 A 24 meses, debido a la efectiva respuesta inmune del hospedero.

El los casos donde no se logra depurar la infección por VPH se considera como infección persistente (Figura 10), esta persistencia se ha relacionado con el tipo de virus presente, siendo los de alto riesgo los que persisten durante mayor tiempo (58). Las infecciones persistentes expresan y replican los genes virales, en las capas de las células intermedias y terminales, conocida como la fase infección replicante, los tejidos empiezan a afectarse manifestándose las lesiones intraepiteliales de alto grado (NIC 2 y 3).

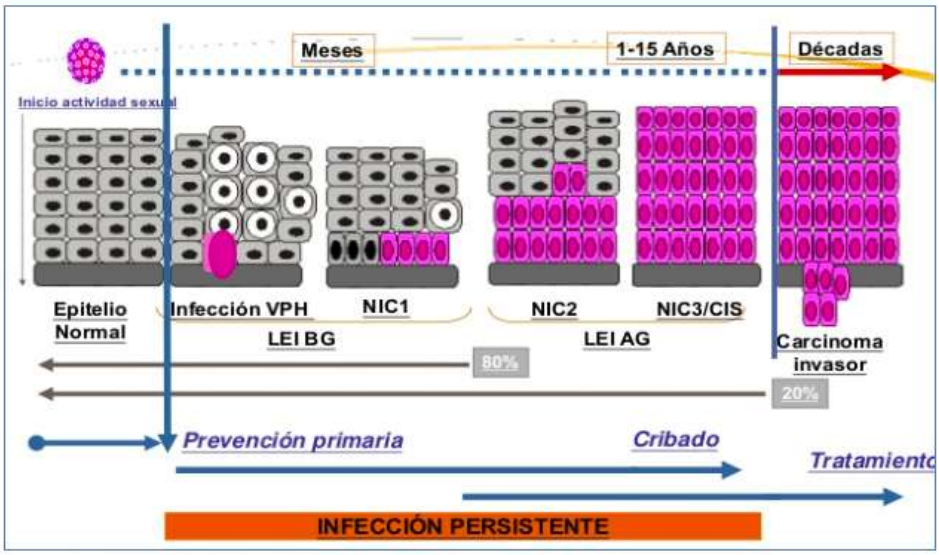

Figura 10. Historia natural de la infección por VPH. LEIBG: Lesión intraepepitelial de bajo grado; LEIAG: Lesión intraepitelial de alto grado; SIL lesión intraepitelial escamosa; CIN: neoplasia cervical intraepitelial

Los estudios poblacionales indican que para que estos cambios se produzcan tiene que pasar un periodo de hasta15 años; no obstante, aunque se hayan expresado los genes virales, un 20% de estas mujeres sufre de regresión de la lesión (119). En el porcentaje que continua con infecciones persistentes, se continua con la expresión de los oncogenes *E6* y *E7*, esta fase se conoce como infección transformante, en esta se produce la

inestabilidad y cambios en las células del hospedero que transforma la célula a tal grado que se produce el cáncer y puede convertirse en un carcinoma invasor (65, 120).

Cofactores potenciales: la historia natural de la infección muestra una fuerte tendencia a la regresión, son pocas las mujeres que una vez se han infectado por el VPH presentan cambios histopatológicos que produzcan el desarrollo de la neoplasia, por lo tanto, se han asociado a cofactores importantes en la progresión de la infección de VPH:

- *Fumar*: varios estudios epidemiológicos han demostrado que mujeres que fuman son más susceptibles al CC en presencia de VPH-AR. Mujeres con VPH y anormalidad cervical que fuman tenían hasta tres veces más probabilidades de ser diagnosticadas con CIN3, comparadas con las que no fuman, sugiriendo que el tabaco influye en la progresión de la neoplasia (121, 122). Adicionalmente la exposición aguda al humo de tabaco, activa directamente la transcripción de los oncogenes *E6* y *E7* de VPH-16 a través de varias vías de señalización celular del hospedero, por ejemplo la activación del promotor p97, que involucra la activación de la vía de señalización EGFR / PI3K / Akt / C-Jun en células de Cáncer de Cérvix entre otras (123, 124). Fumar reduce la respuesta inmune tanto humoral como celular del hospedero, por lo tanto, el VPH aprovecha esta disminución para continuar con su historia natural (125).

- *Anticonceptivos orales*: el consumo prolongado de anticonceptivos orales aumenta el riesgo de CC. Un estudio encontró un riesgo aumentado en 10 % por menos de 5 años de uso; un 60 % de riesgo aumentado por 5 a 9 años de uso, y el doble de riesgo por 10 o más años de uso, con el aumento del doble en el riesgo a desarrollar CC (126, 127), indicando que los estrógenos y la infección por VPH actúan de forma sinérgica para afectar el CC (128).

- *Multiparidad*: las mujeres en cada estado de embarazo pueden inmunosuprimirse y propiciar el micro ambiente para la persistencia del VPH; la exposición de la zona de transformación en el exocérvix facilita la exposición al VPH, por lo que los traumas cervicales que causa cada parto facilitan la exposición de las células basales;. los cambios hormonales por su parte contribuyen a que la infección progrese, por lo que un mayor número de embarazos aumenta el riesgo de desarrollo de CC (129, 130).

- *Infecciones de transmisión sexual:* se ha identificado algunos microorganismos de transmisión sexual que pueden facilitar el proceso de daño en el ADN del hospedero y anormalidades cromosómicas en las células epiteliales cervicales, que conllevan al desarrollo de CC; por ejemplo, el Virus Herpes Simple 2 (HSV2) con VPH-16 aumenta hasta un 25% el riesgo de progreso de lesiones cervicales, demostrándose *in vitro* que la presencia de HSV2 incrementaba la integración y replicación de VPH (131). Por otro lado, también se ha reportado que el VIH, aumenta la persistencia del VPH, y por lo tanto el riesgo de CC (132, 133).

Distribución de los tipos de VPH en Colombia: en Colombia se realizó un estudio donde se analizaron los patrones de distribución de seis tipos de VPH de alto riesgo (AR-VPH-16, -18, -31, -33, -45, -58) y dos tipos de bajo riesgo (BR VPH-6 and -11), los resultados mostraron una distribución variable de los tipos de VPH según la región geográfica analizada, tal como se aprecia en la Figura 11 (134), en general para Colombia el tipo de VPH más prevalente es VPH-16, lo que concuerda con lo reportado a nivel mundial (135), el segundo más prevalente es VPH-31 y no VPH-18 como se esperaba de acuerdo a lo reportado previamente en estudios en su mayoría con población Europea (135). Uno de los principales hallazgos de los estudios llevados a cabo con infecciones por múltiles tipos de VPH, fue que la población indígena puede ser más susceptible a adquirir la infección y coinfección por tipos de alto riesgo de VPH (134, 135).

Prevalencia Tipo especifica de VPH en mujeres Colombianas

Chaparral (Tolima)

Girardot (Cundinamarca)

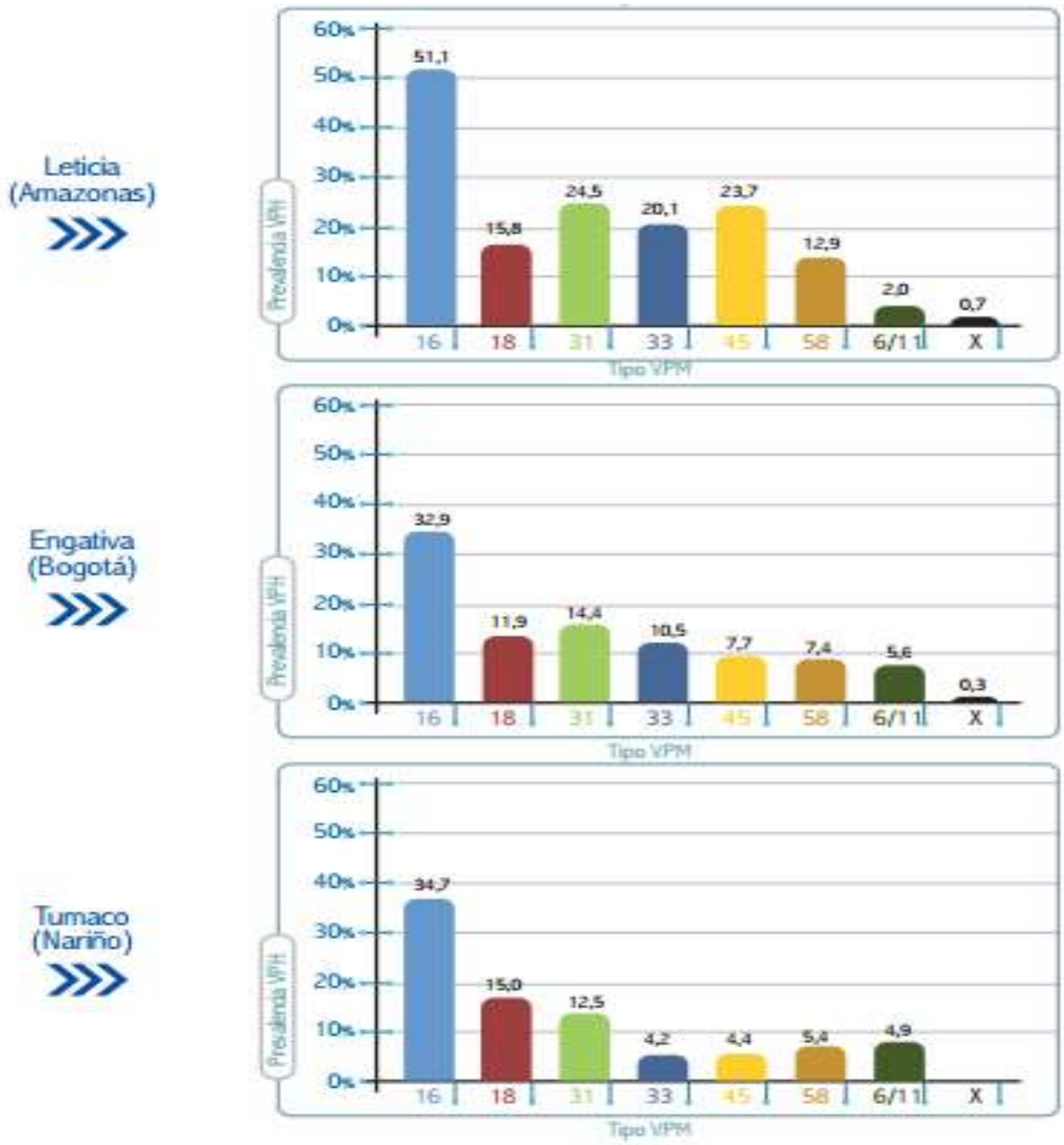

Figura 11. Prevalencia de los tipos de VPH en diferentes regiones de Colombia. (Camargo, 2011)

Rol de la carga viral del VPH en el cáncer cervical

Estudios sugieren una relación entre el aumento en el número de copias virales y la presencia de lesión cervical, donde buena parte del genoma de VPH se encuentra integrado al del hospedero (34, 35, 136). La infección por VPH-AR puede dar como resultado lesiones preneoplásicas como CIN1 en la mayoría de los casos, pero se ha demostrado que infecciones de VPH-AR con altas cargas virales puede persistir por un tiempo más prolongado y eventualmente progresar a CIN2 /3; razón por la cual el número

de copias del virus ha sido asociado como un predictor de la persistencia y progresión de las lesiones (137, 138).

Adicionalmente la gravedad de la neoplasia cervical se puede medir por la carga viral presente del VPH-AR, estudios han demostrado que la carga de VPH-16 aumentaba el grado de lesión, en este sentido la carga viral por unidad de ADN genómico es un posible biomarcador que permitiría predecir la población en riesgo de desarrollar CC (136), donde un número alto de copias del virus son encontradas, principalmente integrado al genoma del hospedero (35, 43).

La carga viral mínima que se ha asociada con la detección visual de citología anormal (ASCUS +) es de 6,5 VPH copias por célula (69, 139, 140). En contraste, otros estudios indican que infecciones virales que cursan con baja carga viral, presentan a través del tiempo un peor pronóstico respecto al cambio a nivel cervical, al tener infección en bajo número de copias, el hospedero no logra montar una respuesta inmune eficiente que permita la eliminación del VPH, trayendo como consecuencia persistencia y la aparición de lesiones cervicales (141).

Previamente en estudios llevados a cabo por FIDIC, se logró determinar que valores bajos de carga para VPH-31 se asocian con persistencia de este tipo a través del tiempo, y bajos valores de carga para VPH-16, fueron un indicador de pronóstico negativo para el cambio colposcópico. Por lo tanto, la asociación entre la carga viral y la frecuencia de la lesión intraepitelial es tipo específica y podría depender de la duración de la infección, siendo las altas cargas relacionadas con infecciones transitorias, mientras que las bajas cargas con persistentes (142, 143).

Chlamydia trachomatis como co-factor del cáncer de cérvix.

Generalidades de *Chlamydia trachomatis*: esta bacteria pertenece al phylum Chlamydiae, dentro de este phylum, la familia clínicamente relevante es conocida como *Chlamydiaceae*, compuesto por 11 especies, algunas de estas son consideradas patógenos de interés en salud por producir infecciones zoonóticas, donde los humanos son hospederos accidentales; no obstante, *Ct* constituye la especie de mayor impacto a nivel de salud pública, siendo considerada una de las infecciones de mayor prevalencia a nivel

mundial. *Ct* es una bacteria gram-negativa, transmitida sexualmente, y es de gran interés debido a que los reportes de la WHO indican que alrededor de 130 millones de personas presentan infección por esta bacteria(18, 144).

La gran mayoría de infecciones sin tratar se resuelven espontáneamente por la respuesta del sistema inmune del hospedero, no obstante cerca del 20% se reinfecta nuevamente en un periodo de 12 meses. Por otra parte, el 70% de las infecciones presentan un cusro clínico asintomático, por lo que las infecciones persistentes son reconocidas como las principales causantes de enfermedades inflamatorias y complicaciones en el tracto reproductivo tanto de hombres como mujeres (145).

Variantes de Ct: a través de la proteína mayor de membrana (OMP de las siglas del inglés Outer Membrane Protein), 19 variantes de *Ct* han sido identificadas y agrupadas en tres complejos, el primero conformado por las variantes A, B, Ba y C, las cuales son las responsables de enfermedades oculares entre ellos tracoma y ceguera; el segundo las variantes D-K, Da, Ia y Ja, las cuales son las de mayor prevalencia, y responsables de infecciones a nivel genitourinario y finalmente las variantes L1-L3, L2a-b, L2c asociadas a linfogranuloma venéreo (Figura 12) (146-148).

