



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Comparación de pruebas para la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH) en cérvix y orina de mujeres infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Claudia Marina Muñoz Díaz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2013

Comparación de pruebas para la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH) en cérvix y orina de mujeres infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Claudia Marina Muñoz Díaz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Microbiología

Director: Manuel Alfonso Patarroyo M.D., Dr.Sc.

Codirectora: Sandra Milena Camargo, B.Sc., M.Sc.

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de Investigación:

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2013

*“El éxito se alcanza convirtiendo cada paso
en una meta y cada meta en un paso”*

C. C. Cortez.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por las oportunidades que me regala a diario y por poner ángeles en mi camino que siempre hacen de mi vida una experiencia maravillosa.

Agradezco a mis padres Luis Carlos y Belsy, quienes con su ejemplo y dedicación, me han enseñado el verdadero sentido de la vida.

A mis hermanas Karen y Shirly, por el apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

A Walker, por el acompañamiento continuo y por toda su paciencia en este recorrido.

A mis amigas Milena y Sara, quienes con su apoyo, conocimiento y excelente visión de trabajo en equipo, han hecho posible la realización de este proyecto.

A Ricardo Sánchez, quien con sus aportes epidemiológicos y psiquiátricos ha contribuido determinadamente en el éxito de todos los proyectos de VPH.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia y en especial a los Doctores Manuel Elkin y Manuel Alfonso Patarroyo quienes con su constante afán de generar conocimientos, impulsan el avance de los trabajos de investigación y la formación de sus investigadores.

Al Doctor Antonio Pérez Prados, por su apoyo incondicional para la ejecución de los proyectos de VPH.

Al Posgrado Interfacultades en Microbiología, en especial a las Profesoras Marta Fontanilla y María Teresa Reguero, por todas sus enseñanzas académicas y personales.

A la Agencia Vasca de Cooperación para el Desarrollo y la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, por apoyar la financiación de este proyecto.

A Asistencia Científica de Alta complejidad S.A.S., por su contribución en la logística para la inclusión de las mujeres en este estudio y al laboratorio IDIME por el interés y colaboración durante la colecta de muestras y entrega oportuna de los resultados de la citología cervical.

A los pasantes y tesistas que colaboraron con la obtención de estos resultados: Camilo Jaimes, Duby Botero, Ángela Osorio y Alejandro Gómez.

Resumen

En el desarrollo y progresión de Cáncer de Cérvix (CC), además de la infección con Virus de Papiloma Humano (VPH), existen factores asociados como la inmunosupresión ocasionada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Los programas de prevención de CC basados en la citología, presentan limitaciones que han llevado a explorar muestras alternativas como la de orina. El objetivo de este trabajo fue determinar las frecuencias de infección y distribución tipo-específica de VPH en cérvix y orina en mujeres VIH positivas, y establecer sus características operativas. Se determinó una alta prevalencia de infección por VPH (70,1% en cérvix y 63,9% en orina), siendo el tipo VPH-16 el más prevalente en los dos tipos de muestra. Las características operativas de las dos fuentes de muestra fueron comparables. Adicionalmente, se encontró una asociación positiva entre anormalidad cervical y la detección viral en orina. En conclusión, la detección de VPH en muestra de orina es una herramienta que contribuye en el mejoramiento de los programas de tamización cervical, por su economía, practicidad, aceptabilidad y características operativas similares a las ofrecidas por la muestra cervical.

Palabras clave: Virus de Papiloma Humano; Virus de Inmunodeficiencia Humana; cáncer de cérvix; muestra cervical; muestra de orina; características operativas.

Abstract

In addition to the infection with Human Papillomavirus (HPV), other factors are associated with the development and progression of Cervical Cancer (CC), such as the immunosuppression caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV). The CC prevention programs based on cytology have certain limitations that have led to explore alternative sample sources, such as urine. This study aimed at determining the frequency of infection and type-specific distribution of HPV in cervical and urine samples from HIV-infected women, and to determine the operative characteristics. High prevalence of HPV infection was found (70.1% in cervical and 63.9% in urine samples, respectively); HPV-16 was the most prevalent viral type in both sample sources, being the operating characteristics of them comparable. Positive association was found between cervical abnormalities and viral detection in urine. In conclusion, the detection of HPV in urine might become a useful tool to improve cervical screening programs due to its low cost, ease to obtain, acceptability and operational characteristics similar to those offered by the cervical sample.

Keywords: Human papillomavirus; human immunodeficiency virus; cervical cancer; cervical sample; urine sample; operative characteristics.

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Capítulo 1: Formulación del problema	5
1.1 Planteamiento del problema	5
1.2 Justificación	6
1.3 Preguntas de investigación	8
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo general	9
1.4.2 Objetivos específicos	9
2. Capítulo 2: Marco conceptual	11
2.1 Biología de los Virus del Papiloma Humano	11
2.1.1 Estructura y genoma	11
2.1.2 Ciclo de vida	13
2.1.3 Clasificación.....	14
2.2 Relación del Virus de Papiloma Humano con el Cáncer de Cérvix	16
2.3 Historia natural de la carcinogénesis cervical	17
2.4 Factores de riesgo involucrados en la carcinogénesis cervical	17
2.5 Coinfección entre Virus de Inmunodeficiencia Humana y Virus de Papiloma Humano	18
2.6 Estrategias para prevenir el impacto del Cáncer Cervical	20
3. Marco metodológico	23
3.1 Población de estudio	23
3.2 Aspectos éticos.....	23
3.3 Toma de las muestras	24
3.4 Procesamiento de las muestras.....	24

3.5	Identificación genérica de infección con VPH	25
3.6	Identificación tipo-específica de las muestras infectadas con VPH.....	26
3.7	Condiciones de amplificación de los protocolos de PCR	28
3.1	Análisis estadísticos	31
4.	Capítulo 4: Resultados	32
4.1	Características de la población.....	32
4.2	Detección de VPH y distribución tipo-específica.....	34
4.3	Anormalidades citológicas y presencia de VPH.....	37
4.4	Concordancia y características operativas de las pruebas moleculares	40
4.5	Factores de riesgo asociados con presencia de VPH.....	41
5.	Discusión.....	43
6.	Divulgación de los resultados	49
7.	Conclusiones y recomendaciones	50
7.1	Conclusiones.....	50
7.2	Recomendaciones.....	51
	Bibliografía	53

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Representación del genoma de VPH.	12
Figura 2. Ciclo del VPH en el epitelio.....	14
Figura 3. Clasificación filogenética de los VPH.	15
Figura 4. Sitio de anillamiento de los iniciadores GP5+/6+ y MY09/11.	26
Figura 5. Sitio de anillamiento de los iniciadores pU1M/2R.....	26
Figura 6. Características socio-demográficas y de factores de riesgo de las mujeres incluidas en el estudio.	33
Figura 7. Frecuencia relativa de infección con los tipos de VPH evaluados en cérnix y orina de las mujeres incluidas en el estudio.	35
Figura 8. Distribución del número de tipos virales presentes para cada fuente de muestra.	37
Figura 9. Concordancia de la detección genérica (A) y tipo-específica (B), a partir de las dos fuentes de muestra	40

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Iniciadores incluidos en el estudio.....	27
Tabla 2. Condiciones de amplificación para cada protocolo.....	29
Tabla 3. Frecuencia relativa de infección por VPH y distribución tipo-específica a partir de muestra de cervix y orina	36
Tabla 4. Razones de disparidad (ORs) para la detección de infecciones por múltiples tipos de VPH para cada prueba molecular en las dos fuentes de muestra.....	36
Tabla 5. Detección de VPH en muestras de cervix y orina de acuerdo al hallazgo citológico.....	38
Tabla 6. Indicadores de asociación (ORs) entre la detección de VPH y los hallazgos citológicos.....	39
Tabla 7. Características operativas de las pruebas moleculares para la detección de infección de VPH en muestra cervical y de orina	41
Tabla 8. Descripción de las características socio-demográficas y de factores de riesgo, con su correspondiente fuerza de asociación, en las dos fuentes de muestra (cervical y de orina).....	42

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
n	Número

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
χ^2	Prueba χ^2
κ	Coeficiente kappa

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ADN</i>	Ácido Desoxiribonucleico
<i>ASCUS</i>	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
<i>CC</i>	Cáncer de Cérvix
<i>CITV</i>	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
<i>DS</i>	Desviación Estándar
<i>FIDIC</i>	Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
<i>HSIL</i>	Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado
<i>IC</i>	Intervalos de Confianza
<i>IDIME</i>	Instituto de Diagnóstico Médico
<i>LSIL</i>	Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado
<i>n.c.</i>	No calculable
<i>ORs</i>	Odds Ratios
<i>PCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>Ref</i>	Categoría de Referencia
<i>VIH</i>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<i>VP</i>	Virus de Papiloma
<i>VPH</i>	Virus de Papiloma Humano
<i>VPH-AR</i>	Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo
<i>VPH-BR</i>	Virus de Papiloma Humano de Bajo Riesgo
<i>VPN</i>	Valor Predictivo Negativo
<i>VPP</i>	Valor Predictivo Positivo

Introducción

Los Virus de Papiloma Humano (VPH) han sido relacionados con una serie de enfermedades, entre las cuales el Cáncer de Cérvix (CC) es la más ampliamente estudiada. La relación de causalidad ha sido bien establecida, generando una elevada carga de morbi-mortalidad en la población femenina a nivel mundial, con mayor impacto en los países en vías de desarrollo, donde se presentan el 85% de los casos, ocupando el segundo lugar en incidencia y mortalidad [1].

En Colombia, según el último reporte de la organización mundial de la salud para 2010, se presentó una incidencia de 32,4 casos/año/100.000 mujeres, asociada a una mortalidad de 18,2 casos/año/100.000 mujeres [2].

Teniendo en cuenta la relación entre la presencia de infección por VPH y el desarrollo de CC, se han llevado a cabo estudios acerca de la frecuencia de infección en diferentes poblaciones del mundo [3]. Para el caso de Colombia, estudios en población bogotana han reportado una prevalencia viral de 14,8% y un porcentaje de infección por más de un tipo viral (coinfección) del 20-30% [4, 5]. En estudios transversales realizados por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), se incluyeron mujeres de diferentes grupos étnicos y sitios de origen, y se reportaron frecuencias de infección por VPH del 50% [6-8].

Sin embargo, se ha descrito que en la población general, a pesar de que se pueden presentar altas tasa de infección, los porcentajes de regresión espontánea son elevados, por lo que del total de mujeres infectadas con VPH, solo el 10% presentan una infección persistente luego de cinco años, y de ellas, alrededor del 50% desarrollan lesiones de alto grado o CC [9].

Aunque se ha descrito que la infección persistente con VPH es una causa necesaria para el desarrollo de CC, existen otros factores de riesgo involucrados en la progresión de la

enfermedad [10], entre los cuales se destacan características como: edad, grupo étnico, factores relacionados con el comportamiento sexual (inicio temprano de la vida sexual y número de compañeros sexuales), algunos hábitos como el uso prolongado de anticonceptivos hormonales y el tabaquismo, y las características relacionadas con la capacidad del sistema inmune del hospedero para controlar y depurar la infección.

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es la infección de transmisión sexual más frecuente en la actualidad, caracterizada por la falla del sistema inmune, que limita la eficiencia del organismo para actuar contra otros patógenos [11]; en el caso de la infección por VPH, el riesgo aumenta aproximadamente 6 veces [12], presentando una mayor frecuencia de infecciones múltiples, una disminución significativa de las tasas de depuración que se relaciona directamente con la disminución de los niveles de CD4+ [13] y la aparición de lesiones refractarias al tratamiento [14].

Estudios acerca de la frecuencia de aparición de VPH en población infectada con VIH, han reportado prevalencias superiores al 70% [15], siendo VPH-16 el tipo más frecuentemente encontrado sin embargo, la distribución de los demás tipos de VPH es variable [16]. Adicionalmente, se ha reportado que la infección por varios tipos de VPH en forma simultánea (coinfección) es muy frecuente en esta población [13], no obstante, en Colombia no existen estudios dirigidos a determinar la frecuencia de diferentes tipos virales en pacientes infectadas con VIH.

La estrategia más utilizada para reducir el impacto del CC a nivel mundial es la citología cervical [17], que se enfoca en la detección temprana de anormalidades celulares en el cérvix no obstante, en el caso de mujeres infectadas con VIH, esta prueba es poco sensible, lo que ha llevado a la evolución de las pautas de detección citológica. Estas pautas incluyen actualmente una prueba cada seis meses durante el primer año, y de ser reportadas como negativas para anormalidad cervical, se realiza un esquema anual [18].

La citología cervical detecta cambios celulares que solo se visualizan en estadios avanzados de la infección por VPH [19], por lo que se han venido implementando técnicas moleculares que permiten la identificación del ADN de VPH de forma sensible y específica, incluso cuando se trata de infecciones con un número bajo de copias virales [20], para esto se ha implementado principalmente la técnica de Reacción en Cadena de

la Polimerasa (PCR), que se basa en el empleo de iniciadores para detectar secuencias específicas del ADN viral. Una de las dificultades de este tipo de técnicas es que la fuente de muestra sigue siendo células cervicales durante el examen citológico, por lo que la aceptabilidad entre las mujeres es reducida.

El uso métodos de muestreo diferentes al frotis cervical, buscan ser no invasivos. Las estrategias de auto-muestreo tienen una mayor aceptación entre las mujeres, lo que influiría de forma directa el cubrimiento y el seguimiento de los programas de prevención y control del CC, de especial importancia en mujeres con algún tipo de compromiso inmunológico [16].