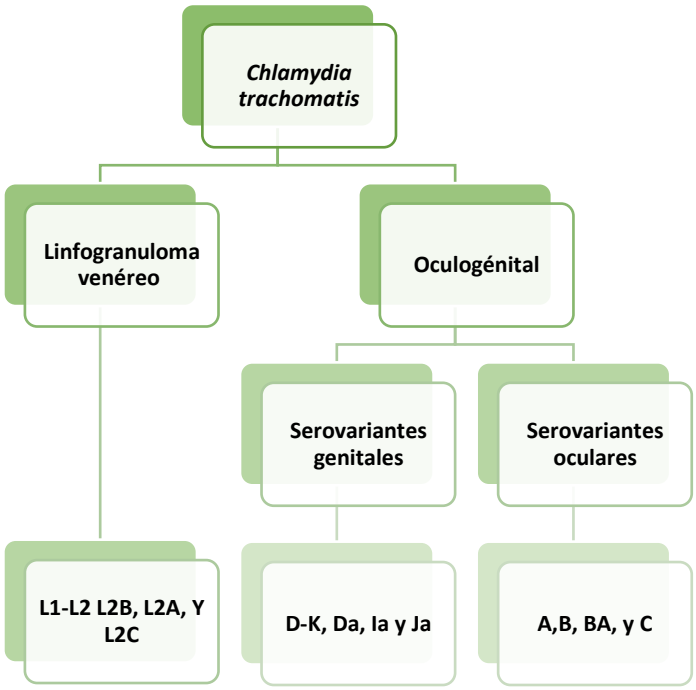

Figura 12. Clasificación de *Chlamydia trachomatis* basada en tropismo tisular. Tomado y modificado de Abdelsamed y colb, 2013 (148).

Ciclo de vida de Ct: Ct tiene un ciclo bifásico, que inicia con la adherencia de la partícula metabólicamente inactiva (conocida como cuerpo elemental o CE) a la célula hospedero, ingresando a través de adhesinas bacterianas; este CE hace una diferenciación formando la partícula metabólicamente activa o cuerpo reticular (CR) que es la forma intracelular (Figura 13), esto impide que el fagosoma se fusione con el lisosoma evitando la destrucción de la bacteria por las enzimas citoplasmáticas, porteriormente se forma una inclusión donde los CR se dividen por fisión binaria y se reorganizan nuevamente en la progenie de CE que se liberan por lisis celular , logrando así la infección a nuevas células vecinas (145, 149).

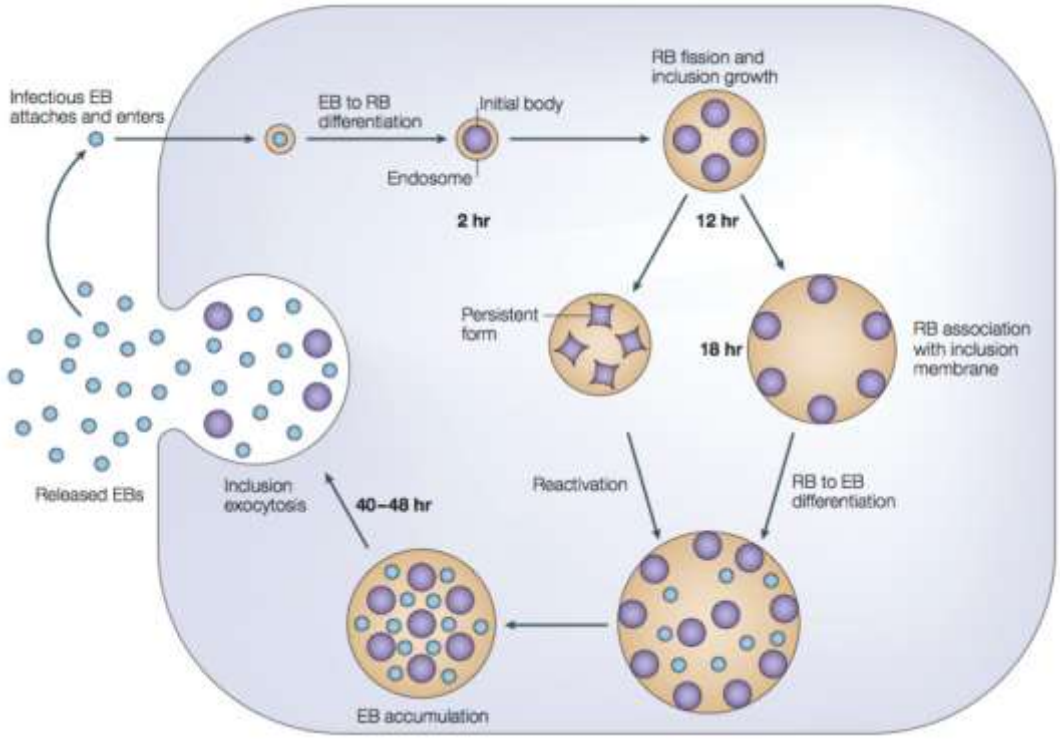

Figura 13. Ciclo de vida *Chlamydia trachomatis* (Tomado de Brunham y colb, 2005).

Ct como Cofactor: algunos estudios ha documentado a *Ct* como una bacteria de infección sexual común a nivel mundial, que puede afectar el funcionamiento normal de las células, donde produce enfermedades como cervicitis, salpingitis, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) La prevalencia de *Ct* aumenta en relación con la presencia de VPH tal como lo muestra la tabla 5, lo que indica que la coinfección *Ct*/VPH pueden alterar la persistencia de estos microoganismo y por lo tanto modificar la actividad de proliferación celular que conlleva al desarrollo del cáncer (150).

Tabla 5. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* relacionado con la presencia de VPH (Tomado y modificado de Zhu, 2016).

ESTUDIO	REGIÓN	n	PREVALENCIA DE *Ct*		OR
			VPH positivo (%)	VPH negativo (%)	
Deluca	Argentina	227	34,9	19,0	2,28
Golijow	Argentina	279	10,9	12,5	1,40
De paula	Brasil	250	13,0	6,7	-
Finan	Lebanon	299	25,8	6,7	4,84
Verteramoet	Italia	857	53,6	46,3	2,82

Varios estudios que han tratado de identificar el mecanismo de *Ct* puede participar en el desarrollo de la neoplasia (Tabla 6). *Ct* puede alterar vías importantes de señalización celular y eventos moleculares que producen transformación celular, tales como cambios en las vías de señalización del ciclo celular del hospedero, inducen la transformación epitelio mesenquimal; adicionalmente, evaden señales como la apoptosis o de respuesta a daño de ADN, finalmente interactúa con el sistema inmune y evadiendo su respuesta (FALTA REFERENCIA). Adicionalmente puede acelerar la proliferación celular mediante la activación de las vías como MEK-ERK, inhibir la apoptosis de las células infectadas, alterar la respuesta al daño del ADN e inducir la proliferación celular, *Ct* es responsable de las desestabilización estructural y funcional en el citoplasma y el núcleo (151-153).

Tabla 6. Estudios del rol de *Chlamydia trachomatis* y el desarrollo del cáncer cervical.

TIPO DE ESTUDIO	VIA MOLECULAR	OBSERVACIONES	REFERENCIA
In vitro	Cambios en el perfil ribosomal del hospedero (bloqueo en el inicio de la transcripción.	Absorbancia ARN Western blot.	154
In vitro	Disminución de la polimerasa β por la inhibición directa a través de miR-499a y regulación a la baja de p53 debilitar la célula hospedero reparación por escisión de base durante la infección	PCR cuantitativa en tiempo real. Immunoblot. Ensayo cometa.	155

In vitro	Induce la regulación positiva del receptor EphrinA2 de la tirosina quinasa de la superficie celular (EphA2) a través de la activación de la vía ERK, que mantiene a la célula infectada en un estado resistente a la apoptosis.	siRNA y transfección Citometría de flujo Microscopía de inmunofluorescencia	156
In vitro	Bloquea la división de la célula hospedero para obtener una ventaja de crecimiento adicional en células multinucleadas	Inmunoflorescencia Microscopia epifluorescente.	157
Modelo orgnanotipico. ***In vitro***	Altera metaloproteinasas de la matriz de la matriz extracelular.	Inmunohistoquimica	17
***In vivo* (ratón)**	Induce la transición epitelio mesenquimal	Microarreglo PCR en tiempo real cuantitativa.	158
In vitro	El ADN de *Ct* se une al cGAS para activar STING e inducir respuestas de IFN de tipo I durante la infección. Induce patogénesis	qRT-PCR microscopia confocal	159
In vitro	*Ct* evade la inmunidad innata al inhibir la producción de NO a través de la inducción de la vía de poliamina alternativa.	Inmunoblot inmunoprecipitación PCR cuantitativa Citometría de flujo	160
In vitro **In vivo (ratón)**	Aumento en la proliferación celular en el cuello uterino y evidencia de displasia cervical inestabilidad cromosómica.	Microscopia confocal Histopatología	161
In vitro	Intervienen en la respuesta en la respuesta de daño de ADN	Inmunofluoresecencia Inmunoblot	153
In vitro	Inhibe la señalización del daño telomérico del ADN a través de la regulación ascendente de hTERT transitoria	qRT-PCR microscopia FISH cuantificación Immunoprecipitation Western blot	162

In vitro	Intervención en el ciclo celular. Separación prematura de cromosomas	Inmunohistoquimica Ensayo de fusión celular Westerblot	163
In vitro	Defectos en los polos del huso mitótico	Microscopia Wester blot Immunoprecipitacion	164
In vitro	Estructura específica en la membrana de inclusión de *Ct* puede ser responsable de las interacciones conocidas de las clamidias con la red de microtúbulos y los efectos resultantes en la estabilidad del centrosoma	Microscopia inmunofluorescente Microscopio de transmisión por electrones Coinmunoprecipitación y Western Blott	165
-	Mantiene la capacidad de mantener el ciclo celular del hospedero después de infectada y previene la apoptosis.	Revisión	166
In vitro	Defectos en el centrosoma, causando defectos en la segregación	Microscopia	167

OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar los cambios en la dinámica de la carga viral de los tipos de VPH 16, -18, -31, -33, -45 y -58, en presencia o no de *Ct* en una cohorte de mujeres Colombianas.

Objetivos Específicos:

- Describir las características sociodemográficas de las mujeres participantes.

- Establecer la tasa de infección de *Ct* en mujeres que no inician con infección por VPH.

- Determinar la dinámica de la carga viral de seis tipos de VPH y los factores de riesgo asociados en presencia o no de *Ct.*

METODOLOGIA

Población de estudio y consideraciones éticas.
Este es un estudio de cohorte retrospectivo llevado a cabo entre el año 2007 al 2010, el estudio fue realizado por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia y aprobado por los comités de ética de cada uno de los tres centros hospitalarios, las mujeres asistieron voluntariamente entre abril del 2007 y marzo de 2010 y firmaron el consentimiento en cada una de las visitas realizadas, los consentimientos de menores de 18 años requirieron asentimiento y fueron firmados por un tutor responsables.

Las mujeres incluidas en el estudio asistieron a tres centros médicos asistenciales localizados en diferentes ciudades de Colombia; el Hospital San Juan Bautista en la ciudad de Chaparral, localizada en el departamento del Tolima; Nuevo Hospital San Rafael Girardot, ubicada en el departamento de Cundinamarca y el Hospital de Engativá Nivel II en Bogotá, Distrito Capital de Colombia.

Como criterio de inclusión, las mujeres debían tener mínimo tres seguimientos, con un periodo de tiempo de recolección de 6 meses entre muestras (± 3 meses), en cada visita se realizó una encuesta donde se solicitababa información sociodemográfica (edad, origen, raza, ingresos mensuales, nivel educativo) y posibles factores de riesgos como hábitos de fumar, edad de su primera relación sexual, numero de compañeros sexuales, método anticonceptivo usado, número de abortos, presencia de la menopausia, infecciones de transmisión sexual, estos datos son suministrados por las mujeres y con la información obtenida en la línea de base se realiza los análisis sociodemográficos y de riesgo de la población (44, 134).

Los datos socio-demográficos y de comportamiento sexual de la población descritos para el estudio se reportan según los datos obtenidos al comienzo del seguimiento (línea de base) (170), y la distribución se determinó de acuerdo al tipo de infección por VPH presente en las muestras: VPH negativa, infección única definida como infección por un único tio de VPH e infección múltiple definida como la infección simultánea por más de un tipo de VPH.

Obtención de las muestras, procesamiento y análisis molecular.

A las mujeres que asistieron a los programas de P&P de las instituciones participantes y que aceptaron voluntariamente participar en el estudio, se les tomaron dos muestras; la primera correspondió al test de Papanicolaou y permitió identificar el estado del cérvix a nivel citológico (siendo estos hallazgos confirmados por colposcopia); una segunda muestra fue tomada, conservada en etanol al 95%, esta muestra fue empleada para realizar la identificación de *Ct*, la detección genérica de VPH y la cuantificación de la carga viral de seis tipos virales (VPH-AR-16, -18, - 31, - 33, -45, -58) (168).

Tipificación del VPH

Para la detección de VPH se llevó a cabo una PCR convencional, se usaron dos sets de cebadores genéricos dirigidos al gen *L1*, el set de cebadores GP5+/6+ tiene la secuencia directa TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC y reversa GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC (5'–3') con un producto amplificado de 150 pb, y la secuencia de los cebadores MY09/11 corresponde a forward CGTCCMARRGGAWACTGATC y reverse GCMCAGGGWCATAAYAATGG con un producto amplificado de 450 pb (169).

Carga viral

En aquellas muestras que por la PCR genérica se detectó la presencia viral, se les realizó La identificación y cuantificación de 6 tipos de VPH (VPH-AR-16, -18, - 31, - 33, -45, - 58), por medio de PCR en tiempo real (qPCR) empleando cebadores y sondas Taqman, los cebadores empleados fueron dirigidos hacia las regiones E1, E6, E7; como normalizador fue empleado el gen *Human hydroxymethylbilane synthase* (*HMBS*).

Las condiciones de estandarización y corrido de la qPCR se llevo a cabo siguiendo protocolos descritos previamente por nuestro grupo de investigación (Tabla 7 y 8), la estandarización qPCR se realizó con diluciones seriadas del plásmido de cada tipo viral, y el gen *HMBS*, desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94ºC, seguido de 30 ciclos de amplificación durante 10 segundos a 94ºC y 30 segundos a 53,7ºC. La desnaturalización inicial del VPH-16 fue seguida por 30 ciclos de PCR durante 30 segundos a 54ºC y 30 segundos a 94ºC.

Tabla 7. Cebadores empleados en la qPCR (Tomado de soto y colb. 2014)

Gen	Tipo viral	Cebador	Secuencia cebadores (5' - 3')	Tm (ºC)	Longitud del producto (pb)	Número de moléculas ADN viral	Reacción PCR	Sonda	Quencher
E7	VPH-16	D	AGCTCAGAGGAGGAGGAT	54	78	1.43x10^12	R1	FAM	ZEN/IBFQ
		R	GGTTACAATATTGTAATGGGCTC						
E1	VPH-18	D	CATTTTGTGAACAGGCAGAGC	53.7	76	1.19x10^12	R2	Cy5	IBRQ
		R	ACTTGTGCATCATTGTGGACC						
E6	VPH-31	D	ACGATTCCACAACATAGGAGGA	53.7	81	1.35x10^12	R2	HEX	ZEN/IBFQ
		R	TACACTTGGGTTTCAGTACGAGGT						
E7	VPH-33	D	ATTAAGTGACAGCTCAGATGA	53.7	124	1.86x10^12	R3	FAM	ZEN/IBFQ
		R	ACATAAACGAACTGTGGTGTT						
E1	VPH-45	D	CCATTTGTGAACAGGCAGAGC	53.7	80	1.59x10^12	R3	Cy5	IBRQ
		R	CAACACCTGTGCATCATTCTGA						
E7	VPH-58	D	CGAGGATGAAATAGGCTTGG	53.7	109	1.23x10^12	R4	HEX	ZEN/IBFQ
		R	ACACAAACGAACCGTGGCGT						
HMBS		D	GCCTGCAGTTTGAAATCAGTG	53.7	119	1.98x10^12	R4	FAM	ZEN/IBFQ
		R	CGGGACGGGCTTTAGCTA						

Abreviaciones: D y R: directo y reverso. *Tm:* temperatura melting; VPH: Virus del Papiloma Humano; HMBS: Hydroxymethylbilane synthase; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; FAM (6-carboxyfluorescein); Cy5: FluoroLink; mono reactive dye Cy5; HEX: hexachlorofluoresceine; ZEN/IBFQ: ZEN and Iowa Black FQ; IBRQ: Iowa Black RQ.

Se obtuvieron diluciones seriadas de cada plásmido obtenido 1:10 (10^6-10^{11}copias).

La ecuación 1, permitió determinar el número de moléculas de ADN.

Ecuación 1. Número de copias de ADN viral.

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad ADN (ng)} * 6.022\text{x}10^{23}(\text{número/mol})}{\text{Longitud producto (pb)} * 1\text{x}10^{9}(\text{ng/g}) * 650\ (\text{g/mol de pb})}$$

6.022x1023 moléculas/mol: Número de Avogadro. 650 Daltons: peso medio de un par de bases (pb). Se multiplica por 1*109, para convertir a ng y luego por la cantidad de ADN cuantificado (ng).

Se construyeron curvas de calibración para el gen control y para cada tipo viral, se analizó cada muestra para *HMBS*, VPH-16, -18, -31, -33, -45 y -58. Se amplificó el gen constitutivo *HMBS* en todas las muestras para determinar el número de copias virales por célula y verificar la integridad del ADN.

Tabla 8. Concentraciones de los diferentes reactivos empleados para la PCR en tiempo real.

Tipo Viral	Buffer (x)	$MgCl_2$ (mM)	dNTP (A,T,C,G) (nM)	Cebador (D) (nM)	Cebador (R) (nM)	Enzima Mango Taq DNA polimerasa (U/µL)	Sonda (nM)
VPH-16	1	1.5	250 c/u	250	250	1.5	500
VPH-18	1	2	275 c/u	500	500	1.5	500
VPH- 31	1	2	275 c/u	250	250	1.5	500
VPH-33	1	1.75	275 c/u	250	250	1.5	500
VPH-45	1	1.75	275 c/u	500	500	1.5	500
VPH-58	1	1.87	250 c/u	500	500	1.5	500
HMBS	1	1.87	250 c/u	500	500	1.5	200

Abreviaciones: mM: Milimolar; nM: Nanomolar; A: Adenina; T: Timina; C: Citosina; G: Guanina; D y R: directo y reverso; U/µL: Unidades por microlitro.

Todas las reacciones de PCR en tiempo real, contenían 2 µL de ADN humano y agua libre de ADN para completar el volumen final.

La PCR en tiempo real fue corrida en platos de 96 celdas, donde se incluyeron 6 puntos de diluciones seriadas de plasmídico para cada tipo viral y *HMBS*. Para descartar la contaminación con ADN, fueron incluidos un control negativo y un NTC (no template control).

Ecuación 2: Se cuantificó de la carga viral absoluta, y relativa para cada tipo viral. Para la carga viral relativa, se utilizó como gen de referencia el gen *HMBS*. De esta manera, se normalizó la carga viral con relación a la cantidad de ADN humano presente en cada muestra,

Ecuacion 2: Cuantificacion carga Viral relativa.

$$\text{Carga Viral (copias virales/célula)} = \frac{\text{Número de copias virales}}{\text{Número de copias } HMBS/2}$$

Detección C. trachomatis

Para la amplificación de *Ct* se realizó PCR convencional, con dos juegos de cebadores diferentes, los cuales iban dirigidos a la región pLGV440 del plasmido críptico de *Ct*, los cebadores se denominan KL5/KL6 cuya secuencia corresponde a forward 5'- TTT GCC TTA ACC CCA CCA TT-3' y reverse 5'- CGT CCT TCC TAA AAG AGC TA -3' amplificaron un fragmento de 350pb, y el otro juego de cebadores denominado KL1/KL2 la secuencia corresponde a forward 5'- TCC GGA GCG AGT TAC TAA GA -3' y reverse 5'- AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT -3' y el producto amplificado es de 241 pb (Tabla 9). Las condiciones de la PCR fueron previamente descritas por el grupo de investigación.

Tabla 9. Cebadores usados en la PCR convencional para identificación de *Chlamydia trachomatis.*

REGIÓN	CEBADORES	SECUENCIA
pLGV440	KL5	5'- TTT GCC TTA ACC CCA CCA TT-3'
	KL6	5'- CGT CCT TCC TAA AAG AGC TA -3'
pLGV440	KL1	5'- TCC GGA GCG AGT TAC TAA GA -3'
	KL2	5'- AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT -3'

Análisis estadísticos

Para este estudio se definió infección por *Ct* a un hallazgo positivo con alguno de los dos juegos de cebadores en cualquiera de las visitas, se definió depuración como un hallazgo negativo después de haber presentado en una visita previa infección por *Ct*, y la persistencia se definió como dos hallazgos positivos en visitas consecutivas.

La infección por VPH se definió como el resultado positivo por qPCR en cualquier visita,

se consideró persistencia de la infección como la detección del mismo tipo de VPH en al menos dos visitas consecutivas, la depuración de la infección se determinó como la ausencia de detección de cada tipo en dos muestras consecutivas, tomadas con intervalos de 3 a 9 meses posterior a una muestra positiva, la redetección de la infección, se definio como la positividad para el mismo tipo viral luego de la no detección de éste.

En aquellas muestras donde se presentan hallazgos positivos tanto de de *Ct* como de VPH simultáneamente, se definió como coexistencia. Se definieron las infecciones únicas cuando en la detección molecular solo se reporta la presencia de un tipo viral de los seis analizados y infecciones múltiples se definieron por la presencia simultánea de más de un tipo de VPH.

Para la evaluación de los análisis estadísticos de este estudio se usó el software STATA 14®. Diferencias en las ditribuciones de evaluaron mediante prueba de Chi2 o exacta de Fisher, según los datos; las variables cuantitativas se reportaron con medianas y sus respectivos rangos intercuartílicos (IQR). Diferencias entre medias se comprararon con los estadístico Mann–Whitney *U* o Kruskal-Wallis dependiendo del número de grupos a comparar.

El modelo de regresión multivariada incluyó el uso de una ecuación de estimación generalizada (GEE) en los datos de seguimiento de las mujeres para analizar los valores de carga de tipo viral, teniendo en cuenta el origen longitudinal de los datos y las medidas N repetidas para la variable dependiente. El modelo de regresión trató la infección por cada tipo de VPH-AR como un resultado independiente (es decir, se realizó un modelo para cada tipo viral).

Se tomó el logaritmo de la carga viral normalizada (variable dependiente) para garantizar la idoneidad de la GEE, dando coeficientes de correlación que representan el cambio esperado en el registro de la media de la carga viral para cada cambio en cada co-variable. La estructura de autocorrelación se determinó para cada tipo mediante la evaluación preliminar de matrices de correlación de medidas repetidas. Una matriz de correlación no estructurada fue el método más eficiente para ajustar los datos, ya que no hubo un patrón de regresión automática o independencia.

La carga viral de cada tipo se propuso como una variable dependiente para dicho análisis y aquellos con coeficientes de correlación significativos en el modelo bivariado como variables independientes. El cambio en la carga viral normalizada para cada tipo se evaluó mediante la correlación de la presencia de co-variables que representan factores de riesgo; Los valores fueron interpretados de acuerdo a los coeficientes resultantes del modelo.

Para evaluar la asociación entre aparición de infección por *Ct* y VPH y los 6 tipos de VPH se utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox, estos fueron ajustados por las variables ciudad, edad, primera relación sexual, número de compañeros sexuales, método de planificación, gestaciones.

RESULTADOS

Características sociodemográficas

El estudio de seguimiento incluyó 310 mujeres, las cuales participaron voluntariamente durante un periodo de tres años, las participantes aportaron al menos 3 seguimientos (adicional a la toma en línea base), con una diferencia de 6 meses entre cada visita (±3 meses). El 22.9% (n= 71) de la población muestreada alcanzó a tener un cuarto seguimiento, es decir proporcionaron información para 5 visitas. todas las muestras presentaron resultados positivos en la amplificación de *Human hydroxymethylbilane synthase* (HMBS).

Para este estudio la media de la edad de la población fue de 41,8 años (DE: 11,09, intervalo entre 17-72 años), la étnia de las mujeres fue principalmente mestiza 97,7% (n= 303: IC95%: 1,95-1,99), la mayor parte de la población provenian de la ciudad de Girardot 67,4% (n= 209: IC95%: 0,66-0,78 95%). Diferencias estadísticas se encontraron en algunas de las categorias evaluadas y se m8uestran en la tabla 10.

Tabla 10. Distribución sociodemográfica y de factores de riesgo de acuerdo con los diferentes tipos infección por VPH**.**

	VPH Negativo		**Infección Única**		**Infección múltiple**		***Valor-P***
Características	n	%	n	%	n	%	
Edad en años							
<30	12	27,,3	10	22,,7	22	50,,0	*0,130*
30-40	31	37,4	8	9,6	44	53,0	
>40	46	25,1	34	18,6	103	56,3	
Origen							
Bogotá	23	24,7	21	22,6	49	52,7	*0,434*
Girardot	63	30,1	30	14,4	116	55,5	
Chaparral	3	37,5	1	12,5	4	50,0	
Étnia							
Mestizo	86	28,4	52	17,2	165	54,4	***0,903***
Negro	2	40,0	0	0	3	60,0	
Indígena	1	50,0	0	0	1	50,0	
Ingresos mensuales							
≤ mínimo	78	28,6	43	15,7	152	55,7	*0,366*
> mínimo	11	29,7	9	24,3	17	46	
Nivel educativo							
Analfabeta	0	0	1	14,3	6	85,7	***0,043***
Primaria	32	23,4	25	18,2	80	58,4	
Secundaria	50	36,0	17	12,2	72	51,8	
Técnica	4	25,0	5	31,3	7	43,7	
Profesional	3	27,3	4	36,4	4	36,4	
Hábito de fumar							
No	63	27,5	43	18,8	123	53,7	*0,267*
Si	26	32,1	9	11,1	46	56,8	
Edad de la primera relación sexual, En años							
≤18	53	29,1	28	15,4	101	55,5	*0,737*
>18	36	28,1	24	18,8	68	53,1	
Numero de compañeros sexuales							
1	39	27,5	25	17,6	78	54,9	*0,910*
2	29	27,9	16	15,4	59	56,7	
≥3	21	32,8	11	17,2	32	50,0	
Método anticonceptivo							
Ninguno	30	24,8	25	20,7	66	54,5	*0,237*
Hormonal	12	33,3	3	8,3	21	58,4	
Cirugía	37	35,6	14	13,5	53	50,9	
Barrera	10	20,4	10	20,4	29	59,2	
Embarazos							
Ninguna	5	50,0	2	20,0	3	30,0	***0,001***
1-2	54	22,9	39	16,5	143	60,6	
≥3	30	46,9	11	17,2	23	35,9	

Historia de abortos							
No	51	31,1	28	17,1	85	51,8	*0,557*
Si	38	26,0	24	16,4	84	57,6	
Menopausia							
No	76	29,0	46	17,6	140	53,4	*0,596*
Si	13	27,1	6	12,5	29	60,4	
Infecciones de trasmisión sexual							
No	55	24,6	37	16,5	132	58,9	***0,021***
Si	34	39,5	15	17,5	37	43,0	
Infección por Ct							
Negativo	65	29,2	38	17,0	120	53,8	*0,924*
Positivo	24	27,6	14	16,1	49	56,3	

Hallazgos histológicos

En cuanto a los hallazgo citológicos de la línea base de la población (n= 310), se reportaron 295 resultados para el test Papanicolau los cuales se clasificaron de acuerdo al sistema Bethesda, con un 92,2% (n= 272; IC95%: 88,5-94,9) resultados negativos para lesión cervical y 7,8% (n=23, IC95%: 5,0-11,4) con alguna anormalidad cervical, Para el hallazgo ASCUS se reportaron 10 mujeres (3,3%; IC95%: 1,6-6,1) y con LEI-BG 13 (4,4%; IC95%: 2,3-7,4). A lo largo de los seguimientos se observó una disminución del número de mujeres con reporte anormalidad cervical siendo LEI-BG la anormalidad de mayor aparición en la población (Tabla 11).

Adicional al test de Papanicolau, se obtuvieron los resultados del estado del cérvix a través del examen de colposcopia en 221 mujeres, de los cuales un 78,2% (n= 173; IC95%: 72,2-83,5) fueron reportados como negativos para lesión, un 21,8% (n= 48; IC95%: 16,4-27,2) presentó algún tipo de anormalidad (Tabla 11), siendo LEI-BG el 21,4% (n= 41; IC95%: 16,0-27,2) y LEI-AG el 0,4% (n= 1; IC95%: 0,01-2,4). Al igual que en citología a través del seguimiento se observó una disminución en los hallazgos anormales colposcópicos, esta distribución fue estadísticamente significativa (p = 0,001; prueba exacta de Fisher) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de los hallazgos citológicos, colposcópicos, VPH y *C. trachomatis* de acuerdo con el número de seguimiento.

	Línea de base		*Primer seguimiento*		*Segundo seguimiento*		*Tercer seguimiento*		*Cuarto seguimiento*		
Hallazgos Citológicos	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	*Valor-p*
Normal	272	92,2	278	95,2	279	95,2	274	95,1	69	100	*0,077*
Anormal	23	7,8	14	4,8	14	4,8	14	4,9	0	0	
Hallazgos Colposcópicos											
Normal	173	78,3	225	88,6	253	95,1	248	96,1	61	96,8	*0,001*
Anormal	48	21,7	29	11,4	13	4,9	10	3,9	2	3,2	
Detección-VPH											
Negativo	89	28,7	72	23,2	64	20,6	65	21,0	18	25,4	*0,119*
Positivo	221	71,3	238	76,8	246	79,4	245	79,0	53	74,6	
VPH-16											
Negativo	153	49,4	264	85,2	237	76,5	200	64,5	23	32,4	*0,001*
Positivo	157	50,6	46	14,8	73	23,5	110	35,5	48	67,6	
VPH-18											
Negativo	192	61,9	163	52,6	168	54,2	209	67,4	67	94,4	*0,001*
Positivo	118	38,1	147	47,4	142	45,8	101	32,6	4	5,6	
VPH-31											
Negativo	228	73,5	150	48,4	162	52,3	203	65,5	47	66,2	*0,001*
Positivo	82	26,5	160	51,6	148	47,7	107	34,5	24	33,8	
VPH-33											
Negativo	296	95,5	258	83,2	265	85,5	220	71,0	62	87,3	*0,001*
Positivo	14	4,5	52	16,8	45	14,5	90	29,0	9	12,7	
VPH-45											
Negativo	214	69,0	214	69,0	211	68,1	220	71,0	59	83,1	*0,148*
Positivo	96	31,0	96	31,0	99	31,9	90	29,0	12	16,9	
VPH-58											
Negativo	210	67,7	192	61,9	195	62,9	246	79,4	64	90,1	*0,001*
Positivo	100	32,3	118	38,1	115	37,1	64	20,6	7	9,9	
C, trachomatis											
Negativo	223	71,9	230	74,2	206	66,5	201	65,0	45	63,4	*0,052*
Positivo	87	28,1	80	25,8	104	33,5	108	35,0	26	36,6	
Coinfección											
Negativo	141	45,5	120	38,7	115	37,1	146	47,1	42	59,2	*0,002*
Positivo	169	54,5	190	61,3	195	62,9	164	52,9	29	40,8	
Coexistencia											
Negativo	247	79,7	245	79,0	214	69,0	210	68,0	50	70,4	*0,001*
Positivo	63	20,3	65	21,0	96	31,0	99	32,0	21	29,6	

Distribución VPH

En cuanto a la distribución de la infección por VPH en cada uno de los seguimientos, todos los valores superon el 70%, siendo el seguimiento 2 el de mayor porcentaje (79,4%) de deteción viral, seguido por el seguimiento 3 (79%), mientras que la línea de base presento los niveles bajos del estudio (71,3%) (Figura 14, Tabla 11).