Dentro de las técnicas de auto-muestreo, se ha trabajado en los dispositivos tipo tampón, frotis vaginales y muestras de orina, siendo esta última la más utilizada por su fácil obtención, confiriendo una mayor aceptación en la población, por lo que ha sido utilizada para la detección de otros patógenos de transmisión sexual que afectan la zona cervical [21]. Sin embargo, esta fuente de muestra presenta algunas limitaciones para la detección molecular de VPH, entre ellas la baja carga celular, por no provenir directamente del sitio de la infección; esto podría significar que los resultados obtenidos en este tipo de muestra pueden no reflejar el verdadero estado clínico de la infección. Otras limitaciones son la presencia de posibles inhibidores y el sesgo relacionado con el momento de toma de muestra [22].

A pesar de sus limitaciones, usar muestras de orina como una prueba para detectar la presencia de ADN de VPH, podría facilitar la frecuente toma de muestras, debido a su practicidad y una mayor aceptación entre las mujeres. Esto podría ser útil en estudios de seguimiento donde un gran número de muestras es requerido, además podría evitarse el examen pélvico, lo que significa que la toma de muestra no afectaría a la historia natural de la infección por VPH por no generar micro-lesiones [19].

Teniendo en cuenta que la información disponible acerca de la identificación de VPH en muestra de orina es variada, el presente estudio tiene como objetivo determinar las prevalencias de infección con VPH y la distribución tipo-específica de seis tipos de VPH de Alto Riesgo (VPH-AR) y dos tipos de Bajo Riesgo (VPH-BR), en muestras emparejadas de cervix y de orina de mujeres infectadas con VIH (con diagnóstico

confirmado por Western blot), que acuden al programa de prevención y control del CC ofrecido por Asistencia Científica de Alta Complejidad.

Adicionalmente, este estudio evaluará las características operativas de las dos fuentes de muestra, con el propósito de comparar la eficiencia en la detección de VPH y la asociación con el hallazgo citológico, con el fin de proponer el empleo de fuentes alternativas de muestra que permitan la inclusión de un mayor número de mujeres en los programas de prevención y control del CC. Finalmente, con el desarrollo del presente trabajo se podrá contribuir en el conocimiento epidemiológico de los patrones de infección de VPH de la población colombiana infectada con VIH.

1. Capítulo 1: Formulación del problema

1.1 Planteamiento del problema

El Cáncer de Cérvix constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial [23]. En Colombia, este tipo de cáncer ocupa el primer lugar en mortalidad, seguido del cáncer de mama [1]. La infección con VPH (VPH), es el principal factor asociado al desarrollo de CC, siendo determinante en la progresión de la enfermedad cervical [24].

Además de los factores de riesgo asociados al virus (genotipo viral infectante y presencia de infección simultánea por más de un tipo de VPH), existen factores asociados al huésped, que favorecen el progreso de la historia natural de la enfermedad cervical [25], siendo la inmunosupresión uno de los principales factores asociados a la progresión a neoplasia cervical [12].

La más estudiada de las inmunosupresiones es la ocasionada por el VIH, que infecta principalmente linfocitos T CD4+, disminuyendo así la respuesta inmune celular [12], la cual es el principal mecanismo de defensa del organismo frente a la infección por VPH. La disrupción de este mecanismo de defensa, explica en parte por qué el CC es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres diagnosticadas con VIH [26].

La presencia de VPH generalmente es determinada cuando ocurren cambios morfológicos a nivel celular que son evidenciados a través de la citología cervical, por lo que constituye una herramienta que ha contribuido significativamente a la reducción de las tasas de incidencia y mortalidad ocasionada por CC [17].

A pesar de que la citología cervical no es considerada como prueba diagnóstica, se ha descrito que al ser incorporada en programas de cribado sistemáticos y rigurosos, se ha logrado reducir la carga del CC. Lo anterior se relaciona de forma directa con la cobertura

y eficiencia de los programas de prevención, implementados en la población en riesgo, lo cual ha sido ampliamente corroborado en países desarrollados [17].

Sin embargo, la citología cervical presenta ciertas limitaciones relacionadas con la incomodidad de la toma de muestra para las usuarias, por lo que en ciertas poblaciones es difícil de implementar (por condiciones religiosas, culturales, entre otras), además, se considera un método invasivo, por lo que requiere de personal entrenado para su ejecución, tiene moderada sensibilidad e identifica lesiones que podrían estar relacionadas con enfermedad cervical avanzada [19].

Gracias al establecimiento del vínculo entre la infección persistente con VPH y el desarrollo de CC [24], se han implementado pruebas moleculares que tienen como objetivo detectar de forma específica el ADN viral, en cualquier momento de su ciclo de vida, permitiendo así la identificación de las mujeres en riesgo de desarrollar CC [26].

Se ha demostrado que la identificación de VPH por técnicas moleculares ofrece un buen comportamiento diagnóstico para la tamización de mujeres en riesgo de desarrollar anomalías cervicales [27]. Considerando que este tipo de estrategias han sido realizadas a partir de muestra provenientes de raspado cervical y esta muestra se obtiene durante la citología cervical, la toma estaría influenciada por las mismas limitaciones.

Con el fin de reducir las desventajas relacionadas con la toma de muestra, se han propuesto algunas alternativas como los dispositivos tipo tampón y la muestra de orina, siendo esta última la de mayor aceptabilidad entre las mujeres; esto que podría influir en el incremento de la adherencia a los programas de tamización y su continuidad en el tiempo. Por ende es necesario llevar a cabo estudios que contribuyan en el conocimiento de la detección viral y el comportamiento diagnóstico de este método de muestreo.

1.2 Justificación

El Cáncer de Cérvix es el tercer cáncer en frecuencia de aparición a nivel mundial, presentando un mayor impacto en países en vías de desarrollo, donde se ha reportado

hasta el 85% de los casos. El CC causa cerca de 275.000 muertes al año, situándose como el segundo cáncer más común en las mujeres alrededor del mundo [1].

En Colombia, es el segundo cáncer más frecuente en incidencia (36,4 casos por 100.000 mujeres/año) y el primero en mortalidad dentro de los cánceres que afectan a la mujer (18,2 muertes por 100.000 mujeres/año). Por lo anterior, el CC es considerado un problema de salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo, donde las estrategias para la prevención y el control de la enfermedad no han sido efectivos [19].

El ADN de VPH se detecta en más del 99% de los casos de CC, siendo la infección viral persistente el principal factor para el desarrollo de este tipo de cáncer. No obstante, se han descrito otros factores de riesgo que facilitan la adquisición, persistencia de la infección y/o la progresión de las lesiones cervicales, algunos de ellos asociados al virus (como el tipo viral infectante, persistencia de la infección, carga viral) y otros asociados al huésped (como características socio-demográficas, conducta sexual e inmunosupresión, como en el caso de la disminución de la respuesta inmune causada por el VIH).

Debido a la asociación entre la infección persistente por VPH y el desarrollo de neoplasia cervical, se plantea que la detección de VPH en muestras provenientes de cervix puede ser una opción para identificar mujeres en riesgo de desarrollar lesiones de mal pronóstico que progresen a CC; no obstante, este método de toma de muestra implica un procedimiento que resulta incómodo para las mujeres, requiere que los centros de salud tengan una infraestructura adecuada para la toma de la misma, y entrenamiento especial del personal encargado, procesos que directa e indirectamente afectan la adherencia y el desarrollo de los programas de tamización.

En esta medida, la detección de ADN del VPH en orina es factible y puede convertirse en una herramienta útil, siempre y cuando se cuente con procedimientos estandarizados. Así, la implementación de este método no invasivo, de auto-muestreo en los programas de tamización existentes, podría tener un impacto favorable en la aceptabilidad de las mujeres, lo que a su vez permitiría la tamización de grandes poblaciones, la detección de mujeres con infección en estadios tempranos y brindaría una mayor adherencia a los

programas de tamización, con la participación activa de las mujeres por las ventajas que esta muestra proporciona.

Teniendo en cuenta esto, es relevante evaluar nuevas estrategias que contribuyan al conocimiento de la historia natural de la infección por VPH, y que a futuro permitan proponer la implementación de nuevos métodos de tamización o refuerzo de los actualmente utilizados. El fortalecimiento de los programas de prevención basados en la educación y capacitación de las mujeres, pueden contribuir a la reducción del impacto de esta enfermedad en las mujeres, principalmente en aquellas infectadas con VIH de nuestro país.

1.3 Preguntas de investigación

- ✓ ¿Cuál es la frecuencia de infecciones únicas y múltiples de VPH en muestras de cérvix y orina de mujeres colombianas infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana?
- ✓ ¿Es la distribución de seis tipos de VPH de Alto Riesgo y dos de Bajo Riesgo diferencialmente detectable en muestras de cérvix y orina obtenidas de la población de estudio?
- ✓ ¿Existen diferencias en las características operativas de las pruebas para la detección de VPH realizadas a partir de células cervicales y de orina de las mujeres incluidas en el estudio?
- ✓ ¿Presenta alguno de los factores de riesgo previamente reportados en la literatura asociación con la determinación de presencia de infección en cada tipo de muestra (cérvix y orina) de la población de estudio?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Comparar las pruebas para la detección de Virus de Papiloma Humano en cervix y orina, obtenidas de mujeres infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana.

1.4.2 Objetivos específicos

- ✓ Describir las características socio-demográficas, clínicas, de comportamiento sexual y factores de riesgo de las mujeres que participan en este estudio.
- ✓ Determinar la frecuencia de infección de VPH en las muestras de cervix y orina, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con diferentes juegos de iniciadores genéricos (GP5+/6+, MY09/11 y pU1M/2R).
- ✓ Describir la identificación tipo-específica para seis tipos de Alto Riesgo (VPH-AR) (VPH-16, -18, -31, -33, -45 y -58) y dos tipos de Bajo Riesgo (VPH-BR) (VPH - 6/11).
- ✓ Determinar las características operativas de las pruebas para la detección de VPH en cervix y orina.
- ✓ Identificar la eventual asociación entre la presencia de factores de riesgo y la detección de infección con VPH en cervix y orina.

2. Capítulo 2: Marco conceptual

2.1 Biología de los Virus del Papiloma Humano

Los Virus de Papiloma (VP), pertenecen a la familia *Papillomaviridae*; estos virus cuentan con amplia distribución en la naturaleza e infectan desde aves hasta mamíferos, incluyendo humanos [28]. Las especies que infectan humanos (VPH), pertenecen al grupo de virus que infectan epitelios de la piel o tejidos internos, por lo que han sido clasificados en los que tienen tropismo cutáneo y mucoso; estos últimos a su vez, han sido divididos en VPH de alto y bajo riesgo (VPH-AR y VPH-LR, respectivamente), dependiendo de su potencial para desarrollar lesiones, por lo que son considerados de importancia en Salud Pública [29, 30]

2.1.1 Estructura y genoma

Los VPHs se caracterizan por ser pequeños, miden aproximadamente 55 nm de diámetro y son virus desnudos (no cuentan con una envoltura externa) con una cápside icosaédrica, compuesta por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) [28].

Su genoma consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena de 8.000 pb [31] dividida en tres regiones (Figura 1): una región que codifica para proteínas tempranas (E: del inglés *Early*, tamaño aproximado de 4.000 pb), llamada así por su momento de aparición dentro del ciclo replicativo del virus, esta región se caracteriza por codificar las proteínas no estructurales (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8), necesarias para los procesos de replicación, transcripción y cito-transformación; la región tardía (L: del inglés *Late*, tamaño aproximado de 3.000 pb) codifica para las dos únicas proteínas estructurales (L1 y L2), las cuales, en conjunto, conforman la cápside viral; y finalmente, una región regulatoria (URR de la sigla en inglés: *Upstream Regulatory Region*, de

aproximadamente 1.000 pb), descrita como una región no codificante, que contiene elementos reguladores de la expresión y transcripción de las proteínas virales [32].

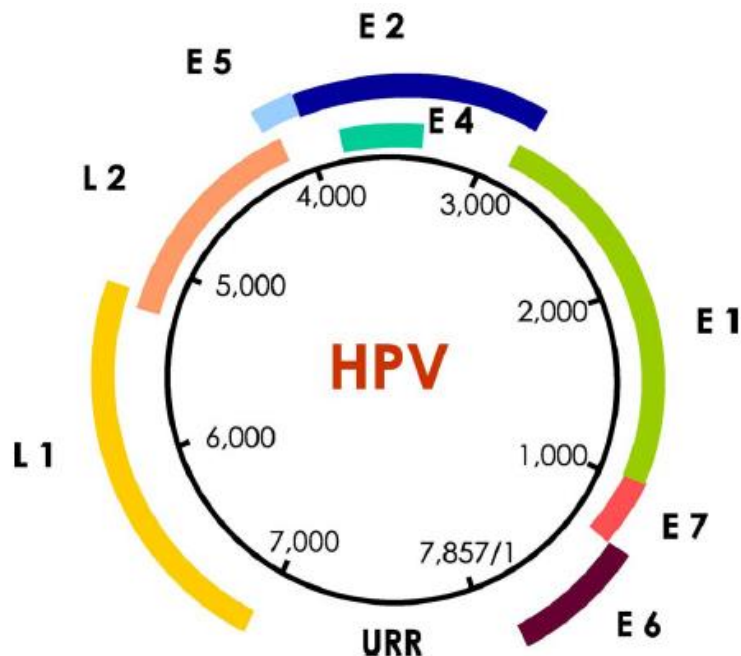


Figura 1. Representación del genoma de VPH [33].

El genoma contiene ocho marcos de lectura abiertos, que son expresados a partir de ARN mensajeros policistrónicos [34], a partir de los cuales se transcriben las ocho proteínas virales, cuyas funciones incluyen: inicio del proceso de replicación del genoma viral (por parte de E1), regulación de los elementos transcripcionales de la URR (por parte de E2, a manera de factor de transcripción) [35], estimulación de la actividad transformante, evitando la acidificación de los endosomas (por parte de la proteína E5, que además favorece el reciclaje de los factores de crecimiento celular) [36] y la modificación del cito-esqueleto para facilitar la liberación de los viriones (a cargo de la proteína E4, que actúa al final del ciclo replicativo) [33].