En cuanto a la distribución de los tipos de VPH, al evaluar en la totalidad de las muestras se encontró el tipo VPH-31 fue el de mayor frecuencia (39.8%; IC95%: 37.1-42.4), mientras que VPH-33 fue el de menor aparición (16.0%; IC95%: 14.0-18.1) en las muestras analizadas (Figura 14, tabla 11). Para la Línea base el tipo viral de mayor frecuencia fue VPH-16 (50.6%; 95%IC: 44.9-56.3), seguido por VPH-18 (38.1%; 95%IC: 32.6-43.7), VPH-58 (32.2%; 95%IC: 27.0-37.7), VPH-45 (31.0%; 95%IC: 25.8-36.4), VPH-31 (26.5%;95%IC: 21.6-31.7) y finalmente VPH-33 (4.5%; 95%IC: 2.4-7.4); en cuanto a la distribución de los tipos virales a traves del seguimiento, los resultados mostraron que en las dos siguientes visitas, VPH-31 fue el de mayor frecuencia (seguimiento 1: 51.6% y seguimiento 2: 47.7%; p= 0.001); seguido por HPV-18 (seguimiento 1: 47.4% and seguimiento 2: 45.8%; p= 0.001), para los seguimientos restantes VPH-16 nuevamente se encontró como el de mayor aparición (seguimiento 3: 35.5% and seguimiento 4: 67.6%; p= 0.001) (Figura 14, tabla 11).

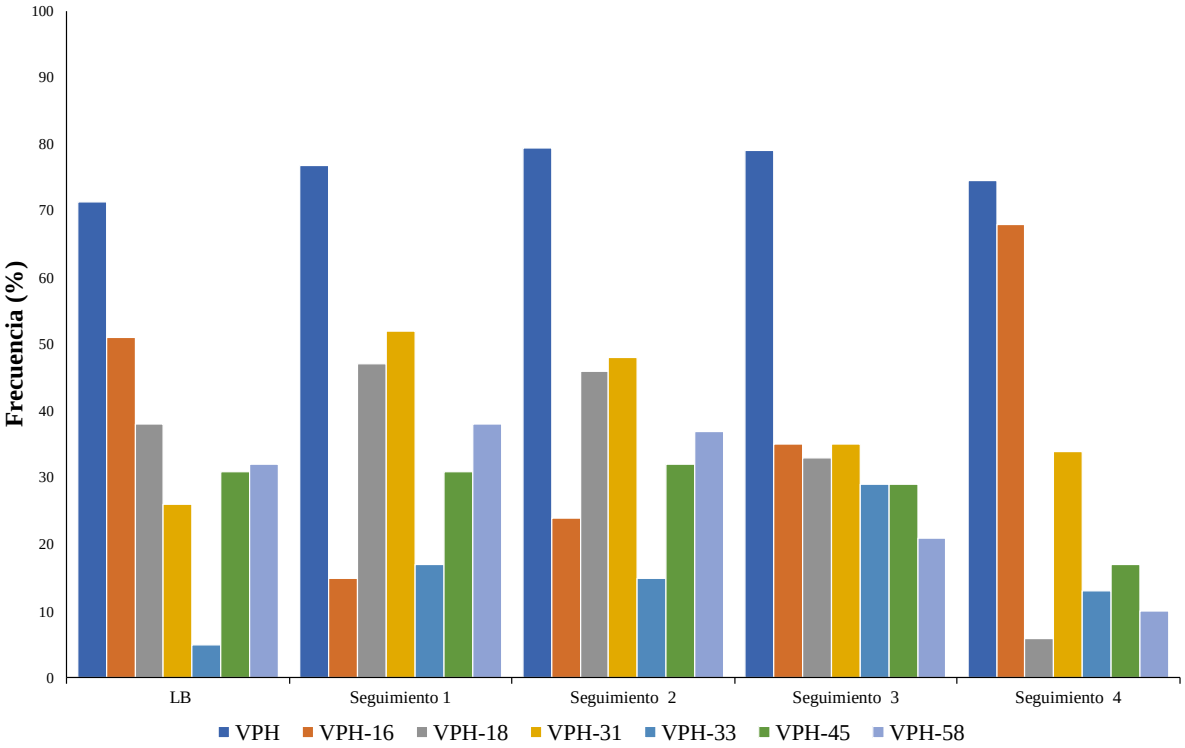

Figura 14. Porcentaje de VPH y distribución tipo especifica de 6 tipos de VPH-AR en la linea de base y a traves de los seguimientos.

PRESENCIA DE C*hlamydia trachomatis*

En cuanto a la detección de *Ct* en cada seguimiento, los resultados mostraron que para la visita de línea de base, hay un porcentaje de infección de 28,1% (n=87; IC95%: 23,1-33,4) (Tabla 12 y Figura 15), en el seguimiento 1 hay una disminución de mujeres con infección bacteriana (25,8%), incrementando la detección a través de los seguimientos, siendo en la última visita la que mayor frecuencia de *Ct* reportó (36,6%; p= 0,052; Prueba de Chi^2) (Tabla 12, Figura 15).

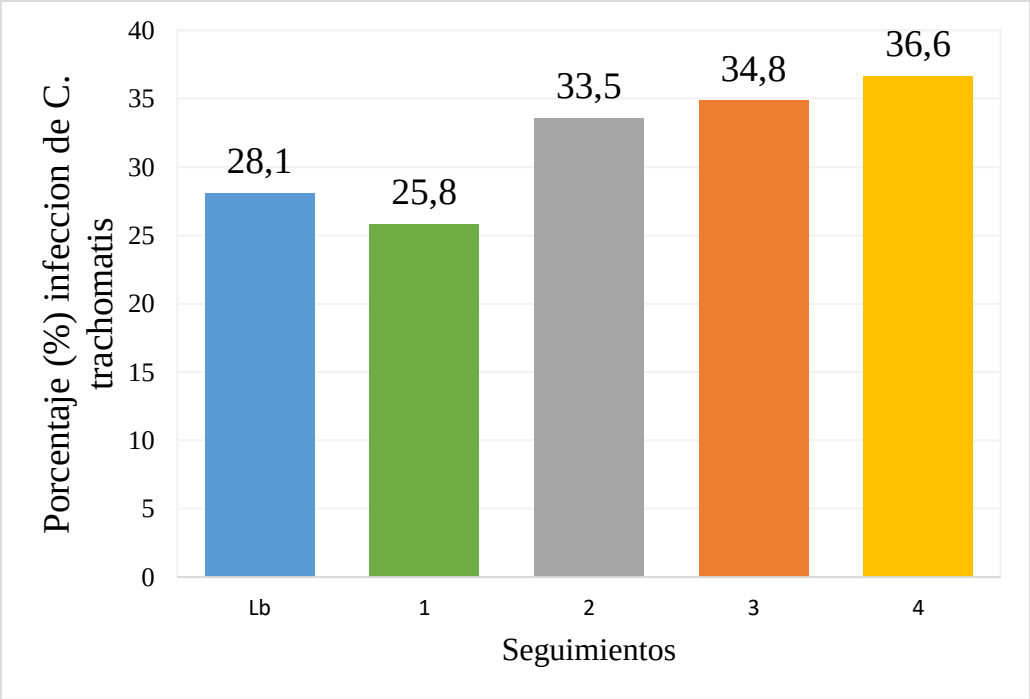

Figura 15. Porcentaje de mujeres infectadas por *Ct* durante el estudio. LB: línea base

Las participantes aportaron 1,403 meses al estudio (aproximadamente 2 años). El 28,7% mujeres (n=89) iniciaron el estudio (línea de base) sin infección por VPH y *Ct*, a lo largo del estudio determinó que la tasa de infección por *Ct* fue de 6,97 por cada 100 mujeres por mes (95%IC: 4,87-9,98 Kaplan Meier) y para los 12,4 meses, la mitad de la población ya había adquirido la infección (Figura 16).

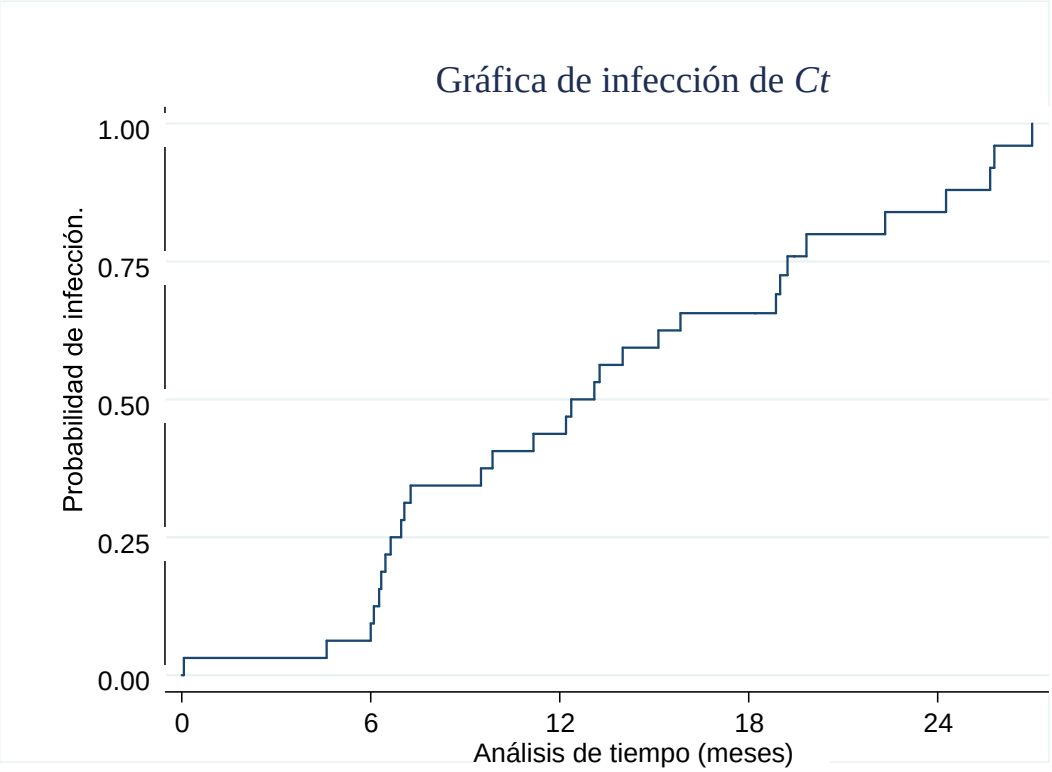

Figura 16. La probabilidad de riesgo de que una mujer sin VPH en línea de base adquiera la infección por *C. trachomatis* durante las visitas**.**

Al evaluar la presencia simultánea de *Ct* y VPH (coexistencia) los resultados mostraron que del total de la muestras (n= 1.310) el 26.2% (n= 344; IC95%: 23.8-28.7) presentaron este coexistencia, siendo mayor en aquellas mujeres que presentaban coinfecciones (múltiples tipos de VPH) comparadas con aquellas con infecciones por un único tipo de VPH (34.8% y 32.2%, respectivamente; p= 0.001), a través de los seguimientos la coexistencia fue de 20,3 % en linea de base, este valor va aumentando en cada seguimiento, siendo el seguimiento 3 (32%) el más alto (Tabla 11). En cuanto a la la coexistence de acuerdo al tipo viral, los resulatdos mostraron que la ocurrida con VPH-16 fue la de mayor aparición (36.7%; 95%IC: 27.6-36.6), mientras que la coexistence con VPH-45 la menor (27.7%; 95%IC: 23.3-32.4), otras coexistencias se muestran en la figura 17.

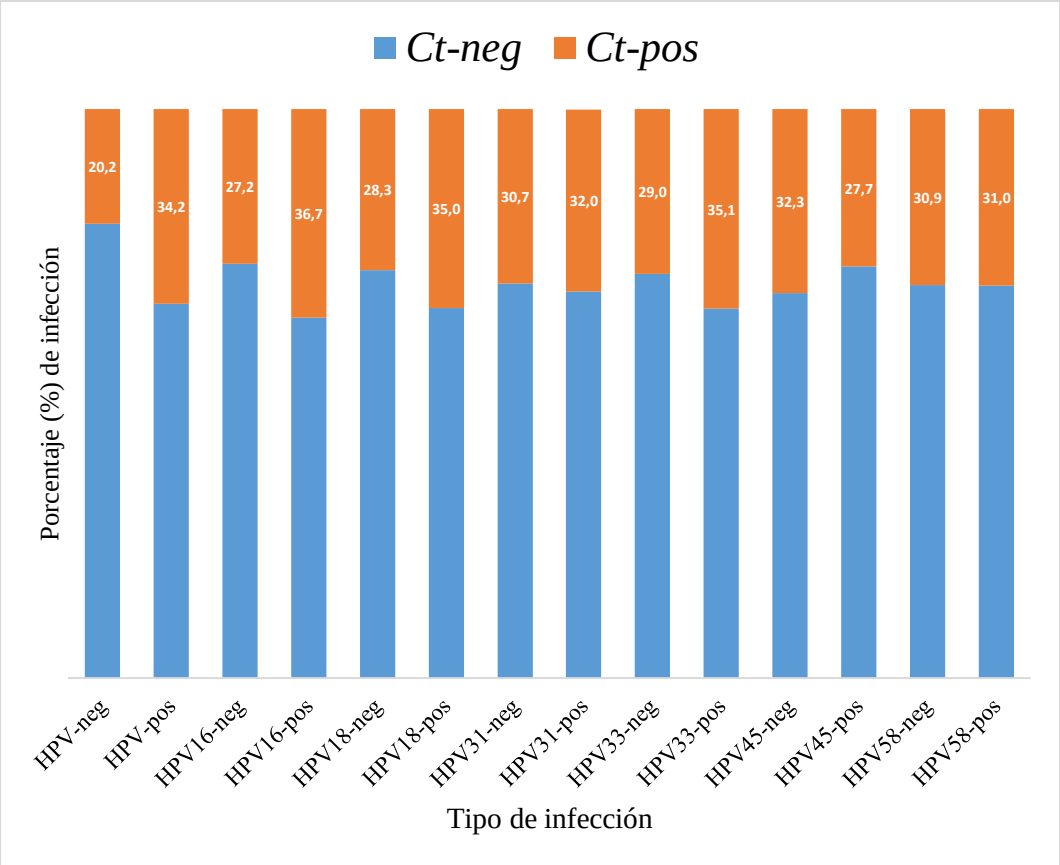

Figura 17: Distribución VPH en presencia o ausencia de *Ct.*

Dinámica de la carga viral de VPH de acuerdo al estado de infección por *Chlamydia trachomatis.*

Se evaluó el comportamiento de la carga viral normalizada de los seis tipos de VPH en presencia de *Ct* (Tabla 12), a nivel general los resultados mostraron una mayor carga viral (mediana: 424, IQR: 19300) en aquellas mujeres con infecciones por *Ct* comparadas con aquellas sin infección bacteriana (mediana: 264, IQR: 18599); en cuanto a los tipos virales los valores de la mediana de la carga se encontraron entre 10^{-1} a 10^{4} copias. Al analizar la carga viral tipo específica en mujeres con presencia de *Ct* los resultados mostraron para los tipos de VPH-16, -18, -31 y -45, cargas virales mayores a las encontradas en mujeres sin presencia de esta bacteria, siendo para el tipo viral VPH-45 el de mayor diferencia (median: 119 and 14 respectivamente), en contraste para VPH-33 y -58 cargas virales mayores fueron encontradas en mujeres sin *Ct*; no obstante diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la carga viral de acuerdo a la presencia de *Ct* se encontraron solo para VPH-18 (Mann–Whitney *U*, p= 0.0030) (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de la carga viral total y de acuerdo con la presencia de *C. trachomatis*.

		VPH	**VPH-16**	**VPH-18**	**VPH-31**	**VPH-33**	**VPH-45**	**VPH-58**
***C, trachomatis* NEGATIVA**	***n* de infecciones (%)**	660 (65,8)	295 (67,9)	333 (65,0)	330 (63,3)	145 (69,1)	284 (72,3)	262 (64,8)
	CV-Normalizada							
	Media	264	0,4	3	95	3640	14	0,19
	[IQR]	[18599]	[2,2]	[1,1]	[10099]	[101864]	[28267]	[5,9]
***C, trachomatis* POSITIVA**	***n* de infectiones (%)**	343 (34,2)	139 (32,1)	179 (35,0)	191 (36,7)	65 (30,9)	109 (27,7)	142 (35,2)
	CV-Normalizada							
	Median	424	1	8,4	140	461	119	0,14
	[IQR]	[19300]	[644]	[13499]	[39699]	[94440]	[9603]	[0,53]

CV: Carga Viral; IQR: rangos intercuartílicos

El mapa de calor de la figura 19 muestra el comportamiento de las medianas de la carga viral normalizada para los tipos virales de VPH a lo largo del seguimiento, teniendo en cuenta además la infección por *Ct*. Los resultados mostraron que en mujeres con *Ct*, VPH 33, obtuvo la carga viral a través del tiempo, mientras que la carga más baja en todas las visitas fue para VPH-58,. Por otra parte, en mujeres sin infección por *Ct*, el incremento mayor en la carga viral a traves del tiempo , fue para VPH 18, mientras que VPH 58 también obtuvo en este grupo los menores valores en todas las visitas (Figura 19). Diferencias en la distribución de las medianas a través de los seguimientos de acuerdo a la presencia de *Ct* se evaluarón mediante el estadístico Kruskal-Wallis, los resultados mostraron diferencias significativas para VPH-16 en mujeres *Ct* positivo, VPH-18 independiente de la presencia o no de la infección bacteriana y VPH-58 en *Ct* negativo (Figura 18).

	***Ct*- POSITIVO**						***Ct*- NEGATIVO**					
	Seguimiento						*Seguimiento*					
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*p*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*p*
VPH 16	**0,23**	**10**	**0,45**	**1**	**2**	***0,0104***	0,2	9	4	0,13	0,73	*0,1235*
VPH 18	**0,39**	**4,5**	**18**	**20**	**0,93**	***0,0009***	**0,44**	**2**	**7**	**35**	**8280000**	***0,0058***
VPH 31	8,79	673	16	16	1	*0,1033*	119	199	413	82	87	*0,4833*
VPH 33	10200	8060000	1560000	3640	ND	*0,0639*	3,61	187	40053	245	7832	*0,2364*
VPH 45	3	3	193000	4525	8,91E-4	*0,4031*	**0,17**	**34,5**	**71**	**154**	**4305**	***0,0001***
VPH 58	0,40	0,18	0,45	1,51E-3	8,08E-8	*0,0679*	**0,39**	**0,13**	**0,37**	**0,010**	**2,21E-4**	***0,0119***

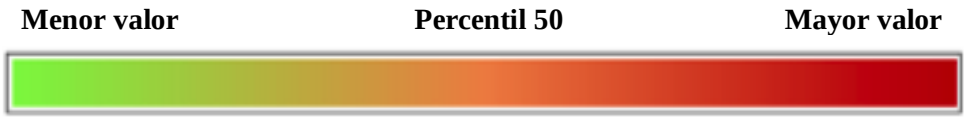

Figura 18. Mediana de la carga viral de los tipos de VPH presencia o ausencia de *Ct.* Valores en negrilla son estadíaticamente significativos

A través del modelo estadístico de GEE se evaluó la asociación entre los factores de riesgo y la carga viral (disminución o incremento) para cada tipo viral evaluado. Los resultados mostraron que para la variación en la carga viral de VPH-16, se encontró, que pertenecer a una ciudad diferente a la capital (Bogotá) (coef: 1,72: 95%IC: (-)2,60-(-)0,84; p= 0,000), ser afrodescendiente (coef: 4,903: 95%IC: (-)8,26-(-)1,55; p= 0,004), usar un método de planificación familiar hormonal (coef:1,640: 95%IC: (-)3,03-(-)0,25; p= 0,020) y estar en la etapa de la menopausia (coef: -2,539: 95%IC: (-)4,22-(-)0,85; p=0,003), redujeron la carga viral de VPH-16 en varias unidades logarítmicas (Tabla 13).

El incremento de la carga en este tipo viral VPH-16 fue modulado, en este estudio por el número de gestaciones ya que haber tenido 1 o 2 hijos aumentó en más de 4 unidades logarítmicas la carga viral. El reporte de haber tenido 1 hijo lo aumentó en 4,434 unidades logarítmicas (95%IC: 0,85 a 8,01; p= 0,015) y para 2 en 4,313 unidades logarítmicas (95%IC: 0,54 a 8,08; p= 0,025) (Tabla 13).

Para el caso de VPH-18 las variables que modularon su carga fueron: en el aumento el reporte de más de 2 gestaciones en 3,816 unidades logarítmicas (95%IC: 0,22 a 7,40 IC p= 0,037) (Tabla 13). Las variables analizada tales como: número de gestaciones (1 y 2 hijos: coef: 5,338: 95%IC: 0,07 a 10,5; p= 0,047) y tener más de dos hijos (coef: 7,290: 95%IC: 1,24 a 13,34; p= 0,018) (Tabla 13).

Se observó para VPH-45 el incremento en 1,60 unidades logarítmicas de la carga en aquellas mujeres de la población que reportaron haber tenido 2 compañeros sexuales (Tabla 14). En cuanto la disminución dela carga para este tipo viral, el método de planificación de barrera tuvo un impacto estadísticamente significativo en la disminución de -2,07 unidades logarítmicas (95%IC: (-)3,35-(-)0,79; p= 0,002) de la carga viral de VPH-45. Luego de aplicar la estimación estadísica, ajustada por las demás variables tenidas en cuenta, no se identificó una clara modulación directa de la carga viral por la presencia de *Ct* (Tabla 14).

Finalmente, se analizo el riesgo de infección por *Ct* para cada tipo viral, los resultados mostraron que las mujeres con VPH presentaron mayor riesgo (HR= 2,06) en la adquisición de *Ct*, a nivel tipo especifico esta asociación se encontró para VPH-31 (HR= 1,45) y VPH-58 (HR= 1,37) (Tabla 15).

Tabla 13. Estimación estadística generalizada (GEE) para VPH-16, 18 y -31

DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS		**MODELO PARA CADA TIPO DE VPH**								
Variable	*Categoría*	**VPH -16**			**VPH -18**			**VPH -31**		
		Coef.	**P**	**95%IC**	**Coef.**	**p**	**95%IC**	**Coef.**	**p**	**95%IC**
Ciudad	*Bogotá*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	otra	**(-)1,725**	**0,000**	**[-2,60 a -0,84]**	0,047	0,930	[-0,99 a 1,09]	0,050	0,926	[-1,01 a 1,11]
Edad		0,0315	0,233	[-0,02 a 0,08]	(-)0,019	0,556	[-0,08 a 0,04]	0,044	0,175	[-0,02 a 0,10]
Grupo étnico	*Mestizo*									
	Indígena	2,362	0,578	[-5,97 a 10,69]	(-)0,890	0,844	[-9,76 a 7,98]	1,331	0,725	[-6,07 a 8,73]
	Afrodescendientes	**(-)4,903**	**0,004**	**[-8,26 a -1,55]**	1,183	0,614	[-3,42 a 5,79]	(-)1,731	0,352	[-5,38 a 1,91]
Edad de la primera relación sexual	*<=18*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	>18	0,092	0,854	[-0,89 a 1,07]	(-)0,035	0,945	[-1,04 a 0,97]	(-)0,276	0,605	[-1,32 a 0,77]
Numero de compañeros sexuales	*Ninguno*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1									
	2	(-)0,252	0,645	[-1,32 a 0,82]	0,149	0,800	[-1,01 a 1,30]	(-)0,420	0,485	[-1,59 a 0,76]
	mas de dos	(-)0,940	0,175	[-2,29 a 0,42]	(-)0,781	0,246	[-2,10 a 0,54]	(-)0,370	0,598	[-1,74 a 1,01]
Método de planificación	*Ninguno*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hormonal	**(-)1,640**	**0,020**	**[-3,03 a - 0,25]**	1,024	0,272	[-0,80 a 2,85]	0,442	0,631	[-1,36 a 2,25]
	Barrera	(-)0,587	0,265	[-1,61 a 0,44]	0,157	0,773	[-0,91 a 1,23]	0,079	0,884	[-0,99 a 1,14]
Gestaciones	*Ninguna*									
	1-2	**4,434**	**0,015**	**[0,85 a 8,01]**	2,254	0,187	[-1,09 a 5,59]	2,405	0,112	[-0,56 a 5,37]
	>2	**4,313**	**0,025**	**[0,54 a 8,08]**	**3,816**	**0,037**	**[0,22 a 7,40]**	3,153	0,060	[-0,13 a 6,44]

Abortos	*No*									
	Si	(-)0,258	0,557	[-1,12 a 0,60]	(-)0,069	0,903	[-1,18 a 1,04]	0,157	0,778	[-0,93 a 1,25]
Chlamydia trachomatis	*No*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Si	(-)0,234	0,614	[-1,14 a 0,67]	0,894	0,094	[-0,15 a 1,94]	0,319	0,551	[-0,73 a 1,37]
Menopausia	No									
	Si	**(-)2,539**	**0,003**	**[-4,22 a -0,85]**	(-)0,494	0,572	[-2,21 a 1,22]	(-)0,450	0,625	[-2,25 a 1,35]

Tabla 14. Estimación estadística generalizada (GEE) para VPH-33, -45 y -58

DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS		MODELO PARA CADA TIPO DE VPH								
Variable	*Categoría*	**VPH-33**			**VPH-45**			**VPH-58**		
		Coef.	**P**	**95%IC**	**Coef.**	**p**	**95%IC**	**Coef.**	**p**	**95%IC**
Ciudad	*Bogotá*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	otra	0,541	0,638	[-1,71 a 2,79]	(-)0,126	0,859	[-1,52 a 1,27]	0,091	0,871	[-1,01 a 1,19]
Edad		(-)0,023	0,759	[-0,17 a 0,12]	0,024	0,614	[-0,070 a 0,12]	0,047	0,175	[-0,02 a 0,11]
Grupo étnico	*Mestizo*									
	Indígena	2,300	0,619	[-6,77 a 11,37]	4,786	0,192	[-2,41 a 11,98]	3,548	0,209	[-1,99 a 9,09]
	Afrodescendientes	(-)2,216	0,509	[-8,79 a 4,36]	3,254	0,082	[-0,42 a 6,93]	(-)1,51	0,318	[-4,8 a 1,45]
Edad de la primera relación sexual	*<=18*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	>18	(-)1,202	0,281	[-3,39 a 0,98]	0,561	0,416	[-0,79 a 1,91]	(-)0,522	0,330	[-1,57 a 0,53]
Numero de compañeros sexuales	*1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	(-)0,089	0,945	[-2,62 a 2,44]	**1,604**	**0,048**	**[0,02 a 3,19]**	(-)0,225	0,705	[-1,39 a 0,94]
	más de dos	(-)0,127	0,928	[-2,89 a 2,64]	(-)0,142	0,860	[-1,73 a 1,44]	(-)0,810	0,241	[-2,16 a 0,54]
Método de planificación	*Ninguno*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hormonal	0,496	0,791	[-3,17 a 4,16]	(-)0,060	0,961	[-2,46 a 2,34]	1,094	0,242	[-0,74 a 2,93]
	Barrera	(-)0,480	0,674	[-2,72 a 1,76]	**(-)2,068**	**0,002**	**[-3,35 a -0,79]**	0,620	0,274	[-0,49 a 1,73]
Gestaciones	*Ninguna*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1-2	**5,338**	**0,047**	**[0,07 a 10,59]**	(-)1,094	0,467	[-4,04 a 1,85]	2,117	0,093	[-0,35 a 4,59]
	>2	**7,290**	**0,018**	**[1,24 a 13,34]**	1,565	0,375	[-1,89 a 5,02]	2,376	0,099	[-0,45 a 5,20]
Abortos	*No*									
	Si	0,399	0,745	[-2,01 a 2,81]	0,524	0,485	[-0,94 a 1,99]	(-)0,109	0,849	[-1,23 a 1,01]
	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Chlamydia trachomatis	*Si*	(-)0,329	0,751	[-2,37 a 1,71]	(-)1,008	0,182	[-2,49 a 0,47]	0,078	0,883	[-0,96 a 1,11]
Menopausia	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Si	(-)0,679	0,754	[-4,93 a 3,57]	(-)0,812	0,437	[-2,86 a 1,23]	(-)0,664	0,489	[-2,54 a 1,21]

Tabla 15. Modelo Cox

	INFECCIONES POR *Ct*		
	HR	(IC 95%)	P
VPH			
Negativo	Referencia		
Positivo	**2,06**	**(1,46-2,89)**	**0,001**
VPH-16			
Negativo	Referencia		
Positivo	1,05	(0,81-1,38)	0,068
VPH-18			
Negativo	Referencia		
Positivo	1,27	(0,99-1,65)	0,057
VPH-31			
Negativo	Referencia		
Positivo	**1,45**	**(1,12-1,86)**	**0,004**
VPH-33			
Negativo	Referencia		
Positivo			
VPH-45	1,09	(0,78-1,53)	0,590
Negativo	Referencia		
Positivo	0,78	(0,59-1,03)	0,092
VPH-58			
Negativo	Referencia		
Positivo	**1,37**	**(1,05-1,78)**	**0,020**

[a]Hazard ratio (HR) ajustado por ciudad, edad, primera relación sexual, número de compañeros sexuales, método de planificación, gestaciones.