Sin embargo, la principal estrategia para el proceso de transformación del epitelio está a cargo de las proteínas E6 y E7, que son las encargadas, en el caso de las E6, de interactuar con p53, bloqueando la apoptosis, y con factores de transcripción celulares (como p300 y CBP), aumentando el tiempo de vida celular por la sobre expresión de la telomerasa y, por otra parte de E7, de interactuar con la proteína de retinoblastoma (pRB), alterando su funcionalidad, lo que evita la regulación del crecimiento celular [32].

Las proteínas estructurales (L1 y L2) permiten el ensamblaje de los viriones en las capas superficiales del epitelio, para lo cual L1 interactúa con L2 a través de un dominio hidrofóbico ubicado en la región carboxi-terminal de L2, ésta última despliega un dominio de unión al ADN viral y un epítipo que permite el reconocimiento inmune [37]. La proteína mayoritaria L1 (proporción 5:1 con respecto a L2) está implicada en la invasión del virus a las células epiteliales [36].

2.1.2 Ciclo de vida

Los viriones ingresan en el epitelio a través de micro-abrasiones o lesiones, que permiten el contacto entre la partícula viral con las células basales del epitelio. El complejo integrina $\alpha 6 - \beta 4$ ha sido propuesto como receptor de membrana que permite la entrada del virus, y los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, podrían actuar como co-receptores, permitiendo un reconocimiento inicial [38, 39].

La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina o caveola, seguido del posterior desensamble del virión a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, a causa del ambiente reductor de la célula, lo que permite la liberación y transporte del ADN viral al núcleo [40].

Posteriormente, el genoma se puede mantener en dos formas diferentes: i) la forma episomal, durante la cual el ADN de VPH se mantiene en bajo número de copias debido a la acción de las proteínas E1 y E2, lo que da lugar a una infección persistente, definida como permanencia del virus en el núcleo de las células de la capa basal, replicándose como un plásmido multicopia de manera estable (episoma), pero sin la producción de virus infeccioso. Bajo la influencia de ciertos factores endógenos y exógenos (inmunodepresión local o general) no demasiado conocidos todavía, se podría promover el avance al siguiente estadio de la infección que corresponde a ii) la forma productiva del virus, donde se da la integración del ADN del VPH al de la célula. Esta fase usualmente está relacionada con pérdida de parte del genoma viral, que incluye la disrupción en la expresión de E2, y la proliferación de las células infectadas en la capa basal del epitelio, que debe estar precedida por la expresión de las proteínas E6 y E7 (Figura 2) [33].

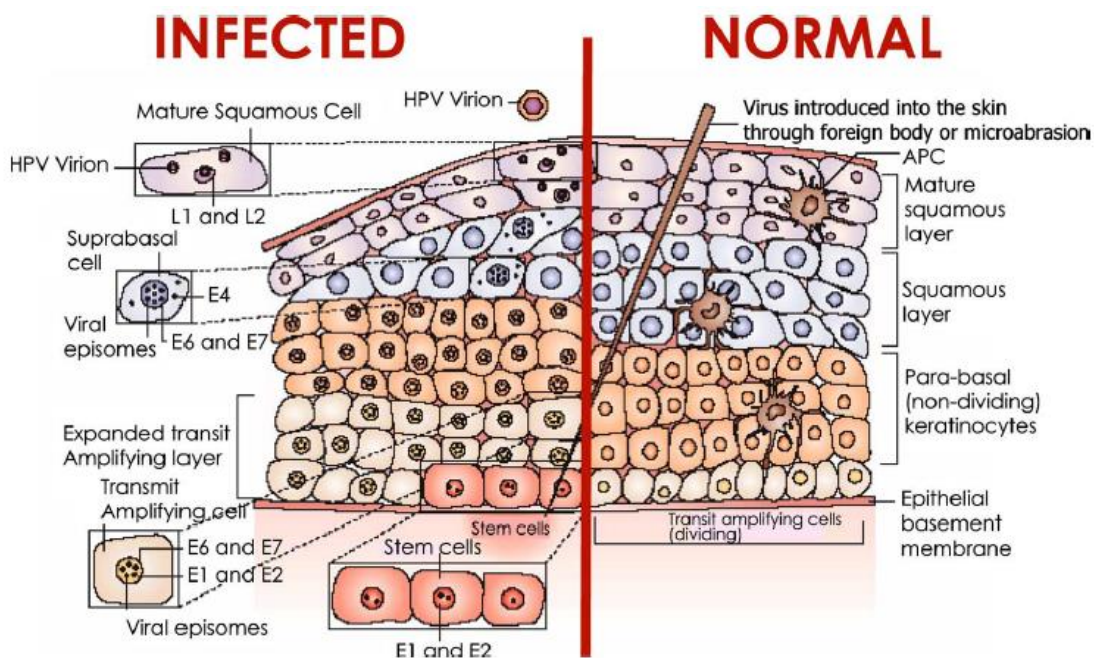


Figura 2. Ciclo del VPH en el epitelio [33].

De esta forma, para que se complete el ciclo de vida del VPH, se debe dar una replicación eficiente del genoma viral y un posterior empaquetamiento de los viriones infecciosos, que se desarrolla en las capas superiores del epitelio. Finalmente, las células infectadas pueden ser liberadas y permanecer en el medio, antes de que el VPH pueda volver a entrar en la capa basal del epitelio [36].

2.1.3 Clasificación

La clasificación taxonómica de los papilomavirus ha sido propuesta por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV), con base a la similitud en el marco de lectura abierto de L1 (la proteína más conservada entre los papilomavirus) de 118 tipos que cuentan con la secuencia completa de su genoma [31].

Teniendo en cuenta esta información, los tipos virales que integran la familia *Papillomaviridae* han sido agrupados en géneros denominados por letras griegas, siendo los *Alfa*, *Beta* y *Gama* papilomavirus los más estudiados; esta clasificación permitió dividirlos en géneros, especies, tipos, subtipos y variantes; los diferentes géneros comparten menos del 60% de identidad, las especies de un género comparten una

identidad de secuencia de 60 a 70% y los tipos virales dentro de una especie comparten entre un 71 a 89% de identidad [31]. El árbol filogenético se observa en la Figura 3.

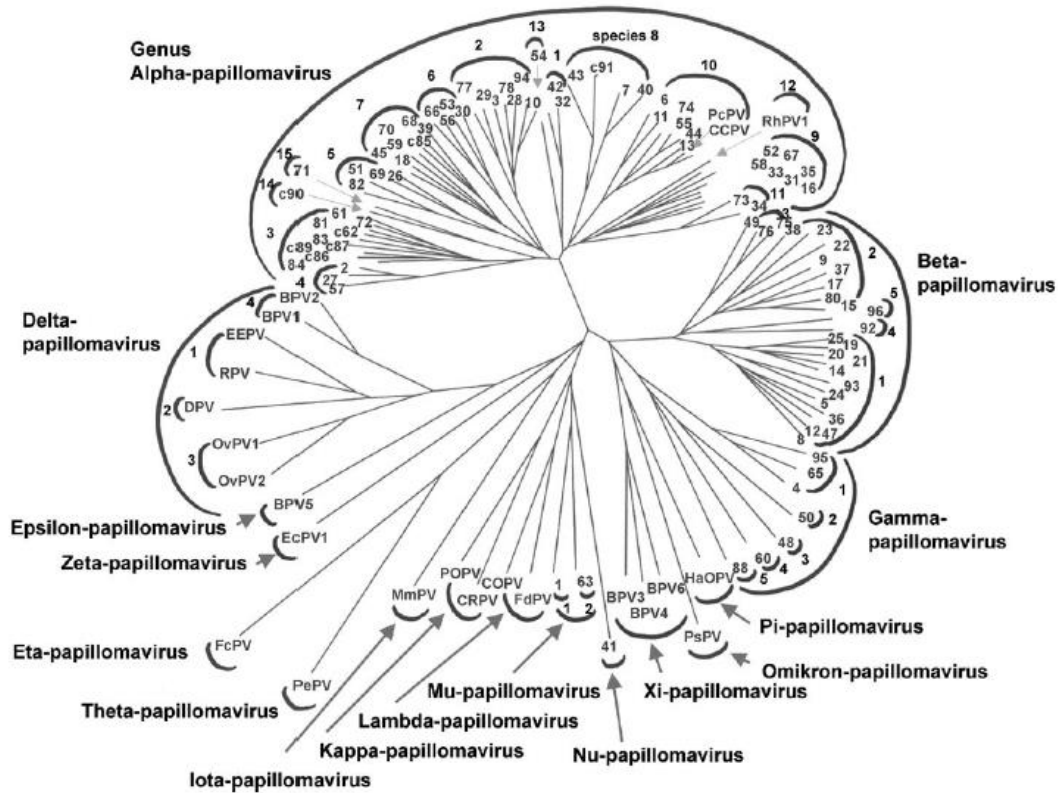


Figura 3. Clasificación filogenética de los VPH [31].

Con base en esta información, se puede concluir que los PV se agrupan en 16 géneros, de los cuales, los géneros *Alfa*, *Beta*, *Gama*, *Mu* y *Nu* infectan a humanos [41], mientras que los géneros restantes comprenden exclusivamente tipos virales encontrados en varios mamíferos y aves.

Se ha descrito que el género más importante en el área clínica es el *Alfa-papillomavirus*, ya que en este grupo están incluidos tipos virales que poseen capacidad para desarrollar lesiones cervicales (potencial oncogénico). A este género pertenecen los tipos VPH-16 y -18, que son los más frecuentemente detectados en cerca del 70% de los casos de CC (prevalencia de 54,6% y 15,8%, respectivamente), junto a los tipos VPH-33, -45, -31, -52, -58 y -35, que en conjunto son detectados en más del 85% de los casos de CC [42].

2.2 Relación del Virus de Papiloma Humano con el Cáncer de Cérvix

El Cáncer de Cérvix es el tercer cáncer más frecuente en el mundo, con más de 453.000 casos al año y ocasiona aproximadamente 242.000 muertes al año. Es la tercera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres a nivel mundial y se estima que el 85% del total de casos se presentan en países en vías de desarrollo [1].

El CC es considerado como una enfermedad de transmisión sexual, cuya relación causal con la infección por VPH ha sido ampliamente establecida, debido a que el ADN viral ha sido detectado en más del 99% de los casos diagnosticados para este tipo de cáncer [24]. Se ha descrito que la transmisión de VPH se da principalmente por contacto directo piel a piel y estudios epidemiológicos indican que el riesgo de contraer una infección genital por este virus está influenciado por la conducta sexual [33].

Las lesiones precursoras a la neoplásica ocurren en mujeres menores de 40 años, mientras que el desarrollo de CC se presenta en edades más avanzadas, en promedio de 54 años [43]. En Colombia, este tipo de cáncer es el segundo más frecuente en incidencia, y el primero en mortalidad dentro de los cánceres malignos que afectan a la mujer. Según el último reporte de la Organización Mundial de la Salud, la incidencia es de 36,4 casos por 100.000 mujeres/año y la mortalidad de 18,2 por 100.000 mujeres/año [2, 44].

Además de ser una de las neoplasias más frecuentes e importantes en mujeres, el CC también tiene importancia e impacto social, ya que provoca mortalidad en mujeres en edad fértil, esto debido en gran medida a la inexistencia o insuficiencia de los programas de detección precoz, y a la ausencia de estrategias de tratamiento adecuada. Por esta razón, se están tratando de implementar acciones enfocadas a la prevención y control de la enfermedad cervical, basadas en la detección molecular de los genotipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo [42].

2.3 Historia natural de la carcinogénesis cervical

Las infecciones genitales con VPH habitualmente son transitorias y asintomáticas (la duración promedio de la infección suele ser de 8 meses); en este periodo, alrededor del 80% de las mujeres depuran la infección viral. El restante 20% de las mujeres desarrollarán Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), sin embargo, en este último grupo se conserva la capacidad de depuración de la infección y de regresión de las lesiones cervicales, por lo que 80% de estas consiguen la eliminación del virus. Finalmente, solo un pequeño grupo sufrirá una infección persistente con VPH y la lesión progresará de NIC a cáncer cervical invasivo [45].

Se cree que el desarrollo gradual de una respuesta inmunitaria eficaz es el mecanismo más probable para la depuración del VPH; sin embargo, es posible que el virus permanezca en un estado latente indetectable y luego se reactive años después debido a la presencia de estímulos, como sucede en mujeres con menopausia o post-menopáusicas, en las que la reactivación se da debido a los cambios hormonales. Otro estímulo descrito es la senescencia del sistema inmune, lo cual podría explicar el aumento de la frecuencia de infección por VPH en mujeres de mayor edad, a pesar de llevar una relación monógama por largo tiempo [46].

2.4 Factores de riesgo involucrados en la carcinogénesis cervical

Se ha identificado que el principal factor para el desarrollo de CC, es la infección persistente con VPH. Entre los distintos tipos de papilomavirus que infectan humanos, 15 han sido descritos como de alto riesgo (VPH-AR), por su elevado potencial oncogénico (VPH -16, -18, -31, -33, -35, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, y -82), sin embargo, se ha reportado que la mayoría de las lesiones son causadas por 6 tipos particulares: VPH-16, -18, -31, -33, -45 y -58 [42].

Teniendo en cuenta esta relación causal, se ha avanzado en la descripción de los factores de riesgo asociados al virus, que resultan determinantes en el progreso de la historia natural de la enfermedad; dentro de ellos se destacan: el genotipo viral

infectante, la infección simultánea con más de un tipo de VPH (relacionada principalmente con mayor severidad de las lesiones) [7] y la carga viral, definida como el número de copias de un tipo de VPH presentes por célula del hospedero, la cual se correlaciona con el grado de avance de la enfermedad cervical [47].