DISCUSIÓN

La asociación entre VPH y CC se encuentra claramente establecida y se ha avanzado considerablemente en su comprensión; sin embargo, el por qué sólo una fracción de las mujeres que cursa con infecciones virales por VPH desarrollan lesiones cervicales y la influencia que los factores adicionales tienen en este proceso, está pendiente por resolver. A pesar de su importancia clínica, la prevalencia de algunas ITS se desconoce para la población nuestro país, lo que en parte se debe a dificultades en los diagnósticos que dependen de métodos tradicionales, como son los cultivos y los inmunoensayos enzimáticos (39). Al compartir estas infecciones una misma vía de transmisión, presentar algunas de ellas tropismo por los mismos tejidos y ser organismos intracelulares obligados, no es sorprendente que puedan co-existir y favorecer mutuamente su existencia en un mismo hospedero (17, 22, 40). Este trabajo consolida la dinámica de las cargas virales, presentes en muestras cervicales de una población de mujeres colombianas seguidas cada 6 meses, por al menos 2 años, así como la identificación de la presencia de *Ct*.

La comparación entre los hallazgos a nivel de inspección del cervix obtenidos a través de citología y colposcopia sugieren que, si bien la citología ha sido una herramienta importante dentro de los esquemas de tamización, un porcentaje de mujeres pueden presentar falsos negativos (133). La efectividad de la citología cuando se practica regularmente indica que reduce hasta en un 60% la morbi-mortalidad por este tipo de cáncer lo cual ha sido ampliamente demostrado en países desarrollados; sin embargo, en países en desarrollo como Colombia esta tendencia no ha sido la observada (134, 135).

A pesar de que la prueba de oro para la identificación de mujeres en riesgo de desarrollo de CC es el test Pap (logra identificar la presencia de cambios en la arquitectura del cérvix), esta presenta grandes limitaciones, por lo que recientemente se ha venido trabajando en la búsqueda de nuevas estrategias que permitan identificar en un punto más temprano aquellas mujeres que están en riesgo de sufrir algún tipo de proceso neoplásico (136-140). Debido a el establecimiento del vínculo causal entre la infección con VPH y el desarrollo CC, se han implementado test moleculares complementarios a las pruebas de tamización, para detectar

de forma específica infecciones por tipos de VPH, que permitan identificar las mujeres en riesgo de desarrollar enfermedad, en un punto más temprano de la historia natural de la enfermedad (141-145).

Estudios han demostrado que la inclusión de pruebas moleculares para la detección de HPV-DNA ha permitido la detección de un mayor número de mujeres que cursan con displasias de bajo grado o peores, en comparación con aquellos que se basan exclusivamente en Pap test; adicionalmente la tipificación de VPH-16 y -18 ha mostrado ser una herramienta que brinda niveles de sensibilidad y especificidad aceptables (138-141).

La distribución de la frecuencia de los tipos de VPH para la población estudiada, mostró que el tipo de VPH mas frecuente fue VPH-16, lo que concuerda con las frecuencias reportadas a nivel mundial, no obstante el segundo tipo de mayor aparición fue VPH-31, esto se ha observado previemente para nuestro país, pero difiere de lo resportado para varios países latinoamericanos, (142-150) y algunas poblaciones Europeas (135).

Estas diferencias en la distribución tipo-específica indican que la prevalencia de VPH puede variar de acuerdo a la región geográfica analizada, esto puede ser explicado en el hecho que factores genéticos como el HLA explicados previamente, puesto que polimorfismos en los genes responsables de la respuesta inmune podrían estar favoreciendo la eliminación o la persistencia de tipos de VPH específicos entre las poblaciones factores de riesgo, adicionalmente factores medio-ambientales no tenidos en cuenta en este trabajo, pueden contribuir a distribución diferencial entre las regiones analizadas (151-153).

Con respecto a la disminución de la carga normalizada para las mujeres infectadas por VPH-16 pertenecientes a ciudades diferentes de Bogotá, no es sencillo establecer los parámetros que afectan ya que hay aspectos en cuanto a las costumbres y a la alimentación que no fueron medidas en el estudio y pueden influir en la infección por estos tipos. Las diferencias entre Girardot y Bogotá, han sido previamente identificadas en relación a la prevalencia de VPH, la distribución tipo-específica, la presencia de infecciones múltiples y el tiempo en el que se determina la depuración viral (154).

Otro factor involucrado en disminuir la carga viral fue un mayor número de compañeros sexuales, que involucró un tipo de VPH representativo de la especie A7 (VPH-45). Según estos datos se podría inferir que un aumento en el número de compañeros sexuales favorece una regulación de la carga viral de tal forma que no incida en el reconocimiento por el sistema inmune y de esta forma en la depuración viral (155-158).

Para el caso del aumento de la carga viral, la variable que presentó un mayor número de tipos relacionados fue el número de gestaciones, lo cual aumentó la carga viral para VPH-16, -18 y -33. 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) (160-165).

Interesantemente la etnia Afrodescendiente tuvo un efecto en disminuir considerablemente la carga viral para VPH-16. Se ha indicado que puede existir preferencias de algunos tipos virales en infectar etnias determinadas o que existen patrones comportamentales en las diferentes etnias que hacen que se de esta preferencia (166). Se ha descrito que las variantes moleculares para VPH-16 afectan más a las poblaciones de las cuales provienen, por ejemplo, variantes Africanas tendrían preferencias por mujeres étnicamente Afrdescendientes (166-172); no obstante, futuros estudios que incluyan la determinación de las variantes involucradas, son necesarios y de manera tal que permitan confirmar los resultados obtenidos acá.

La disminución del número de copias virales para la mayor parte de los tipos de VPH-AR en presencia de otras infecciones de transmisión sexual (ITS), se ha descrito previemente, para patógenos como HSV-2, estas pueden deberse a una reacción sinérgica entre microorganismos, en busqueda de favorecer la persistencia de estos en el hospedero y así lograr pasar desapercibidas el sistema inmune, evitando que se lleve a cabo una adecuada

respuesta inmunitaria (173-176). Adicionalmente, dado que en el transcurso de la infección por VPH, puede conllevar a otras coexistencias esta relaciones son influenciadas por interacciones de competencia o de cooperación, favoreciendo o afectando algún tipo viral especifico (177, 178).

Los resultados de este estudio mostraron una elevada circulación de *Ct* para esta población, superior a lo previamente reportado, esto puede ser en parte explicado por la diferncia en las técnicas de detección de la bacteria implementados en los distintos estudios, que variaron desde técnicas de cultivos celulares (sensibilidad del 50%), técnicas de inmunoensayo (sensibilidad del 60% y especificidad de 99%), hasta ensayos de anticuerpos de fluorescencia directa (sensibilidad 85%) (179). La técnica empelada en el presente estudio fue la PCR, la cual ha mostrado tener una especificidad del 99% y sensibilidad del 90%, lo que permitió una identificación de Ct con mayor sensibuilidad y robustes epidemiológica no obstante al comparar las frecuencias de *Ct* con previos reportes que emplean técnicas moleculares, la frecuencia de *Ct* es similar a la reportada acá (168, 169).

La infección por *Ct* puede variar de acuerdo al tipo de VPH especifico que se encuentre en coexistencia, generando la posibilidad que esta interacción genere una sinergia o competencia según el tipo de VPH analizado (179-182). Nuestros resultados sugieren que la presencia de *Ct,* pueden afectar incluso a más del doble la carga viral del VPH, ya sea aumentandola (VPH-16, 18 , 31 y 45) o dismuyendola (VPH-33 y 58), lo que indicaría una de las en que *Ct* contribuye al desarrollo de la neoplasia cervical tal como han indicado varios estudio (30, 32, 183).

Por otra parte, la importancia de evaluar el número de copias virales podria permitir que esta sean un factor predictor del descenlace de las infecciones, por ejemplo el aumento de la carga viral de VPH-16 ha sido asociado con el empeoramiento de la lesión cervical, en VPH-18 y -31 con la persistencia y VPH-45 con el desarrollo de cáncer, incluso VPH-16 se ha propuesto como predictor de carcinoma invasivo por presentar cargas virales altas, ya que mayor carga viral sostenida a lo largo del tiempo puede representar un biomarcador para la progresión

(35, 136, 184, 185). Adicionalmente, tipos como VPH-31, uno de los más prevalentes en nuestra población, se ha asociado a un riesgo a corto plazo de desarrollo de CIN2-3 (186).

Se podría pensar que para aquellos tipos virales que presentaron cargas bajas cuando hay infección por *Ct*, podrían tener una coexistencia sinérgica, de manera tal que estas infecciones persistan en el hospedero por largos periodos, incrementando así el riesgo de progresión de lesiones de mal pronoótico. Se ha demostrado que VPH-16, se integra fácilmente al genoma con cargas altas, sin embargo, se ha visto que cuando hay cargas virales bajas hay una disminución en la tasa de depuración (187), por lo que podría pasar a un estado de latencia y estar evadiendo la respuesta inmune del hospedero, lo mismo podría estar sucediendo en aquellos casos donde se cursa con infecciones por VPH-33 y -58 que en este estudio disminuyeron sus cargas virales en presencia de *Ct.* (37, 188) previamente se ha reportado que las cargas virales medias o bajas no son detectadas por el sistema inmune el hospedero, y por lo tanto una disminución en las tasas de depuración (187) por lo que se ha sugerido que esta evasión es aprovechada por el VPH para aumentar su persistencia, lo que ha sido asociado con el desarrollo de CC (189).

Las variables que involucran cambios hormonales en las mujeres tienen influencia en modular la carga viral ya que el uso de anticonceptivos hormonales incrementó la carga viral del VPH-16 pero las mujeres que presentaban menopausia tuvieron una disminución en la carga de este tipo . Algo similar se encontró en una cohorte de mujeres jóvenes canadienses donde el VPH-18 tenía cargas mayores, en mujeres que usaban un método de planificación hormonal (190).

Los proteoglicanos, algunas hormonas presentes en anticonceptivos y la menopausia se ha asociado a la activación de los promotores de la replicación viral y facilidad del ingreso e invasión a la célula hospedero, por lo que aumenta de manera comprensible la carga debido a este efecto, por otro lado los anticonceptivos de barrera favorecieron la disminución de la carga viral de VPH- 45, aunque no se diferenció en el estudio el método de barrera utilizado. La menopausia a su vez, genera a cambios hormonales, asociados a los niveles circulantes

de hormonas esteroideas sexuales, testosterona y posiblemente estradiol, en la etiología del CC que también facilitan la invasión y multiplicación del virus (191, 192).

Se ha reportado ampliamente que factores de comportamiento sexual como tener dos compañeros sexuales favorece el incremento de la carga viral del VPH (193), específicamente para VPH-45, se ha relacionado el número de compañeros con un mayor riesgo de exposición a coinfectarse, por lo tanto las interacciones que se forman por las nuevas infecciones adquiridas, inician la competencia por el medio celular y los recursos para llevar los procesos de transcripción o traducción necesarios para la supervivencia en la célula hospedero (193), por lo tanto se generan relaciones sinérgicas que favorecen su crecimiento, y se ha visto que estas relaciones son tipo específicas y son favorecidas dependiendo la especie (194).

Para futuros estudios variables relacioandas con el método anticonceptivo (como tiempo de uso, carga hormonal mensual, entre otros) deberian ser evaluados con más detalle y profundidad, adicionalmente, otras ITS deben ser consideradas e incluidas en futuros analisis, de manera tal que permitan establecer y caracterizar de manera adecuada factores relacionados con la depuración y persistencia de las infecciones por VPH en nuestra población.

Este es un estudio de cohorte retrospectivo que analizo la dinámica de la carga viral de 6 tipos de VPH de alto riesgo en presencia de *Ct*, los resultados sugieren una elevada coexistencia que podria estar implicando una interacción entre estos dos microoganismos, lo que en últimas favorece su persistencia en el organismo conllevando a la transformación celular y en últimas al desarrollo del CC, por lo que para los esquemas de promoción y prevención implementados en la actualidad, podria ser considerado la detección activa de otras ITS como una herramienta que contribuya en la disminusión de las infecciones por VPH y por lo tanto en la dismininición de las tasas de CC para Colombia. Los resultados obtenidos permitieron determinar la dinámica de la carga viral de 6 tipos de VPH-AR y como se asocian con la presencia de *Ct*, aportando valioso conocimiento de las infecciones simultáneas por ITS en la población colombiana, lo que a futuro esperamos contribuya en el diseño y mejora

de los programas de promoción y prevención de CC, así como en los planes de mejoramiento de salud pública.

CONCLUSIONES

- La frecuencia de los tipos de VPH varía de acuerdo en el transcurso del seguimiento, siendo los más frecuentes VPH-16 y VPH-31 en la población de estudio.

- Factores sociodemográficos pueden afectar la dinámica de la carga viral de VPH, pero van a depender del tipo viral presente.

- La tasa de infección de *Ct* son más altas en ausencia de VPH, sugiriéndose una respuesta del sistema inmune más activa cuando previamente se ha infectado por VPH.

- Las interacciones encontradas en el estudio indican una posible relación sinérgica entre VPH *y C trachomatis* en términos de aumento de la carga viral para VPH-16, -18, -31 y -45 y disminución la carga viral para VPH-33 y -58.

BIBLIOGRAFIA

1. Toskin I, Blondeel K, Peeling RW, Deal C, Kiarie J. Advancing point of care diagnostics for the control and prevention of STIs: the way forward. Sex Transm Infect. 2017;93(S4):S81-S8.

2. Seale A, Broutet N, Narasimhan M. Assessing process, content, and politics in developing the global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016-2021: Implementation opportunities for policymakers. PLoS Med. 2017;14(6):e1002330.

3. Korenromp EL, Wi T, Resch S, Stover J, Broutet N. Costing of National STI Program Implementation for the Global STI Control Strategy for the Health Sector, 2016-2021. PLoS One. 2017;12(1):e0170773.

4. Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries HJC, Francis SC, Mabey D, et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. Lancet Infect Dis. 2017;17(8):e235-e79.

5. Boda D, Docea AO, Calina D, Ilie MA, Caruntu C, Zurac S, et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). Int J Oncol. 2018.

6. Reaves EJ, Valle R, Chandrasekera RM, Soto G, Burke RL, Cummings JF, et al. Use of Bibliometric Analysis to Assess the Scientific Productivity and Impact of the Global Emerging Infections Surveillance and Response System Program, 2006-2012. Mil Med. 2017;182(5):e1749-e56.

7. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. J Infect Dis. 2010;202(12):1789-99.

8. Walboomers JM, Meijer CJ, Steenbergen RD, van Duin M, Helmerhorst TJ, Snijders PJ. [Human papillomavirus and the development of cervical cancer: concept of carcinogenesis]. Ned Tijdschr Geneeskd. 2000;144(35):1671-4.

9. Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. Int J Appl Basic Med Res. 2016;6(2):84-9.

10. Antonishyn NA, Horsman GB, Kelln RA, Saggar J, Severini A. 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. 2008;132(1):54-60.

11. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2007;7(7):453-9.

12. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359-86.

13. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, Xi LF, Cherne S, O'Reilly S, et al. Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011;20(4):699-707.

14. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018.

15. Lei J, Ploner A, Lagheden C, Eklund C, Nordqvist Kleppe S, Andrae B, et al. High-risk human papillomavirus status and prognosis in invasive cervical cancer: A nationwide cohort study. PLoS Med. 2018;15(10):e1002666.

16. de Abreu AL, Malaguti N, Souza RP, Uchimura NS, Ferreira É, Pereira MW, et al. Association of human papillomavirus, Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. Am J Cancer Res. 2016;6(6):1371-83.

17. Discacciati MG, Gimenes F, Pennacchi PC, Faiao-Flores F, Zeferino LC, Derchain SM, et al. MMP-9/RECK Imbalance: A Mechanism Associated with High-Grade Cervical Lesions and Genital Infection by Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2015;24(10):1539-47.

18. Häcker G. Biology of chlamydia. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2018. ix, 237 pages p.

19. Seraceni S, Campisciano G, Contini C, Comar M. HPV genotypes distribution in Chlamydia trachomatis co-infection in a large cohort of women from north-east Italy. J Med Microbiol. 2016;65(5):406-13.

20. Shannon B, Yi TJ, Perusini S, Gajer P, Ma B, Humphrys MS, et al. Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. Mucosal Immunol. 2017;10(5):1310-9.

21. da Silva Barros NK, Costa MC, Alves RR, Villa LL, Derchain SF, Zeferino LC, et al. Association of HPV infection and Chlamydia trachomatis seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil. J Med Virol. 2012;84(7):1143-50.

22. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. Arch Gynecol Obstet. 2014;289(4):715-23.

23. Safaeian M, Quint K, Schiffman M, Rodriguez AC, Wacholder S, Herrero R, et al. Chlamydia trachomatis and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. J Natl Cancer Inst. 2010;102(23):1794-804.

24. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. Medicine (Baltimore). 2016;95(13):e3077.

25. Lujan AL, Croci DO, Gambarte Tudela JA, Losinno AD, Cagnoni AJ, Mariño KV, et al. Glycosylation-dependent galectin-receptor interactions promote. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(26):E6000-E9.

26. Shima K, Kaeding N, Ogunsulire IM, Kaufhold I, Klinger M, Rupp J. Interferon-γ interferes with host cell metabolism during intracellular Chlamydia trachomatis infection. Cytokine. 2018.

27. Jonsson S, Oda H, Lundin E, Olsson J, Idahl A. Chlamydia trachomatis, Chlamydial Heat Shock Protein 60 and Anti-Chlamydial Antibodies in Women with Epithelial Ovarian Tumors. Transl Oncol. 2018;11(2):546-51.

28. Vriend HJ, Bogaards JA, van Bergen JE, Brink AA, van den Broek IV, Hoebe CJ, et al. Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without Chlamydia trachomatis co-infection. Cancer Med. 2015;4(10):1589-98.

29. Weber MM, Lam JL, Dooley CA, Noriea NF, Hansen BT, Hoyt FH, et al. Absence of Specific Chlamydia trachomatis Inclusion Membrane Proteins Triggers Premature Inclusion Membrane Lysis and Host Cell Death. Cell Rep. 2017;19(7):1406-17.

30. Simonetti AC, Melo JH, de Souza PR, Bruneska D, de Lima Filho JL. Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis, a cervical cancer cofactor. Microbes Infect. 2009;11(4):435-42.

31. Dlugosz A, Muschiol S, Zakikhany K, Assadi G, D'Amato M, Lindberg G. Human enteroendocrine cell responses to infection with Chlamydia trachomatis: a microarray study. Gut Pathog. 2014;6:24.

32. Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, Saikku P, Leinonen M, Carter JJ, et al. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. Int J Cancer. 2007;120(3):650-5.

33. Robial R, Longatto-Filho A, Roteli-Martins CM, Silveira MF, Stauffert D, Ribeiro GG, et al. Frequency of Chlamydia trachomatis infection in cervical intraepithelial lesions and the status of cytological p16/Ki-67 dual-staining. Infect Agent Cancer. 2017;12:3.

34. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sørensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. Lancet. 2000;355(9222):2189-93.

35. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. Br J Cancer. 2005;92(5):891-4.

36. Rousseau MN, Costes V, Konate I, Nagot N, Foulongne V, Ouedraogo A, et al. Viral load and genomic integration of HPV 16 in cervical samples from HIV-1-infected and uninfected women in Burkina Faso. J Med Virol. 2007;79(6):766-70.

37. Sherchand SP, Ibana JA, Zea AH, Quayle AJ, Aiyar A. The High-Risk Human Papillomavirus E6 Oncogene Exacerbates the Negative Effect of Tryptophan Starvation on the Development of Chlamydia trachomatis. PLoS One. 2016;11(9):e0163174.

38. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. Infect Dis Obstet Gynecol. 2006;2006 Suppl:40470.

39. Wheeler CM. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. Obstet Gynecol Clin North Am. 2008;35(4):519-36; vii.

40. Chang L, He X, Yu G, Wu Y. Effectiveness of HPV 16 viral load and the E2/E6 ratio for the prediction of cervical cancer risk among Chinese women. J Med Virol. 2013;85(4):646-54.

41. Li TY, Wu ZN, Jiang MY, Cui JF, Liu B, Chen F, et al. [Association between high risk human papillomavirus DNA load and cervical lesions in different infection status]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2018;40(6):475-80.

42. Wang W, Zhang XH, Li M, Hao CH, Zhao ZM, Liang HP. Association between viral loads of different oncogenic human papillomavirus types and the degree of cervical lesions in the progression of cervical Cancer. Clin Chim Acta. 2018;483:249-55.

43. Wu Z, Yu L, Lei X, Qin Y, Zhang X, Chen W, et al. The association between human papillomavirus 16, 18 DNA load and E6 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. J Clin Virol. 2018;108:6-11.

44. Quinónez-Calvache EM, Ríos-Chaparro DI, Ramírez JD, Soto-De León SC, Camargo M, Del Río-Ospina L, et al. Chlamydia trachomatis Frequency in a Cohort of HPV-Infected Colombian Women. PLoS One. 2016;11(1):e0147504.

45. de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. Susceptibility to cervical cancer: an overview. Gynecol Oncol. 2012;126(2):304-11.

46. Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. Nat Rev Immunol. 2005;5(2):149-61.

47. Momany MC, Martinez-Gutierrez J, Soto M, Capurro D, Ciampi F, Thompson B, et al. Development of mobile technologies for the prevention of cervical cancer in Santiago, Chile study protocol: a randomized controlled trial. BMC Cancer. 2017;17(1):847.

48. Li AX, Yin R, Zhong BY, Hao F. [Clinical analysis of the infection with human papillomavirus in women]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 2006;20(2):49-52.

49. van Hamont D, Bekkers RL, Massuger LF, Melchers WJ. Detection, management, and follow-up of pre-malignant cervical lesions and the role for human papillomavirus. Rev Med Virol. 2008;18(2):117-32.

50. NEGRIN. LGC. EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE CUELLO UTERINO EN AMERICA LATINA. Ecancermedicalscience; 2015.

51. Jin XW, Lipold L, Foucher J, Sikon A, Brainard J, Belinson J, et al. Cost-Effectiveness of Primary HPV Testing, Cytology and Co-testing as Cervical Cancer Screening for Women Above Age 30 Years. J Gen Intern Med. 2016;31(11):1338-44.

52. Walsh J. Capsule Commentary on Jin et. al., Cost-Effectiveness of Primary HPV Testing, Cytology and Co-testing as Cervical Cancer Screening for Women above Age 30 Years. J Gen Intern Med. 2016;31(11):1358.

53. Stehman FB, Rose PG, Greer BE, Roy M, Plante M, Penalver M, et al. Innovations in the treatment of invasive cervical cancer. Cancer. 2003;98(9 Suppl):2052-63.

54. Baldwin P, Laskey R, Coleman N. Translational approaches to improving cervical screening. Nat Rev Cancer. 2003;3(3):217-26.

55. Reich O, Regauer S, McCluggage WG, Bergeron C, Redman C. Defining the Cervical Transformation Zone and Squamocolumnar Junction: Can We Reach a Common Colposcopic and Histologic Definition? Int J Gynecol Pathol. 2017;36(6):517-22.

56. Fey MC, Beal MW. Role of human papilloma virus testing in cervical cancer prevention. J Midwifery Womens Health. 2004;49(1):4-13.

57. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. Acta Cytol. 2017;61(4-5):359-72.

58. Wright TC, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ, Conference A-sC. 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities. J Low Genit Tract Dis. 2002;6(2):127-43.

59. Solomon D NRe. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. New York: Springer; 2004.

60. Mui UN, Haley CT, Tyring SK. Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. J Clin Med. 2017;6(12).

61. Cuvelier CA, Bogers JP, Bourgain C, Delvenne P, Drijkoningen M, Garbar C, et al. Belgian consensus guidelines for follow-up of women with cervical cytological abnormalities. Acta Clin Belg. 2009;64(2):136-43.

62. Landy R, Schiffman M, Sasieni PD, Cheung LC, Katki HA, Rydzak G, et al. Absolute risks of cervical precancer among women who fulfil exiting guidelines based on HPV and cytology cotesting. Int J Cancer. 2019.

63. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. J Low Genit Tract Dis. 2013;17(5 Suppl 1):S1-S27.

64. Mirabello L, Clarke MA, Nelson CW, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, et al. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. Viruses. 2018;10(2).

65. Burd EM, Dean CL. Human Papillomavirus. Microbiol Spectr. 2016;4(4).

66. Riethmuller D, Schaal JP, Mougin C. [Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus]. Gynecol Obstet Fertil. 2002;30(2):139-46.

67. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol. 2000;19(1-2):1-5.

68. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999;189(1):12-9.

69. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. Clin Microbiol Rev. 2016;29(2):291-319.

70. Rymsza T, Ribeiro EA, de Carvalho LF, Bhattacharjee T, de Azevedo Canevari R. Human papillomavirus detection using PCR and ATR-FTIR for cervical cancer screening. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2018;196:238-46.

71. Lima LM, Hoelzle CR, Simões RT, Lima MIM, Fradico JRB, Mateo ECC, et al. Sexually Transmitted Infections Detected by Multiplex Real Time PCR in Asymptomatic Women and Association with Cervical Intraepithelial Neoplasia. Rev Bras Ginecol Obstet. 2018;40(9):540-6.

72. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. Mutat Res Rev Mutat Res. 2017;772:3-12.

73. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. Virology. 2015;476:341-4.

74. McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2017;372(1732).

75. Shah SD, Doorbar J, Goldstein RA. Analysis of host-parasite incongruence in papillomavirus evolution using importance sampling. Mol Biol Evol. 2010;27(6):1301-14.

76. Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Kocjan BJ, Maver PJ, et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat. 2011;20(3):113-23.

77. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. Viruses. 2015;7(7):3863-90.

78. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. PLoS One. 2011;6(5):e20183.

79. Ottria L, Candotto V, Cura F, Baggi L, Arcuri C, Nardone M, et al. HPV acting on E-cadherin, p53 and p16: literature review. J Biol Regul Homeost Agents. 2018;32(2 Suppl. 1):73-9.

80. Pinidis P, Tsikouras P, Iatrakis G, Zervoudis S, Koukouli Z, Bothou A, et al. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. Maedica (Buchar). 2016;11(1):48-54.

81. Tsu VD, Njama-Meya D, Lim J, Murray M, de Sanjose S. Opportunities and challenges for introducing HPV testing for cervical cancer screening in sub-Saharan Africa. Prev Med. 2018;114:205-8.

82. Christensen ND. HPV disease transmission protection and control. Microb Cell. 2016;3(9):476-90.

83. Zummeren MV, Kremer WW, Leeman A, Bleeker MCG, Jenkins D, Sandt MV, et al. HPV E4 expression and DNA hypermethylation of CADM1, MAL, and miR124-2 genes in cervical cancer and precursor lesions. Mod Pathol. 2018.

84. Bienkowska-Haba M, Luszczek W, Myers JE, Keiffer TR, DiGiuseppe S, Polk P, et al. A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. PLoS Pathog. 2018;14(3):e1006846.

85. Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. Virus Res. 2017;231:21-33.

86. Viarisio D, Gissmann L, Tommasino M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. Curr Opin Virol. 2017;26:56-62.

87. van de Wall S, Ljungberg K, Ip PP, Boerma A, Knudsen ML, Nijman HW, et al. Potent therapeutic efficacy of an alphavirus replicon DNA vaccine expressing human papilloma virus E6 and E7 antigens. Oncoimmunology. 2018;7(10):e1487913.

88. Martínez-Ramírez I, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A, Ortiz-Sánchez E, Cruz-Gregorio A, Lizano M. Regulation of Cellular Metabolism by High-Risk Human Papillomaviruses. Int J Mol Sci. 2018;19(7).

89. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. 2012;30 Suppl 5:F55-70.

90. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. [General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus]. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2015;53 Suppl 2:S166-71.

91. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. Virol J. 2010;7:11.

92. Day PM, Schiller JT. The role of furin in papillomavirus infection. Future Microbiol. 2009;4(10):1255-62.

93. Schäfer G, Blumenthal MJ, Katz AA. Interaction of human tumor viruses with host cell surface receptors and cell entry. Viruses. 2015;7(5):2592-617.

94. Nguyen HP, Ramírez-Fort MK, Rady PL. The biology of human papillomaviruses. Curr Probl Dermatol. 2014;45:19-32.

95. Elena-Sophie Prigge MvKD, Miriam Reuschenbach*. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in
different anatomical locations. elsevier. 2016.

96. Prati B, Marangoni B, Boccardo E. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. Clinics (Sao Paulo). 2018;73(suppl 1):e539s.

97. Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. Mutat Res Rev Mutat Res. 2017;772:51-66.

98. Yeo-Teh NSL, Ito Y, Jha S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. Int J Mol Sci. 2018;19(6).

99. Aarthy M, Kumar D, Giri R, Singh SK. E7 oncoprotein of human papillomavirus: Structural dynamics and inhibitor screening study. Gene. 2018;658:159-77.

100. Wilting SM, Steenbergen RDM. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia. Papillomavirus Res. 2016;2:85-8.

101. Fischer M, Uxa S, Stanko C, Magin TM, Engeland K. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. Sci Rep. 2017;7(1):2603.

102. Jansma AL, Martinez-Yamout MA, Liao R, Sun P, Dyson HJ, Wright PE. The high-risk HPV16 E7 oncoprotein mediates interaction between the transcriptional coactivator CBP and the retinoblastoma protein pRb. J Mol Biol. 2014;426(24):4030-48.

103. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. Trends Microbiol. 2018;26(2):158-68.

104. Thatte J, Massimi P, Thomas M, Boon SS, Banks L. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif Links DNA Damage Response Signaling to E6 Inhibition of p53 Transcriptional Activity. J Virol. 2018;92(16).