Adicionalmente, se han descrito cofactores del huésped que podrían estar relacionados con una mayor adquisición y/o persistencia de la infección, así como en la regresión y/o progresión de las lesiones preneoplásicas [48]; dentro de estos factores se destacan algunas características como edad [49], grupo étnico [7], factores relacionados con el comportamiento sexual (incluyendo variables como el inicio temprano de las relaciones sexuales, múltiples compañeros sexuales y el uso prolongado de anticonceptivos hormonales), la paridad, la exposición a otras infecciones de transmisión sexual, el tabaquismo [25], variación en los genes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y, finalmente, alteraciones en la inmunidad (infección por VIH o tratamiento inmunosupresor) [48, 50].

Finalmente, otras variables que influyen en las elevadas tasas de neoplasia cervical son: la presencia de dificultades en el acceso a los servicios de tamización, la no adherencia a los programas de prevención y promoción, los factores sociales asociados al bajo estrato socioeconómico y niveles de educación, situaciones que son observadas con mayor frecuencia en países no desarrollados, donde las prevalencias de VPH y de esta neoplasia son elevadas [50, 51].

2.5 Coinfección entre Virus de Inmunodeficiencia Humana y Virus de Papiloma Humano

La infección con el Virus Inmunodeficiencia Humana (VIH) es actualmente una de las causas más frecuentes de inmunosupresión en la población. Esta infección se caracteriza por la reducción en el número de linfocitos T CD4+, lo que disminuye la eficiencia del organismo para actuar contra otros patógenos, haciendo más vulnerable al individuo a infecciones concomitantes [52].

Teniendo en cuenta que las fases iniciales de la infección con VPH son localizadas, la respuesta inmune del cérvix juega un papel determinante en el control de la infección, por lo que la inmunosupresión, particularmente la ocasionada por la infección por VIH, altera e influye en el curso natural de la enfermedad cervical [14].

En este sentido, se ha descrito que mujeres con conteos de linfocitos T CD4+ menores de 200 células/mm³ presentan mayores prevalencias de infección con VPH e incremento en las tasas de incidencia de lesiones intraepiteliales cervicales, en comparación con las mujeres con recuentos de linfocitos T CD4+ mayores de 500 células/mm³, lo cual sumado a una alta carga de viral (medida en número de copias de VIH), podría incrementar 10 veces el riesgo de desarrollar este tipo de lesiones [26].

Aunque los dos virus pueden llegar a ser detectados en el epitelio cervical de zonas con lesiones, estos no tienen tropismo por el mismo tipo de células, por lo que se han descrito otro tipo de interacciones como: i) Incremento de la eficiencia de la actividad transformante de VPH gracias a la disminución de la respuesta inmune tras la infección con VIH; ii) favorecimiento de la expresión de las oncoproteínas de VPH debido a la acción de transactivadores solubles del VIH (p.ej. *tat*); iii) Activación de la replicación del VIH como consecuencia de la producción de citoquinas (como IL-6), por parte de células cervicales infectadas por VPH [12].

Debido a las interacciones antes mencionadas, las mujeres infectadas con VIH muestran un incremento en la frecuencia de infecciones con uno o múltiples tipos de VPH, lo que sumado a un sistema inmune deficiente, incapaz de eliminar el virus, aumenta el riesgo del desarrollo de CC. Adicionalmente, la condición de inmunosupresión implica el desarrollo de lesiones más agresivas y menores respuestas al tratamiento [53], esto conlleva a la aparición de lesiones precancerosas en cerca del 60% de las mujeres con infección por VPH, que evolucionan en menos de 3 años [53, 54], razón por la cual, este tipo de cáncer está catalogado como el más frecuentemente diagnosticado en mujeres infectadas con VIH [55, 56].

2.6 Estrategias para prevenir el impacto del Cáncer Cervical

La citología cervical es la herramienta de tamización más utilizada para la evaluación del estado de las células escamosas en la zona de transformación del cérvix, la cual permite la detección temprana de mujeres que cursen con lesiones de mal pronóstico y que requieran un manejo clínico adecuado e inclusión en programas de tratamiento oportuno [57].

A pesar de su conocida utilidad pronóstica, la citología cervical presenta una serie de desventajas que incluyen: una toma de la muestra incómoda para las mujeres, requiere entrenamiento especial por parte del personal de los servicios de salud que toma la muestra, y problemas técnicos como son: i) sensibilidad muy baja y variable (de un 41 – 73%) lo que se ha tratado de solucionar realizando citologías anuales en esquema 1:1:3; ii) presenta un reporte de falsos negativos variable (mujeres con lesiones precancerosas no detectadas por el test de Papanicolaou) entre 1,5 a 55% y iii) posee una naturaleza subjetiva, puesto que se basa en la interpretación individual y lector-dependiente. Por lo anterior, estas características influyen directa e indirectamente en la reducción de la participación activa por parte de las mujeres, principalmente en países en vías de desarrollo [58, 59].

Debido a las desventajas y a los bajos niveles de cobertura, técnicas de detección de ADN del VPH complementarias a la citología han sido desarrolladas, que actualmente son consideradas como herramientas con un alto valor diagnóstico y pronóstico [42, 60, 61]; estas técnicas son altamente sensibles y específicas, pudiendo además realizarse a partir de diversas fuentes de muestra [27].

Adicionalmente, se ha planteado que el uso de métodos no invasivos de auto-muestreo, brinda ventajas relacionadas al incremento de la aceptación, la adherencia y el seguimiento de las mujeres principalmente inmunocomprometidas [60, 61]. Entre los métodos de auto-muestreo más estudiados se encuentran los dispositivos tipo tampón, hisopos vaginales y la muestra de orina; esta última fuente de muestra ha sido empleada en la detección de patógenos de transmisión sexual que afectan el cérvix [15, 22].

La utilización de la orina como muestra para la detección de VPH implica varias ventajas, tales como: i) fácil obtención de la muestra mediante un método no invasivo tomado por la misma paciente; ii) mayor aceptación entre las mujeres, lo que podría influir en una mayor frecuencia en la toma de muestras, valoración de grandes poblaciones y una mayor cobertura de los programas de tamización; iii) se evita el examen pélvico que requiere la citología, por lo que se obtendría, además de comodidad para las mujeres, una reducción de costos y iv) no interfiere con la historia natural de la infección, en contraste con las muestras cervicales, donde se crean micro lesiones o reacción inflamatoria en el tejido [60].

No obstante, se han descrito retos en el uso de la orina para la detección de VPH. Dentro de estos se mencionan: i) la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra como proteínas, urea o nitritos, además de bacterias y/o endo-nucleasas, que pueden deteriorar el ADN; ii) el hallazgo de ADN del VPH en orina podría indicar una infección del tracto urinario o genitales externos, afectando la especificidad; iii) la muestra no es obtenida del sitio original de la lesión sino de células exfoliadas, afectando así la sensibilidad de la prueba, dado que la detección de ADN viral puede no reflejar el estado clínico de la infección por VPH [61] y iv) la cantidad de ADN viral que se puede obtener es menor, ya que en esta muestra se encuentran células exfoliadas espontáneamente del cervix con infección persistente [21, 22, 42].

Considerando estos inconvenientes técnicos, se han propuesto algunas estrategias relacionadas con la estandarización de la toma, almacenamiento de la muestra y la necesidad de utilización de un método de detección sensible como la PCR para hacer la identificación de ADN [60], a fin de que las muestras provenientes de orina puedan ser consideradas como una buena alternativa para la identificación de VPH e indirectamente detección de mujeres con lesiones pre-neoplásicas de cervix [21]; sin embargo, se deben realizar más estudios con el fin de aportar información acerca del comportamiento diagnóstico de esta fuente de muestra.

Aunque la muestra de orina, presenta porcentajes de detección de VPH variables, encontrándose frecuencia de infección entre 44 y 45,5% en mujeres con lesiones cervicales de bajo grado, de alrededor del 11% en mujeres sin anormalidad citológica

[21, 62, 63] y superior al 70% para el caso de mujeres infectadas con VIH, se ha descrito que esta fuente de muestra podría tener aplicabilidad clínica, sobre todo en este último grupo [15, 64]; para este fin, se debe contar con procedimientos estandarizados que aseguren la calidad de los resultados.

3. Marco metodológico

3.1 Población de estudio

Este es un estudio de tipo observacional analítico de corte transversal, en el que fueron incluidas mujeres infectadas con VIH (con diagnóstico confirmado por Western blot), que acudieron al programa de prevención y control de CC, ofrecido por el centro “Asistencia Científica de Alta Complejidad S.A.S.”, en Bogotá-Colombia.

El tamaño de muestra para el estudio fue calculado asumiendo una proporción estimada de infección por VPH en mujeres VIH positivas de 83% [64], teniendo en cuenta una precisión alrededor del estimador de 0,05 y un nivel de confianza de 95%. Este análisis se realizó con el comando *sampsi* del programa STATA 11 ®.

Como criterios de elegibilidad, fueron incluidas pacientes clínicamente estables y que no estuviesen hospitalizadas en el momento de su evaluación y como criterio de exclusión, se tuvo en cuenta la presencia de alteraciones en el tracto genito-urinario que impidieran la toma de la muestra.

3.2 Aspectos éticos

Este estudio fue realizado con la aprobación y supervisión de los comités de ética de las instituciones participantes: “Comité de ética de Fundación Instituto de Inmunología de Colombia” y “Comité de ética de asistencia científica de alta complejidad S.A.S.”.

No se llevaron a cabo intervenciones experimentales, ni modificaciones intencionadas en los sujetos de investigación, por lo que este proyecto fue considerado como una investigación de bajo riesgo, según los criterios expuestos en la resolución 008430 de Octubre 4 de 1993, artículo 11, del Ministerio de Salud.

3.3 Toma de las muestras

Todas las mujeres incluidas en el estudio fueron informadas acerca del objetivo de la investigación, firmaron un consentimiento informado (anexo 1) y diligenciaron una encuesta con información de los datos socio-demográficos, de comportamiento sexual y de otros factores de riesgo relacionados tanto con la adquisición infección con VPH, como con la probabilidad de progresión de enfermedad cervical (anexo 2).

Dos tipos de muestras fueron colectadas para cada una de las mujeres que accedieron a participar en el estudio: una muestra inicial de orina a partir de auto-muestreo, que una vez recolectada fue almacenada a 4°C, hasta su procesamiento dentro de las siguientes 72 horas; el segundo tipo de muestra fue la cervical, obtenida durante examen citológico, en donde se colectaron células del cérvix utilizando un citocepillo, con el que se hizo el extendido en placa para la lectura de la citología cervical, y posteriormente fue almacenado en un tubo con etanol al 95% como medio de preservación y transporte [6, 65].

El examen citológico fue llevado a cabo siguiendo las pautas establecidas en la norma técnica para la detección temprana del cáncer de cuello uterino del Ministerio de Salud de Colombia [57]. La lectura de la placa de la citología cervical fue realizada por un laboratorio independiente (Instituto de Diagnóstico Médico, IDIME S.A). Los resultados fueron reportados siguiendo la clasificación de Bethesda [66], así: Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASCUS), Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado (LSIL) y Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado (HSIL).

3.4 Procesamiento de las muestras

Las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio de Biología Molecular de la FIDIC, donde fueron procesadas de forma independiente. El volumen total de las muestras de orina fue centrifugado a 2.300 gravedades (*g*) durante 20 minutos a 4°C. Por otra parte, las células cervicales fueron liberadas de los citocepillos por fricción mecánica, y posteriormente, la mitad del volumen fue centrifugado a 15.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, el volumen restante fue almacenado en el banco de células de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC. El ADN total fue extraído de los precipitados celulares obtenidos de los dos tipos de muestras, utilizando el kit comercial

QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Epicentre, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras fueron sometidas a protocolos de amplificación de ADN empleando la técnica de PCR.

Como primer paso, se realizó una evaluación de la integridad del ADN, a través de la amplificación de dos fragmentos del gen constitutivo celular de la β -globina humana, utilizando los iniciadores GH20/PC04 y PC03/PC04 (Tabla 1) [67].

3.5 Identificación genérica de infección con VPH

Las muestras positivas para amplificación del gen de la β -globina humana, fueron sometidas a tres protocolos para la detección genérica de VPH, previamente reportados en la literatura y dirigidos hacia dos regiones del genoma viral: la primera, corresponde a la región que codifica para la proteína viral tardía L1, para ésta, fueron empleados dos juegos de iniciadores: GP5+/6+, caracterizado por detectar infecciones con una reducida carga viral [6, 68] y MY09/11, que permite identificar mujeres infectadas con más de un tipo de VPH (co-infecciones) [6, 69] (Figura 4).

La segunda región detectada es la que codifica para las oncoproteínas E6-E7 (relacionadas directamente con la transformación celular), el iniciador empleado para esta detección fue pU1M/2R, cuya utilidad para la detección de mujeres con alto riesgo de desarrollar enfermedad cervical, ha sido reportada en estudios previos por su con alta precisión para detectar infección por VPH, en mujeres que tienen hallazgos citológicos anormales [70, 71] (Figura 5) (Ver información de los iniciadores en la Tabla 1).

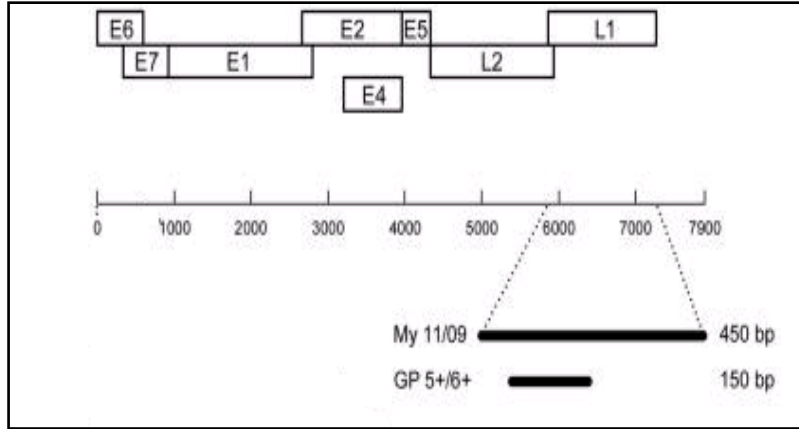


Figura 4. Sitio de anillamiento de los iniciadores GP5+/6+ y MY09/11 [72].