105. Bordignon V, Di Domenico EG, Trento E, D'Agosto G, Cavallo I, Pontone M, et al. How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery. Viruses. 2017;9(12).

106. Mehta K, Laimins L. Human Papillomaviruses Preferentially Recruit DNA Repair Factors to Viral Genomes for Rapid Repair and Amplification. MBio. 2018;9(1).

107. Wallace NA, Galloway DA. Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses. Semin Cancer Biol. 2014;26:30-42.

108. Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. Oncol Rev. 2012;6(2):e17.

109. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. Public Health Genomics. 2009;12(5-6):268-80.

110. Yajid AI, Zakariah MA, Mat Zin AA, Othman NH. Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: a Review. Asian Pac J Cancer Prev. 2017;18(2):315-9.

111. Araldi RP, Sant'Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. Biomed Pharmacother. 2018;106:1537-56.

112. Biryukov J, Myers JC, McLaughlin-Drubin ME, Griffin HM, Milici J, Doorbar J, et al. Mutations in HPV18 E1^E4 Impact Virus Capsid Assembly, Infectivity Competence, and Maturation. Viruses. 2017;9(12).

113. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. Virology. 2013;445(1-2):169-74.

114. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. Vaccine. 2006;24 Suppl 1:S1-15.

115. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol. 2002;55(4):244-65.

116. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. Vaccine. 2013;31 Suppl 7:H1-31.

117. Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. Clin Lab Med. 2000;20(2):235-55.

118. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002;2(5):342-50.

119. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018;47:14-26.

120. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 2008;26 Suppl 10:K1-16.

121. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harri R, Baldwi S, Papenfuss MR, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). Cancer Causes Control. 2002;13(9):839-46.

122. McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM, Group A. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(5):1165-70.

123. Munoz JP, Carrillo-Beltran D, Aedo-Aguilera V, Calaf GM, Leon O, Maldonado E, et al. Tobacco Exposure Enhances Human Papillomavirus 16 Oncogene Expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun Signaling Pathway in Cervical Cancer Cells. Front Microbiol. 2018;9:3022.

124. Syrjanen K. Mechanisms and predictors of high-risk human papillomavirus (HPV) clearance in the uterine cervix. Eur J Gynaecol Oncol. 2007;28(5):337-51.

125. Eldridge RC, Pawlita M, Wilson L, Castle PE, Waterboer T, Gravitt PE, et al. Smoking and subsequent human papillomavirus infection: a mediation analysis. Ann Epidemiol. 2017;27(11):724-30 e1.

126. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002;359(9312):1085-92.

127. La Vecchia C, Boccia S. Oral contraceptives, human papillomavirus and cervical cancer. Eur J Cancer Prev. 2014;23(2):110-2.

128. Ramachandran B. Functional association of oestrogen receptors with HPV infection in cervical carcinogenesis. Endocr Relat Cancer. 2017;24(4):R99-R108.

129. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002;359(9312):1093-101.

130. Liao SF, Lee WC, Chen HC, Chuang LC, Pan MH, Chen CJ. Baseline human papillomavirus infection, high vaginal parity, and their interaction on cervical cancer risks after a follow-up of more than 10 years. Cancer Causes Control. 2012;23(5):703-8.

131. Guidry JT, Scott RS. The interaction between human papillomavirus and other viruses. Virus Res. 2017;231:139-47.

132. Chaturvedi AK, Madeleine MM, Biggar RJ, Engels EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. J Natl Cancer Inst. 2009;101(16):1120-30.

133. Denny LA, Franceschi S, de Sanjose S, Heard I, Moscicki AB, Palefsky J. Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. Vaccine. 2012;30 Suppl 5:F168-74.

134. Soto-De Leon S, Camargo M, Sanchez R, Munoz M, Perez-Prados A, Purroy A, et al. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. PLoS One. 2011;6(2):e14705.

135. Camargo M, Soto-De Leon SC, Sanchez R, Perez-Prados A, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia. Ann Epidemiol. 2011;21(3):204-13.

136. Boulet GA, Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CA, Aerts M, Hens N, et al. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia >or=2 in a liquid-based cytology setting? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(11):2992-9.

137. Ho CM, Chien TY, Huang SH, Lee BH, Chang SF. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. Gynecol Oncol. 2006;102(1):54-60.

138. Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mougin C, Pretet JL. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. J Clin Virol. 2006;35(3):270-7.

139. Depuydt CE, Criel AM, Benoy IH, Arbyn M, Vereecken AJ, Bogers JJ. Changes in type-specific human papillomavirus load predict progression to cervical cancer. J Cell Mol Med. 2012;16(12):3096-104.

140. Carcopino X, Bolger N, Henry M, Mancini J, Boubli L, Olive D, et al. Evaluation of type-specific HPV persistence and high-risk HPV viral load quantitation in HPV positive women under 30 with normal cervical cytology. J Med Virol. 2011;83(4):637-43.

141. Manawapat A, Stubenrauch F, Russ R, Munk C, Kjaer SK, Iftner T. Physical state and viral load as predictive biomarkersfor persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. Am J Cancer Res. 2012;2(2):192-203.

142. Soto-De Leon SC, Camargo M, Sanchez R, Leon S, Urquiza M, Acosta J, et al. Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. Clin Microbiol Infect. 2009;15(1):100-2.

143. Del Rio-Ospina L, Soto-De Leon SC, Camargo M, Moreno-Perez DA, Sanchez R, Perez-Prados A, et al. The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. BMC Cancer. 2015;15:100.

144. Gupta RS, Naushad S, Chokshi C, Griffiths E, Adeolu M. A phylogenomic and molecular markers based analysis of the phylum Chlamydiae: proposal to divide the class Chlamydiia into two orders, Chlamydiales and Parachlamydiales ord. nov., and emended description of the class Chlamydiia. Antonie Van Leeuwenhoek. 2015;108(3):765-81.

145. Taylor-Brown A, Vaughan L, Greub G, Timms P, Polkinghorne A. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. Pathog Dis. 2015;73(1):1-15.

146. Hepler RW, Nahas DD, Lucas B, Kaufhold R, Flynn JA, Galli JD, et al. Spectroscopic Analysis of Chlamydial Major Outer Membrane Protein in Support of Structure Elucidation. Protein Sci. 2018.

147. Eder T, Kobus S, Stallmann S, Stepanow S, Köhrer K, Hegemann JH, et al. Genome sequencing of Chlamydia trachomatis serovars E and F reveals substantial genetic variation. Pathog Dis. 2017;75(9).

148. Abdelsamed H, Peters J, Byrne GI. Genetic variation in Chlamydia trachomatis and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. Future Microbiol. 2013;8(9):1129-46.

149. Lu H, Jiang PC, Zhang XD, Hou WJ, Wei ZH, Lu JQ, et al. Characteristics of bacterial vaginosis infection in cervical lesions with high risk human papillomavirus infection. Int J Clin Exp Med. 2015;8(11):21080-8.

150. Karim S, Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Cervical Cancer Induction Enhancement Potential of Chlamydia Trachomatis: A Systematic Review. Curr Microbiol. 2018.

151. Gurumurthy RK, Mäurer AP, Machuy N, Hess S, Pleissner KP, Schuchhardt J, et al. A loss-of-function screen reveals Ras- and Raf-independent MEK-ERK signaling during Chlamydia trachomatis infection. Sci Signal. 2010;3(113):ra21.

152. Byrne GI, Ojcius DM. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. Nat Rev Microbiol. 2004;2(10):802-8.

153. Chumduri C, Gurumurthy RK, Zadora PK, Mi Y, Meyer TF. Chlamydia infection promotes host DNA damage and proliferation but impairs the DNA damage response. Cell Host Microbe. 2013;13(6):746-58.

154. Ohmer M, Tzivelekidis T, Niedenfuhr N, Volceanov-Hahn L, Barth S, Vier J, et al. Infection of HeLa cells with Chlamydia trachomatis inhibits protein synthesis and causes multiple changes to host cell pathways. Cell Microbiol. 2018:e12993.

155. Gulve N, Prusty BK, Rudel T. Chlamydia trachomatis impairs host base excision repair by downregulating polymerase beta. Cell Microbiol. 2018:e12986.

156. Subbarayal P, Karunakaran K, Winkler AC, Rother M, Gonzalez E, Meyer TF, et al. EphrinA2 receptor (EphA2) is an invasion and intracellular signaling receptor for Chlamydia trachomatis. PLoS Pathog. 2015;11(4):e1004846.

157. Sun HS, Sin AT, Poirier MB, Harrison RE. Chlamydia trachomatis Inclusion Disrupts Host Cell Cytokinesis to Enhance Its Growth in Multinuclear Cells. J Cell Biochem. 2016;117(1):132-43.

158. Igietseme JU, Omosun Y, Stuchlik O, Reed MS, Partin J, He Q, et al. Role of Epithelial-Mesenchyme Transition in Chlamydia Pathogenesis. PLoS One. 2015;10(12):e0145198.

159. Zhang Y, Yeruva L, Marinov A, Prantner D, Wyrick PB, Lupashin V, et al. The DNA sensor, cyclic GMP-AMP synthase, is essential for induction of IFN-beta during Chlamydia trachomatis infection. J Immunol. 2014;193(5):2394-404.

160. Abu-Lubad M, Meyer TF, Al-Zeer MA. Chlamydia trachomatis inhibits inducible NO synthase in human mesenchymal stem cells by stimulating polyamine synthesis. J Immunol. 2014;193(6):2941-51.

161. Knowlton AE, Fowler LJ, Patel RK, Wallet SM, Grieshaber SS. Chlamydia induces anchorage independence in 3T3 cells and detrimental cytological defects in an infection model. PLoS One. 2013;8(1):e54022.

162. Padberg I, Janssen S, Meyer TF. Chlamydia trachomatis inhibits telomeric DNA damage signaling via transient hTERT upregulation. Int J Med Microbiol. 2013;303(8):463-74.

163. Brown HM, Knowlton AE, Grieshaber SS. Chlamydial infection induces host cytokinesis failure at abscission. Cell Microbiol. 2012;14(10):1554-67.

164. Knowlton AE, Brown HM, Richards TS, Andreolas LA, Patel RK, Grieshaber SS. Chlamydia trachomatis infection causes mitotic spindle pole defects independently from its effects on centrosome amplification. Traffic. 2011;12(7):854-66.

165. Mital J, Miller NJ, Fischer ER, Hackstadt T. Specific chlamydial inclusion membrane proteins associate with active Src family kinases in microdomains that interact with the host microtubule network. Cell Microbiol. 2010;12(9):1235-49.

166. Sharma M, Rudel T. Apoptosis resistance in Chlamydia-infected cells: a fate worse than death? FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;55(2):154-61.

167. Grieshaber SS, Grieshaber NA, Miller N, Hackstadt T. Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities. Traffic. 2006;7(8):940-9.

168. Soto-De Leon SC, Del Rio-Ospina L, Camargo M, Sanchez R, Moreno-Perez DA, Perez-Prados A, et al. Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. BMC Infect Dis. 2014;14:395.

169. Camargo M, Soto-De Leon S, Sanchez R, Munoz M, Vega E, Beltran M, et al. Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: Comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets. J Virol Methods. 2011;178(1-2):68-74.

170. Woodward M. Epidemiology : study design and data analysis. Third edition. ed. Boca Raton: CRC Press; 2014. xxii, 832 pages p.

171. Vargas-Hernández VM, Vargas-Aguilar VM, Tovar-Rodríguez JM. [Primary cervical cancer screening]. Cir Cir. 2015;83(5):448-53.

172. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. Int J Cancer. 2002;97(1):72-81.

173. Mariani L, Monfulleda N, Alemany L, Vizza E, Marandino F, Vocaturo A, et al. Human papillomavirus prevalence and type-specific relative contribution in invasive cervical cancer specimens from Italy. BMC Cancer. 2010;10:259.

174. Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM, et al. Human papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. Int J Cancer. 1999;82(6):799-803.

175. Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero LeC, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, et al. 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. 2010;117(2):291-6.

176. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018;47:2-13.

177. Senapati R, Nayak B, Kar SK, Dwibedi B. HPV genotypes co-infections associated with cervical carcinoma: Special focus on phylogenetically related and non-vaccine targeted genotypes. PLoS One. 2017;12(11):e0187844.

178. Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, Costa MC, Rohan TE, Franco EL. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12(10):1029-37.

179. Peuchant O, Le Roy C, Desveaux C, Paris A, Asselineau J, Maldonado C, Chêne G4, Horovitz j, Dallay D, de Barbeyrac B, Bébéar C. Screening for Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium should it be integrated into routine pregnancy care in French young pregnant women? Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 May;82(1):14-9.

180. Roca AM, Chobrutskiy BI, Callahan BM, Blanck G. T-cell receptor V and J usage paired with specific HLA alleles associates with distinct cervical cancer survival rates. Hum Immunol. 2019;80(4):237-42.

181. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(5):1157-64.

182. Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morré SA, Ronderos M, Franceschi S, et al. Prevalence and determinants of Chlamydia trachomatis infections in women from Bogota, Colombia. Sex Transm Infect. 2003;79(6):474-8.

183. Kiseki H, Tsukahara Y, Tajima N, Tanaka A, Horimoto A, Hashimura N. Influence of co-infection complicated with human papillomavirus on cervical intraepithelial neoplasia development in patients with atypical squamous cells of undetermined significance. J Infect Chemother. 2017;23(12):814-9.

184. Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, Bulkmans NW, van Tellingen JE, Meijer CJ, et al. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Int J Cancer. 2009;124(2):381-6.

185. Liu X, Schiffman M, Hulbert A, He Z, Shen Z, Koutsky LA, et al. Association of Human Papillomavirus 31 DNA Load with Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 2 and 3. J Clin Microbiol. 2015;53(11):3451-7.

186. Wu Z, Qin Y, Yu L, Lin C, Wang H, Cui J, et al. Association between human papillomavirus (HPV) 16, HPV18, and other HR-HPV viral load and the histological classification of cervical lesions: Results from a large-scale cross-sectional study. J Med Virol. 2017;89(3):535-41.

187. Trevisan A, Schlecht NF, Ramanakumar AV, Villa LL, Franco EL, Group L-MS. Human papillomavirus type 16 viral load measurement as a predictor of infection clearance. J Gen Virol. 2013;94(Pt 8):1850-7.

188. Chen R, Zou Y, Mao D, Sun D, Gao G, Shi J, et al. The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. J Cell Biol. 2014;206(2):173-82.

189. Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. Clin Exp Immunol. 1999;116(1):33-40.

190. Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, et al. 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. 2010;10:326.

191. Misra JS, Srivastava AN, Zaidi ZH. Cervical Cytopathological Changes Associated with Onset of Menopause. J Midlife Health. 2018;9(4):180-4.

192. Gyllensten U, Gustavsson I, Lindell M, Wilander E. Primary high-risk HPV screening for cervical cancer in post-menopausal women. Gynecol Oncol. 2012;125(2):343-5.

193. Dickson EL, Vogel RI, Geller MA, Downs LS. Cervical cytology and multiple type HPV infection: a study of 8182 women ages 31-65. Gynecol Oncol. 2014;133(3):405-8.

194. Tjalma WA, Depuydt CE. Don't forget HPV-45 in cervical cancer screening. Am J Clin Pathol. 2012;137(1):161-2; author reply 2-3.