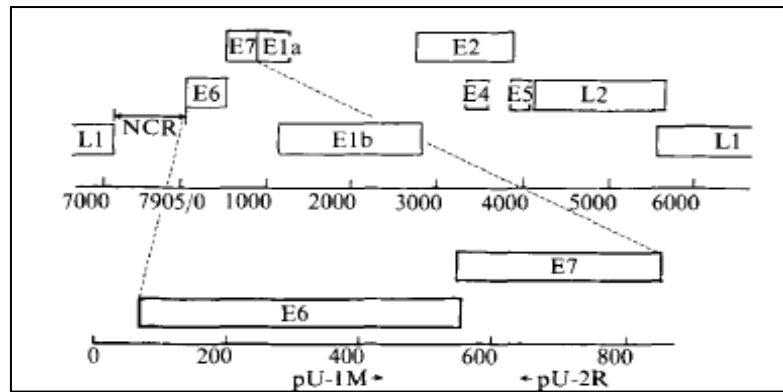


Figura 5. Sitio de anillamiento de los iniciadores pU1M/2R [70].

Los protocolos de amplificación genérica fueron aplicados simultánea e independientemente con el propósito de detectar la mayor cantidad de mujeres infectadas, puesto que ha sido reportado que el uso de más de un juego de iniciadores de detección genérica aporta robustez y sensibilidad en los estudios epidemiológicos, en comparación con el uso de un solo sistema de amplificación, que podría subestimar la prevalencia viral [20, 73].

3.6 Identificación tipo-específica de las muestras infectadas con VPH

Las muestras positivas para cualquiera de los juegos de iniciadores genéricos, fueron incluidas en protocolos de identificación viral tipo-específica para seis tipos virales de alto riesgo (VPH-AR-16, -18, -31, -33, -45, -58) (Tabla 1), relacionados con aproximadamente el 90% de los casos de CC reportados a nivel mundial [74] y considerados como los de

mayor prevalencia en estudios previos llevados a cabo en población colombiana [4, 7, 71].

Adicionalmente, el diseño metodológico incluyó un protocolo para la identificación de dos tipos de VPH de bajo riesgo (VPH-BR-6 y -11, simultáneamente) [75], considerados como los tipos de VPH-BR de mayor distribución a nivel mundial, los cuales están relacionados principalmente con el desarrollo de verrugas genitales [75]. Los iniciadores tipo-específicos fueron dirigidos a las regiones E5, E6 y E7 del genoma viral [6, 76, 77] (Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores incluidos en el estudio.

Nombre del protocolo	Iniciador	Secuencia (5' – 3')	Producto amplificado (pb)	Gen	Referencia
<i>β-globina</i>	GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	GH20/PC04: 268 PC03/PC04: 110	<i>β-globina</i> Humana	[67]
	PC03	ACACAACCTGTGTTCACTAGC			
	PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC			
GP5+/6+	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	150	L1	[72]
	GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC			
MY09/11	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	450	L1	[78]
	MY011	GCMCAGGGWCATAAYAATGG			
pU1M/2R	pU1M	TGTCAAAAACCGTTGTGTCC	228 - 268	E6/E7	[70]
	pU2R	GAGCTGTCTGCTTAATTGCTC			
VPH-16	16-D	TCAAAAGCCACTGTGTCCTGA	120	E6	[76]
	16-R	CGTGTCTTGATGATCTGCAA			
VPH-18	18-D	CGACAGGAACGACTCCAACGA	202	E6-E7	[77]
	18-R	GCTGGTAAATGTTGATGATTAAC			
VPH-31	31-D	CTACAGTAAGCATTGTGCTAT	155	E5	[76]
	31-R	ACGTAATGGAGAGGTTGCAATAACCC			
VPH-33	33-D	AACGCCATGAGAGGACACAAG	212	E7	[76]
	33-R	ACACATAAACGAACTGTGGTG			
VPH-45	45-D	ACGGCAAGAAAGACTTCGCA	134	E6-E7	[76]
	45-R	CACAACAGGTCAACAGGATC			
VPH-58	58-D	CGAGGATGAAATAGGCTTGG	109	E7	[76]
	58-R	ACACAAACGAACCGTGGTGC			
VPH-6/11	BR-D	TGCAAGAATGCACTGACCAC	334	E6-E7	[75]
	BR-R	TGCATGTTGTCCAGCAGTGT			

3.7 Condiciones de amplificación de los protocolos de PCR

Todos los protocolos de amplificación se llevaron siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 2, las cuales fueron estandarizadas con base en los reportes disponibles en la literatura citada en la Tabla 1. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador LABNET MultiGene™ Thermal Cycller (Woodbridge, NJ, USA).

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El corrido electroforético fue desarrollado en cámaras de electroforesis LABNET Enduro™ Gel XL a 100 voltios (V) durante 15 minutos. Como patrón de peso molecular se utilizó HyperLadder™ II (Bioline, London, UK) para el caso de los productos con un tamaño superior a 200 pb, e HyperLadder™ V (Bioline) en caso de productos amplificados de menor tamaño.

Como controles positivos de PCR se utilizó ADN plasmídico extraído de células Sf21 transfectadas con un vector de clonación que contiene la secuencia del gen *L1* de VPH-16 (en el caso de GP5+/6+ y MY09/11) y ADN extraído a partir de muestras previamente identificadas por secuenciación como positivas para VPH (para el caso de pU1M/2R). Los controles positivos para la identificación tipo-específica fueron genes sintéticos para los tipos de VPH-18, -31, -45 y -58 [79], y para VPH-16, -33 y -6/11 se emplearon muestras tipificadas por secuenciación. Como control negativo en todas las amplificaciones, se empleó agua destilada ultrapura, libre de DNasas y RNasas (Invitrogen).

Tabla 2. Condiciones de amplificación para cada protocolo.

Nombre del protocolo	Buffer (X)	MgCl ₂ (mM)	dNTPs** c/u (mM)	Iniciadores (μM)	Polimerasa	Condiciones de termociclado					
						Td inicial	Temperatura y tiempos de amplificación			Ciclos de amplificación	Te final (°C)
							Td	Ta	Te		
<i>β-globina*</i>	1	2,5	0,25	1	0,5 U - Biotaq †	94°C - 10 min	94°C - 1 min	55°C - 1 min	72°C - 2 min	35 ciclos	72°C - 7 min
GP5+/6+	1	3	0,1	2	1 U - Biotaq †	94°C - 10 min	94°C - 30 seg	42°C - 30 seg	72°C - 30 seg	35 ciclos	72°C - 7 min
MY09/11	1	3	0,1	2	1 U - Biotaq †	94°C - 5 min	94°C - 30 seg	51°C - 45 seg	72°C - 45 seg	40 ciclos	72°C - 7 min
pU1M/2R	1	1,5	0,2	1	1 U - MangoTaq ‡	95°C - 10 min	94°C - 1 min	53°C - 2 min	72°C - 2 min	30 ciclos	72°C - 7 min
VPH-16	1	2	0,25	1	0,5 U - MangoTaq ‡	94°C - 7 min	94°C - 30 seg	54,3°C - 30 seg	72°C - 30 seg	35 ciclos	72°C - 5 min
VPH-18	1	2,5	0,25	1	1 U - Biotaq †	95°C - 5 min	95°C - 30 seg	57°C - 30 seg	72°C - 30 seg	35 ciclos	72°C - 5 min
VPH-31	1	2	0,25	1	0,5 U - MangoTaq ‡	95°C - 7 min	95°C - 30 seg	56°C - 30 seg	72°C - 30 seg	35 ciclos	72°C - 5 min
VPH-33						95°C - 5 min	95°C - 10 seg	55°C - 10 seg	72°C - 10 seg	35 ciclos	72°C - 5 min
VPH-45	1	2	0,25	1	1 U - Biotaq †	95°C - 5 min	94°C - 1 min	65°C - 1 min	72°C - 1 min	35 ciclos	72°C - 5 min
VPH-58	1	2	0,25	1	0,5 U - MangoTaq ‡	95°C - 7 min	95°C - 20 seg	60,5°C - 20 seg	72°C - 20 seg	35 ciclos	72°C - 5 min
VPH-6/11	1	2,5	0,25	1	0,5 U - MangoTaq ‡	95°C - 5 min	95°C - 30 seg	57°C - 20 seg	72°C - 30 seg	35 ciclos	72°C - 5 min

* Agua con BSA a una concentración de 0,8 μg/μL. Aditivo utilizado para incrementar la eficiencia de la PCR, ya que actúa como una proteína captadora de iones y de otros inhibidores de la polimerasa como la melanina [80]. ** dNTP Mix™ (Bioline). † BioTaq™ DNA Polymerase (Bioline). ‡ MangoTaq™ DNA Polymerase (Bioline). Ta: Temperatura de anillamiento. Te: Temperatura de extensión. Td: Temperatura de denaturación.

3.1 Análisis estadísticos

Para la descripción de las variables continuas, se utilizaron medias con su correspondiente Desviación Estándar (DS). Las variables categóricas fueron expresadas en términos de frecuencias y proporciones. La frecuencia de los eventos de interés fue reportado junto con sus correspondientes Intervalos de Confianza (IC) al 95%. La asociación entre variables categóricas fue evaluada utilizando pruebas χ^2 (χ^2) y test exacto de Fisher. Variables como edad, método anticonceptivo, gestaciones, edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales, estado civil, grupo étnico y otros factores de riesgo, fueron considerados como variables categóricas.

Razones de disparidad (ORs, por sus siglas en inglés *Odds Ratios*), con su correspondiente IC al 95%, fueron utilizadas para medir la fuerza de asociación entre el resultado de cada prueba (considerando como prueba el resultado de cada juego de iniciadores independientemente, o el resultado de PCR como combinación de los tres juegos de iniciadores) y las variables de interés (variables socio-demográficas, factores de riesgo tanto del huésped como del virus y los hallazgos citológicos). Los ORs fueron ajustados a través de regresión logística.

La concordancia entre los resultados para la detección de VPH entre la muestra cervical y de orina, fue evaluada utilizando el coeficiente kappa (κ), con su correspondiente intervalo de confianza al 95%, teniendo en cuenta la siguiente clasificación: valores negativos y de 0 a 0,2: pobre, de 0,21 a 0,4: leve, de 0,41 a 0,6: razonable, de 0,61 a 0,8: moderado, de 0,81 a 0,99: sustancial y 1,0: concordancia perfecta [68].

Las características operativas de las pruebas para detectar mujeres con anormalidad cervical, fueron evaluadas a través del cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, tomando los resultados de la citología cervical como prueba de referencia imperfecta. El ajuste por patrón de oro imperfecto fue llevado a cabo teniendo en cuenta los valores de sensibilidad y especificidad reportados en estudios previos para la citología cervical en población de mujeres infectadas con VIH [81]. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico STATA 11 ®, fijando un nivel de significancia del 5% para todas las pruebas de hipótesis.

4. Capítulo 4: Resultados

4.1 Características de la población

Un total de 245 mujeres infectadas con VIH fueron incluidas en este estudio. La verificación de la calidad de las muestras (amplificación de la β -globina humana), resultó satisfactoria para 239 de las 245 muestras cervicales (97,6%; IC95%=94,7-99,2), y para 208 de las 226 muestras de orina (92,0%; IC95%=87,7-95,2). En este sentido, 23 muestras negativas para la amplificación fueron excluidas de los análisis estadísticos.

Adicionalmente, otras 18 muestras fueron excluidas de los análisis debido a que no fueron tomadas o remitidas a la FIDIC (cervical y/o de orina), y finalmente 10 tuvieron resultado insatisfactorio para la citología cervical. De acuerdo a lo anterior, el número total de mujeres incluido en los análisis estadísticos fue $n=194$.

El rango de edad de las mujeres estuvo entre 20 y 73 años (edad promedio 38,0 años; DS=10,8 años), la mayoría de mujeres (45,4%) tuvo una edad inferior a 34 años ($n=88$; IC95%=38,2-52,6). Los grupos étnicos predominantes incluidos de la población de estudio fueron el blanco (68,4%; $n=130$; IC95%=61,3-75,0) y el mestizo (27,9%; $n=53$; IC95%=21,6-34,8).

Las variables relacionadas con factores de riesgo mostraron que el 60,8% de las mujeres iniciaron su vida sexual antes de los 18 años ($n=115$; IC95%=53,5-63,8), el 36,7% tuvo 4 o más compañeros sexuales a la fecha de inclusión ($n=69$; IC95%=29,8-44,0) y por último, el tipo de método anticonceptivo más utilizado fue el de barrera, siendo empleado por el 32,9% de las mujeres ($n=52$; IC95%=25,7-40,8) (Figura 6).

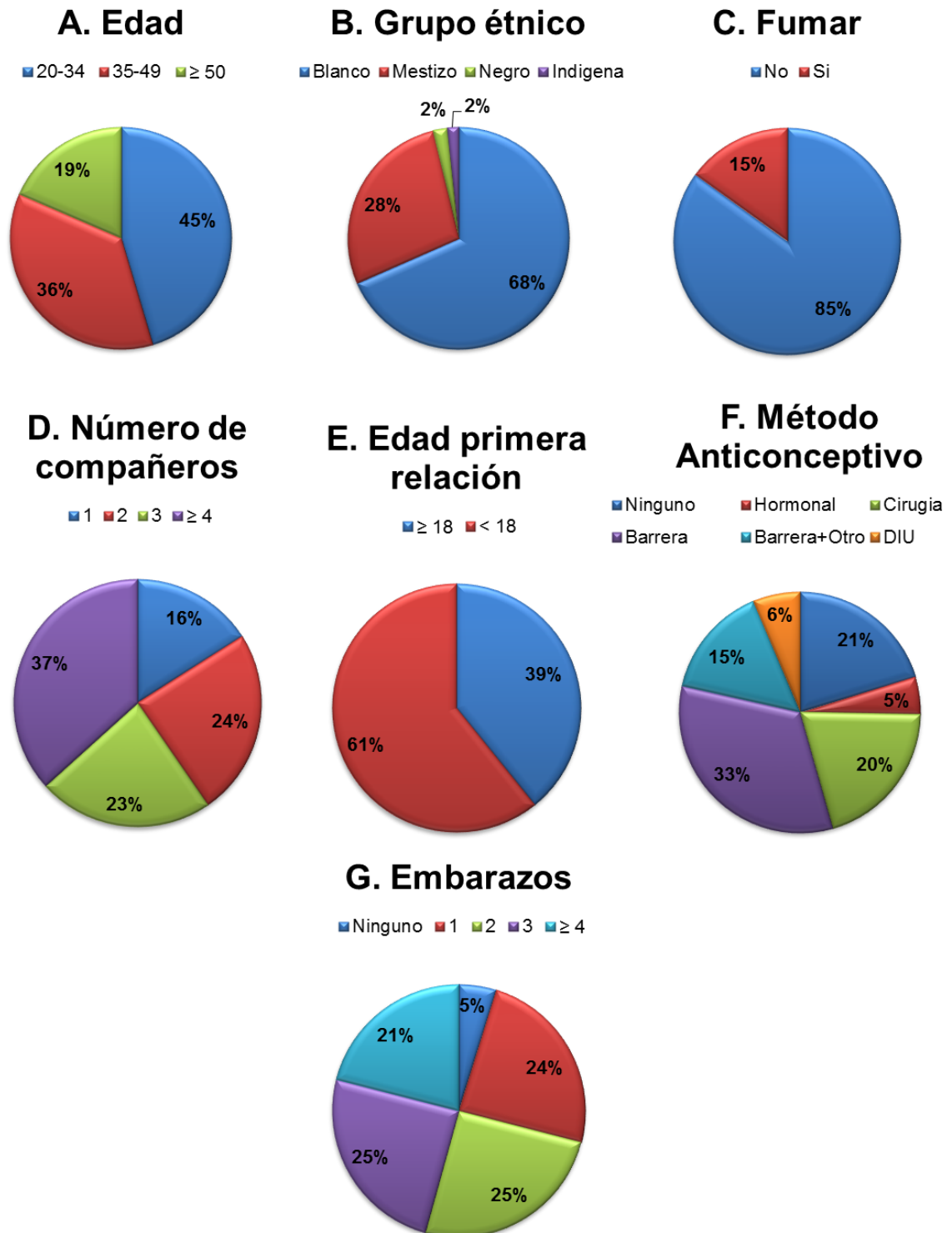


Figura 6. Características socio-demográficas y de factores de riesgo de las mujeres incluidas en el estudio.

4.2 Detección de VPH y distribución tipo-específica

La prevalencia general de infección por VPH en la población de estudio fue de 85,1% (n=165; IC95%=79,2-89,8), considerando como positivas aquellas muestras con detección viral en cualquiera de las fuentes de muestra (cérvix u orina). La prevalencia de infección viral detectada en muestras cervicales fue de 70,1% (n=136; IC95%=63,4-76,8) y de 63,9%, a partir de las muestras de orina (n=124; IC95%=56,9-70,9).

Los resultados de la distribución tipo-específica (Figura 7) mostraron que VPH-16 fue el tipo viral más prevalente, tanto en cérvix como en orina, seguido por VPH-31 en cérvix y VPH-58 en orina, los tipos virales restantes mostraron una distribución variable en las dos fuentes de muestras.

La prevalencia de infecciones únicas fue de 19,6% en muestras provenientes de tejido cervical (n=38; IC95%=14,2-25,9) y de 25,8% en muestra de orina (n=50; IC95%=19,8-32,6), siendo menores que las infecciones múltiples halladas, las cuales fueron de 54,6% (n=106; IC95%=47,4-61,8) y 40,2% (n=78; IC95%=33,2-47,5) para cérvix y orina, respectivamente.

Los resultados de las diferentes pruebas moleculares tanto para la identificación genérica de VPH, como para la distribución viral tipo-específica, de acuerdo al estado de la infección viral (sin infección, infección única o múltiple) se describen en la Tabla 3.

Para el caso de la distribución genérica, los porcentajes de detección viral por cada juego de iniciadores (analizados independientemente) resultaron similares (Tabla 3); sin embargo, el porcentaje de detección por PCR (analizando la combinación de los tres sets de iniciadores genéricos), resultó ser mayor en las dos fuentes de muestra. Finalmente, los análisis mostraron que todos los tipos de VPH evaluados en la población, fueron más frecuentemente encontrados en infecciones múltiples (Tabla 3).

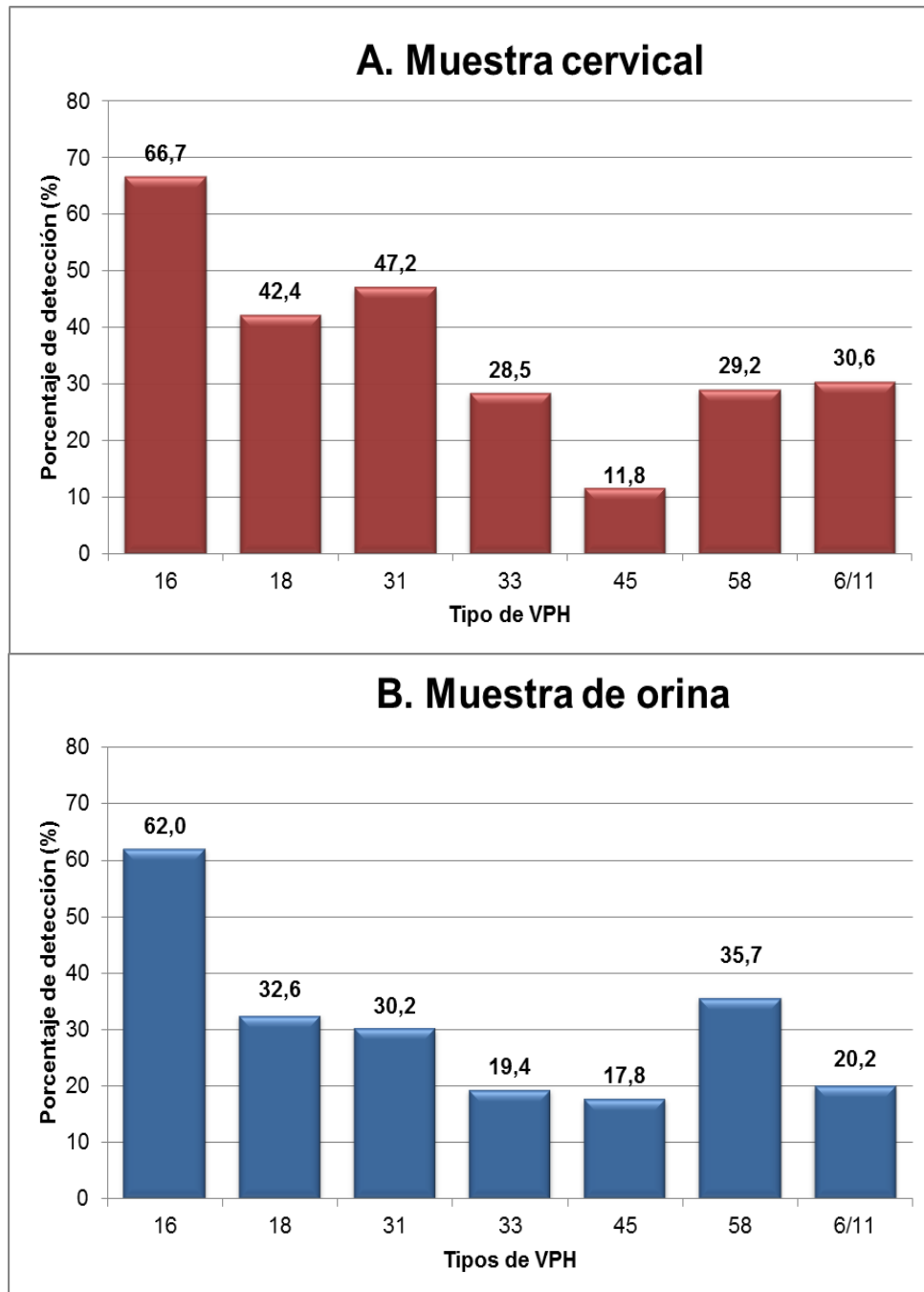


Figura 7. Frecuencia relativa de infección con los tipos de VPH evaluados en cervix y orina de las mujeres incluidas en el estudio.

El análisis de asociación entre la detección de VPH por cada juego de iniciadores (en cervix y orina) y la presencia de infecciones múltiples, mostró resultados estadísticamente significativos ($p=0,000$) para todas las pruebas realizadas, tanto en muestra cervical como en la de orina (Tabla 4). La asociación más fuerte fue para

pU1M/2R, en donde los ORs ajustados fueron de 11,9 (IC95%=4,8-29,6) para el caso de la muestra cervical y de 8,6 (IC95%=3,6-20,4), para el caso de la muestra de orina.

Tabla 3. Frecuencia relativa de infección por VPH y distribución tipo-específica a partir de muestra de cérvix y orina

	Resultado en muestra cervical			Resultado en muestra de orina		
	Sin Infección n (%)	Infección única n (%)	Infección múltiple n (%)	Sin Infección n (%)	Infección única n (%)	Infección múltiple n (%)
Detección genérica						
GP5+/6+	110 (56,7)	16 (8,2)	68 (35,1)	126 (64,9)	27 (13,9)	41 (21,1)
MY09/11	108 (55,7)	18 (9,3)	68 (35,1)	122 (62,9)	26 (13,4)	46 (23,7)
pU1M/2R	115 (59,3)	11 (5,7)	68 (35,1)	133 (68,6)	18 (9,3)	43 (22,2)
Distribución tipo-específica						
VPH-16	104 (53,6)	11 (5,7)	79 (40,7)	118 (60,8)	21 (10,8)	55 (28,4)
VPH-18	137 (70,6)	4 (2,1)	53 (27,3)	153 (78,9)	4 (2,1)	37 (19,1)
VPH-31	130 (67,0)	6 (3,1)	58 (29,9)	156 (80,4)	3 (1,5)	35 (18,0)
VPH-33	154 (79,4)	1 (0,5)	39 (20,1)	170 (87,6)	2 (1,0)	22 (11,3)
VPH-45	179 (92,3)	2 (1,0)	13 (6,7)	171 (88,1)	6 (3,1)	17 (8,8)
VPH-58	155 (79,9)	4 (2,1)	35 (18,0)	149 (76,8)	7 (3,6)	38 (19,6)
VPH-6/11	153 (78,9)	2 (1,0)	39 (20,1)	171 (88,1)	3 (1,5)	20 (10,3)

Los porcentajes fueron calculados por filas.

Tabla 4. Razones de disparidad (ORs) para la detección de infecciones por múltiples tipos de VPH para cada prueba molecular en las dos fuentes de muestra.

	Resultado para infecciones múltiples	ORs crudos (IC95%)			ORs ajustados (IC95%)		
		GP5+/6+	MY09/11	pU1M/2R	GP5+/6+	MY09/11	pU1M/2R
Cérvix	Negativo	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Positivo	8.1 (3.8-17.2)	7.0 (3.4-14.4)	12.5 (5.2-30.1)	5.5 (2.5-12.2)	7.5 (3.3-17.1)	11.9 (4.8-29.6)
Orina	Negativo	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Positivo	3.7 (1.9-7.0)	5.0 (2.5-9.8)	6.7 (3.2-14.0)	4.2 (1.9-9.2)	6.6 (2.9-15.3)	8.6 (3.6-20.4)

Odd ratios (ORs) fueron ajustados a edad, grupo étnico, edad de la primera relación, número de compañeros sexuales, método anticonceptivo, hábito de fumar y número de embarazos.

El número de tipos de VPH presentes simultáneamente (coinfección) en cérvix y orina se muestran en la Figura 8; los resultados indican que en la muestra de orina se detecta un mayor número de mujeres sin infección y con infección única (0 y 1 respectivamente), a diferencia de lo que ocurre en muestra cervical, donde se detecta un mayor número de

infecciones múltiples (de 2 a 7 tipos), siendo estas distribuciones estadísticamente significativas ($p = 0,000$).

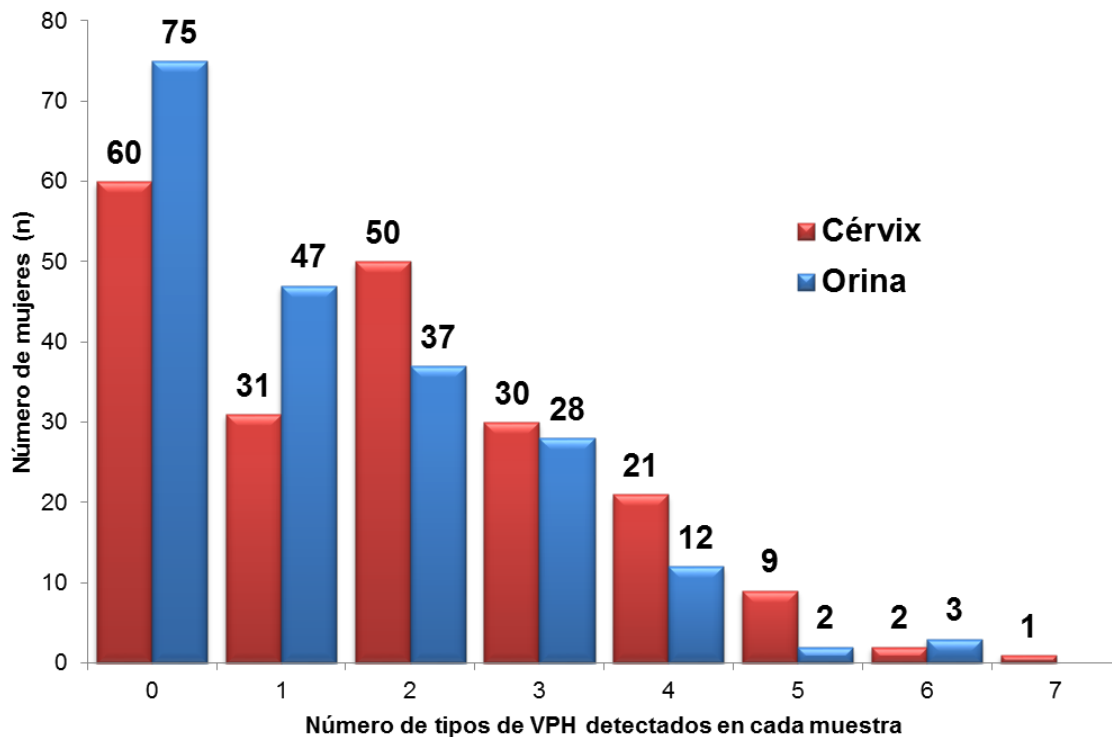


Figura 8. Distribución del número de tipos virales presentes para cada fuente de muestra.

4.3 Anormalidades citológicas y presencia de VPH

La frecuencia de anomalía citológica en la población analizada fue de 28,9% ($n=56$; $IC_{95\%}=22,6-35,8$). En el 35,7% de estas muestras se detectó ASCUS ($n=20$; $IC_{95\%}=23,4-49,6$), en el 57,2% se detectó LSIL ($n=32$; $IC_{95\%}=43,2-70,3$) y en el 7,1% HSIL ($n=4$; $IC_{95\%}=1,9-17,3$).

En la Tabla 5 se observa la identificación viral en las dos fuentes de muestra, de acuerdo al hallazgo citológico; los resultados indican que en comparación a las mujeres con hallazgo citológico normal, en aquellas que presentan algún tipo de anomalía, la presencia del VPH fue detectada en mayor proporción, tanto en la muestra de orina como en la de cérvix.

Tabla 5. Detección de VPH en muestras de cérvix y orina de acuerdo al hallazgo citológico.

Resultado citología cervical	Detección de VPH n (%)				Total
	Positiva en cérvix y orina	Positiva solo en cérvix	Positiva solo en orina	Negativa en cérvix y orina	
Normal	57 (41,3)	35 (25,4)	22 (15,9)	24 (17,4)	138
ASCUS	12 (60,0)	4 (20,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	20
LSIL	24 (75,0)	1 (3,1)	3 (9,4)	4 (12,5)	32
HSIL	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	4

Los porcentajes fueron calculados por filas. **ASCUS**: células escamosas atípicas de significado indeterminado; **LSIL**: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; **HSIL**: lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

El 20,4% (n=12) de las mujeres que presentaron hallazgos citológicos anormales resultaron negativas para VPH en muestra cervical, mientras que el 78,6% tuvo resultado positivo (n=44). Por otra parte, se encontró que el 19,6% (n=11) de las muestras con anormalidad cervical tuvo resultado negativo para VPH en muestra de orina, comparado con el 80,4% (n=45) donde la infección fue detectada, esta tendencia fue estadísticamente significativa (p= 0,002).

Adicionalmente, se evaluó la asociación entre la identificación de VPH (para cada fuente de muestra) y el hallazgo citológico categorizado en tres niveles: Normal, ASCUS y SIL (esta última incluye los resultados de LSIL y HSIL). En la muestra de orina los resultados sugieren una asociación positiva entre detección viral y el hallazgo citológico de ASCUS (OR ajustado=4,4; IC95%=1,1-17,7) y SIL (OR ajustado=3,2; IC95%=1,1-9,2), en comparación con aquellas que tienen resultado normal; para el caso de la muestra cervical no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas luego del ajuste de ORs, para la detección por PCR (Tabla 6).

En este contexto, los resultados de los juegos de iniciadores (analizados independientemente), se encontró una asociación positiva entre la detección viral en las muestras de orina empleando pU1M/2R y el hallazgo de SIL, siendo 3,7 más frecuentemente detectado (IC95%=1,4-9,3), comparado con la categoría de referencia. Para el caso de la muestra cervical, se observó posible asociación positiva entre la detección con GP5+/6+ y la presencia de ASCUS (OR=5,8 IC95%=1,7-19,4) (Tabla 6).

Tabla 6. Indicadores de asociación (ORs) entre la detección de VPH y los hallazgos citológicos.

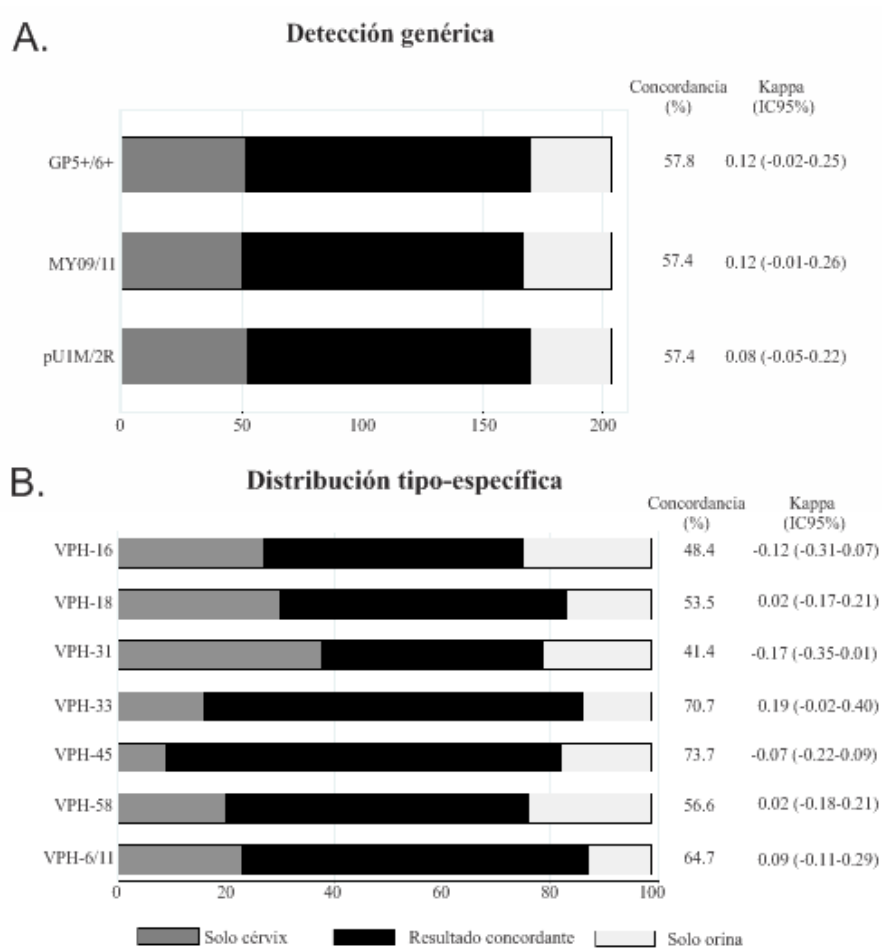
Fuente de muestra	Resultado citología	Resultado positivo para VPH n (%)				ORs crudos (IC95%)				ORs ajustados (IC95%)			
		GP5+/6+	MY09/11	pU1M/2R	PCR	GP5+/6+	MY09/11	pU1M/2R	PCR	GP5+/6+	MY09/11	pU1M/2R	PCR
Cérvix	Normal	49 (35,5)	53 (38,4)	50 (36,2)	92 (66,7)	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	ASCUS	13 (65,0)	12 (60,0)	10 (50,0)	16 (80,0)	3,4 (1,2-9,2)	2,4 (0,9-6,4)	1,8 (0,7-4,6)	2,0 (0,6-6,4)	5,8 (1,7-19,4)	3,1 (1,0-9,8)	1,6 (0,6-4,7)	2,8 (0,7-11,4)
	SIL	22 (61,1)	21 (58,3)	19 (52,8)	28 (77,8)	2,9 (1,3-6,2)	2,2 (1,1-4,8)	2,0 (0,9-4,2)	1,8 (0,7-4,2)	2,5 (1,0-6,2)	1,7 (0,7-4,4)	1,3 (0,5-3,2)	1,1 (0,4-3,0)
Orina	Normal	44 (31,9)	50 (36,2)	36 (26,1)	79 (57,3)	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	ASCUS	9 (45,0)	10 (50,0)	7 (35,0)	15 (75,0)	1,7 (0,7-4,6)	1,8 (0,7-4,6)	1,5 (0,6-4,1)	2,2 (0,8-6,6)	3,1 (1,0-9,7)	2,5 (0,8-7,4)	1,4 (0,5-4,3)	4,4 (1,1-17,7)
	SIL	15 (41,7)	12 (33,3)	18 (50,0)	30 (83,3)	1,5 (0,7-3,3)	0,9 (0,4-2,0)	2,8 (1,3-6,1)	3,7 (1,4-9,8)	1,2 (0,5-3,1)	0,6 (0,2-1,6)	3,6 (1,4-9,3)	3,2 (1,1-9,2)

Odd ratios (ORs) fueron ajustados a edad, grupo étnico, edad de la primera relación, número de compañeros sexuales, método anticonceptivo, hábito de fumar y número de embarazos. Los valores en negrita fueron estadísticamente significativos. **ASCUS**: células escamosas atípicas de significado indeterminado; **LSIL**: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; **HSIL**: lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

4.4 Concordancia y características operativas de las pruebas moleculares

La detección molecular de VPH entre las muestras de cérvix y orina, mostró una concordancia superior al 50% (en los tres juegos de iniciadores utilizados), mientras que para la identificación tipo-específica, las mayores concordancias fueron encontradas para los tipos VPH-33 y -45, que además mostraron las menores prevalencias de infección. En general, los valores obtenidos por el estadístico kappa mostraron una correlación pobre en todos los casos

Figura 9. Concordancia de la detección genérica (A) y tipo-específica (B), a partir de las dos fuentes de muestra



Las características operativas de las diferentes pruebas moleculares empleadas mostraron que la sensibilidad de la prueba de PCR resultó ser mayor que los resultados

de los juegos de iniciadores al ser analizados de forma independiente. Finalmente, los resultados indican que todas las pruebas realizadas a partir de la muestra de orina presentaron características muy similares a las realizadas en la muestra cervical (Tabla 7).

Tabla 7. Características operativas de las pruebas moleculares para la detección de infección de VPH en muestra cervical y de orina

Pruebas para la detección de VPH	Fuente de muestra	Sensibilidad % (IC95%)	Especificidad % (IC95%)	VPP% (IC95%)	VPN% (IC95%)
GP5+/6+	Cérvix	35,4 (27,6-43,4)	36,9 (24,0-50,6)	58,6 (47,8-69,3)	18,5 (11,6-27,9)
	Orina	31,9 (24,0-40,0)	56,9 (43,4-69,9)	65,0 (53,3-76,8)	24,9 (17,6-33,0)
MY09/11	Cérvix	38,4 (30,3-46,6)	40,6 (27,5-54,3)	61,9 (51,3-72,2)	20,7 (13,1-29,2)
	Orina	36,2 (28,3-44,4)	60,7 (47,8-73,9)	69,9 (58,6-80,6)	27,4 (19,6-35,7)
pU1M/2R	Cérvix	36,2 (28,4-44,4)	47,9 (34,8-61,0)	62,6 (53,1-74,2)	23,0 (15,5-31,1)
	Orina	26,0 (19,0-33,8)	55,0 (41,6-68,6)	59,3 (46,6-71,7)	22,8 (15,8-30,5)
PCR	Cérvix	66,6 (58,7-74,5)	21,2 (10,7-32,8)	68,0 (59,7-75,7)	20,1 (10,2-31,6)
	Orina	57,2 (48,8-65,6)	19,1 (9,0-30,1)	64,0 (55,4-72,2)	15,1 (6,9-24,1)

Los resultados descritos en la tabla fueron ajustados teniendo en cuenta los datos de sensibilidad y especificidad de la citología cervical [81], la cual se consideró como prueba de referencia imperfecta. IC: intervalo Confianza; VPN: Valor Predictivo Negativo; VPP: Valor Predictivo Positivo.

4.5 Factores de riesgo asociados con presencia de VPH

La asociación entre la presencia de infección para cada tipo de muestra (cervical y de orina) y los factores de riesgo es descrita en la Tabla 8. Los resultados a partir de muestra cervical indican una asociación positiva para el grupo de mujeres que emplean los métodos anticonceptivos de barrera y la detección de ADN de VPH (OR=4,2; IC95%=1,1-16,0), sin embargo, para las demás variables evaluadas no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas.

Tabla 8. Descripción de las características socio-demográficas y de factores de riesgo, con su correspondiente fuerza de asociación, en las dos fuentes de muestra (cervical y de orina).

Característica	Muestra cervical			Muestra de orina		
	Positivas n (%)	ORs crudos (IC95%)	ORs ajustados (IC95%)	Positivas n (%)	ORs crudos (IC95%)	ORs ajustados (IC95%)
Edad (n=194)						
20-34	65 (73,9)	Ref		54 (61,4)	Ref	
35-49	42 (60,0)	0,5 [0,3-1,1]	0,4 [0,1-1,1]	52 (74,3)	1,8 [0,9-3,6]	1,9 [0,7-4,8]
≥ 50	29 (80,6)	1,5 [0,6-3,8]	4,9 [0,8-30,1]	50 (50,0)	0,6 [0,3-1,4]	0,9 [0,3-3,2]
Grupo étnico (n=190)						
Blanco	91 (70,0)	Ref		80 (61,5)	Ref	
Mestizo	38 (71,7)	1,1 [0,5-2,2]	1,3 [0,5-3,6]	35 (66,0)	1,2 [0,6-2,4]	1,2 [0,5-2,9]
Negro	3 (75,0)	1,3 [0,1-12,9]	0,5 [0,0-7,9]	4 (100)	<i>n.c.</i>	
Indígena	2 (66,7)	0,9 [0,1-9,8]	1,1 [0,1-22,1]	2 (66,7)	1,3 [0,1-14,3]	1,0 [0,1-12,6]
Edad primera relación (n=189)						
≥ 18	51 (68,9)	Ref		49 (66,2)	Ref	
< 18	83 (72,2)	1,2 [0,6-2,2]	1,8 [0,6-4,8]	71 (61,7)	0,8 [0,4-1,5]	0,7 [0,3-1,7]
Número de compañeros (n=188)						
1	21 (70,0)	Ref		20 (66,7)	Ref	
2	33 (71,7)	1,1 [0,4-3,0]	0,5 [0,1-2,5]	28 (60,9)	0,8 [0,3-2,1]	0,9 [0,2-3,8]
3	30 (69,8)	1,0 [0,4-2,8]	1,0 [0,2-4,7]	26 (60,5)	0,8 [0,3-2,0]	0,8 [0,2-3,4]
≥ 4	49 (71,0)	1,1 [0,4-2,7]	1,0 [0,2-4,2]	45 (65,2)	0,9 [0,4-2,3]	1,0 [0,3-3,7]
Método anticonceptivo (n=158)						
Ninguno	20 (62,5)	Ref		19 (59,4)	Ref	
Hormonal	3 (37,5)	0,4 [0,1-1,9]	0,3 [0,0-3,0]	5 (62,5)	1,1 [0,2-5,7]	1,5 [0,2-13,2]
Cirugía	22 (68,8)	1,3 [0,5-3,8]	2,0 [0,5-7,6]	25 (78,1)	2,4 [0,8-7,5]	3,2 [0,8-12,0]
Barrera	39 (75,0)	1,8 [0,7-4,7]	4,2 [1,1-16,0]	34 (65,4)	1,3 [0,5-3,2]	2,0 [0,6-6,6]
Barrera+otro	15 (62,5)	1,0 [0,3-3,0]	1,6 [0,4-7,1]	14 (58,3)	1,0 [0,3-2,8]	1,2 [0,3-4,7]
DIU	10 (100)	<i>n.c.</i>		5 (50,0)	0,7 [0,1-2,9]	1,1 [0,2-5,7]
Fumar (n=187)						
No	112 (70,5)	Ref		103 (64,8)	Ref	
Si	22 (78,6)	1,5 [0,6-4,1]	2,3 [0,6-8,5]	18 (64,3)	1,0 [0,6-4,1]	0,7 [0,3-2,1]
Embarazos (n=186)						
Ninguno	6 (66,7)	Ref		7 (77,8)	Ref	
1	32 (71,1)	1,2 [0,3-5,8]	0,3 [0,0-3,2]	27 (60,0)	0,4 [0,1-2,4]	0,3 [0,0-3,0]
2	31 (66,0)	1,0 [0,2-4,4]	0,3 [0,0-2,5]	36 (76,6)	0,9 [0,2-5,3]	0,7 [0,1-7,8]
3	34 (73,9)	1,4 [0,3-6,7]	0,4 [0,0-4,0]	23 (50,0)	0,3 [0,1-1,6]	0,2 [0,0-2,6]
≥ 4	28 (71,8)	1,3 [0,3-6,1]	0,4 [0,0-4,2]	25(64,1)	0,5 [0,1-2,9]	0,3 [0,0-3,4]

Las categorías descritas no tienen el mismo número de mujeres, debido a datos incompletos en la encuesta. Los resultados de razón de disparidad (OR), fueron ajustados a edad, grupo étnico, edad de la primera relación, número de compañeros sexuales, método anticonceptivo, hábito de fumar y número de embarazos. Los valores en negrita son estadísticamente significativos. Abreviaturas: DIU: Dispositivo Intra-Uterino. *n.c.* (no calculable): El estimador no puede ser calculado porque uno de los campos no contenía datos durante el análisis de dispersión.

5. Discusión

El CC representa un grave problema de salud pública en la población femenina a nivel mundial [1], principalmente en países en vías de desarrollo, donde los programas de tamización basados en la citología cervical, están limitados por factores relacionados con el requerimiento de personal capacitado, errores de muestreo, lecturas subjetivas de los resultados [19], y reducidas tasas de cobertura, asociadas con la incomodidad de la toma de la muestra durante examen ginecológico [82].

Teniendo en cuenta que la infección persistente por VPH constituye el principal factor de riesgo asociado en el desarrollo de CC [24, 83], se han desarrollado estrategias que buscan reducir las limitantes de los programas de tamización, a través de la implementación de pruebas moleculares complementarias a la citología, que permitan la detección viral [27], incluso antes de que ocurran cambios morfológicos.

Sin embargo, estas pruebas, siguen estando limitadas al método de colección durante examen ginecológico, por lo que han sido sugeridas nuevas fuentes de muestra como la de orina, la cual presenta ventajas relacionadas con la adherencia de las mujeres a los programas de promoción y prevención [82]. Por este motivo, son de particular interés los estudios que evalúan el comportamiento de la muestra de orina como herramienta diagnóstica.

El presente trabajo es el primero realizado en Colombia, donde se determinó la prevalencia de infección por VPH en dos tipos de muestras (cervicales y de orina) en mujeres VIH positivas. Los resultados obtenidos mostraron que los métodos de preservación, transporte y extracción de las muestras fueron adecuados, lo cual fue confirmado a través de la amplificación de dos segmentos del gen de la β -Globina humana, encontrando un menor porcentaje de pérdida de muestras que lo reportado

previamente; adicionalmente, los resultados sugieren que la muestra de orina puede ser considerada como una fuente de ADN adecuada para la amplificación de blancos específicos por técnicas de biología molecular [84, 85].

La prevalencia general de VPH en la población analizada concuerda con lo reportado previamente en estudios llevados a cabo en poblaciones con características similares (VIH positivas) [15, 64]. No obstante, la frecuencia de infección viral en la muestra de orina fue menor que la encontrada en la muestra de cérvix, hallazgos que coinciden con reportes previos para esta fuente de muestra [86].

La diferencia de detección viral en las muestras (cérvix y orina) podría estar relacionada con que la muestra de orina no proviene del sitio original de la infección [61] y sólo se estaría detectando VPH presente en células exfoliadas cuyo número es reducido [84], o con que durante la fase inicial de la infección por VPH, los viriones se mantienen en bajo número de copias en las células basales del epitelio [33], fase durante la cual aún no se generan cambios en el tejido, por lo que este tipo de infecciones se estarían escapando a la detección en orina. Sin embargo, aunque la detección viral fue menor en orina, los valores encontrados resultaron ser comparables a lo hallado para la muestra cervical.

La alta frecuencia de detección de VPH obtenida en este trabajo, fue favorecida por el diseño metodológico, que empleó tres juegos de iniciadores genéricos, lo cual brinda mayor robustez y sensibilidad a los estudios epidemiológicos [20, 73].

Los juegos de iniciadores implementados arrojaron diferencias en las frecuencias relativas de infección por VPH detectadas, lo que podría estar relacionado con los diferentes sitios de anillamiento a los que se dirigen y por las características particulares de su diseño. Reportes previos han sugerido que el genoma viral sufre cambios durante la integración al genoma de la célula huésped, que pueden resultar en la pérdida parcial o total de fragmentos del genoma, lo que soporta el uso de diferente blancos moleculares para las técnicas de tamización [71].

Por otro lado, la distribución tipo-específica obtenida a partir de la muestra de cérvix resultó similar al perfil reportado para población general colombiana, en el que se encontró al tipo VPH-16 como el de mayor prevalencia, seguido de VPH-31 [7]. Los

demás tipos de VPH mostraron una distribución diferencial en las dos fuentes de muestra, lo que podría estar asociado con la afinidad particular por cierto tipo de epitelio (queratinizado o no) reportada para algunos tipos virales [87]; bajo esta premisa, ciertos tipos virales infectarían con mayor frecuencia el tracto reproductivo bajo [18] y así favorecerían su detección en muestras de orina.

Por otra parte, fue detectado un mayor porcentaje de infecciones únicas en las muestras de orina que en las de cervix, lo cual podría estar relacionado con el curso normal de las infecciones persistentes, donde se da un incremento en el número de copias de solo un tipo de VPH, que favorece el inicio del programa de recambio celular (ligado a la culminación del ciclo de replicación del virión) [88]; estas células diferenciadas (infectadas con un único tipo de virus) son desprendidas en una mayor proporción, lo que haría posible la detección viral en orina.

Los resultados también mostraron una elevada frecuencia relativa de infecciones múltiples (co-infecciones), lo cual puede ser explicado por características de la población analizada (mujeres VIH positivas) [13], que, según lo reportado previamente, presentan una baja tasa de depuración de la infección, debido a la disminución en la eficiencia de la inmunidad mediada por células, tanto sistémica como local, lo que podría influir en la permanencia de más de un tipo viral en el epitelio cervical [12, 89].

Adicionalmente, en las muestras de cervix y orina, los análisis mostraron una asociación positiva entre la presencia de co-infección y la detección molecular genérica del virus (en mayor proporción con pU1M/2R). Este resultado podría sugerir la utilidad de las pruebas moleculares (principalmente las que detectan genes codificantes para las proteínas virales oncogénicas), para la identificación de mujeres en riesgo [71]. Además, la presencia de co-infecciones puede constituir un factor de riesgo que contribuye en mayor medida a la persistencia viral y al aumento del riesgo de desarrollar CC [6].

La frecuencia de anomalías cervicales detectadas por citología cervical, principalmente LSIL, resultó ser considerablemente alta, en comparación con la población general Colombiana [7, 71], lo cual concuerda con los resultados descritos en población infectada con VIH, en quienes generalmente son diagnosticadas lesiones

cervicales, posiblemente relacionadas con la reducción en la eficiencia de su sistema inmune [81].

De manera interesante, se encontró que la muestra de orina resultó positiva en mayor porcentaje de mujeres con anomalías detectadas por citología, en comparación con la muestra cervical, la cual proviene directamente del tejido. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Vosters *et al.* [60], donde describen mayores prevalencias de ADN del VPH en orina de mujeres con lesiones de alto grado o cáncer, comparadas con mujeres con hallazgo citológico normal o con lesiones bajo grado. Este fenómeno podría deberse a que en el curso de las infecciones persistentes, se presentan cambios en la arquitectura del epitelio [33], los cuales podrían favorecer recambio celular del epitelio del cérvix y por tanto la presencia de células en la muestra de orina.

Las asociaciones encontradas entre la detección de infección viral en orina (tanto por PCR como combinación de los tres juegos de indicadores, como por pU1M/2R) y el hallazgo citológico anormal, aportan evidencia adicional para el uso de esta fuente de muestra como parte de una prueba de tamización, la cual además de presentar ventajas relacionadas con la practicidad para la toma, bajo costo y mayor aceptabilidad entre la mujeres [90], también exhibe utilidad para la identificación de mujeres en riesgo con lesiones pre-neoplásicas.

La concordancia entre los resultados obtenidos a partir de las dos fuentes de muestra fue pobre, tanto en la identificación genérica, como en la tipo-específica, lo cual podría estar relacionado con la baja carga de VPH esperada en muestra de orina (50 veces menor en comparación a la encontrada en muestra cervical), por lo que un número reducido de células producto de la exfoliación del epitelio cervical se encuentran presentes en esta muestra [61].

Otra posible explicación es la detección de infecciones que cursan en tracto genito-urinario bajo, donde se han reportado neoplasias de alta frecuencia en la población VIH infectada (5 veces más frecuentes que en la población general) [18]. A pesar de la reducida concordancia, la muestra de orina ofrece buena aplicabilidad clínica (comparable con la detectada en citología), además, nuestros resultados mostraron que

detecta con mayor frecuencia mujeres con anormalidad cervical, reportadas a través de la citología cervical.

Las características operativas de las pruebas realizadas a partir de las dos fuentes de muestra fueron bajas, sin embargo, estas fueron determinadas considerando los resultados de la citología cervical como patrón de oro imperfecto, prueba que identifica presencia de enfermedad cervical, y no de infección por VPH (esta última es determinada por las pruebas moleculares). Con esta premisa, cabe resaltar que las pruebas mostraron resultados similares en las dos fuentes de muestra, lo cual aporta evidencia a la utilidad de la muestra de orina para la identificación molecular de ADN de VPH, ya que presenta una sensibilidad comparable a la reportada previamente para cervix [71]. Sin embargo, resulta necesario desarrollar estudios que involucren procesos de validación de la muestra de orina.

Se identificó una asociación positiva entre la detección molecular de VPH en muestras de frotis cervicales y el uso de anticonceptivos de barrera; a pesar de que en estudios previos, esta estrategia de anticoncepción ha sido considerada como de prevención primaria de lesiones cervicales [91], los hallazgos de este estudio pueden en parte ser explicados con las características del estilo de vida y comportamiento sexual, que habitualmente acompañan el uso de este tipo de métodos y que favorecen la adquisición de la infección con VPH [92]. Para el caso de la muestra de orina, no se encontraron asociaciones para ninguno de los factores de riesgo evaluados.

En este contexto, y a pesar de que este estudio no fueron identificadas asociaciones estadísticamente significativas entre los factores de riesgo evaluados, ha sido ampliamente descrito que estos afectan el desarrollo de la historia natural de la enfermedad, lo cual es explicado en las limitantes del tipo de estudio empleado en el presente estudio (descriptivo de corte transversal), y no permite verificar relaciones entre variables que se alteran con el tiempo de exposición, y que pueden ser evaluadas con otros tipos de estudio como los de tipo cohorte.

Teniendo en cuenta la información obtenida en este estudio, pruebas moleculares podrían ser consideradas como alternativas para ser incluidas en los programas de

tamización cervical en mujeres infectadas con VIH, realizadas no solo a partir de muestras provenientes del tejido cervical, sino de otros tipos de muestra como los de auto-toma (muestra de orina); esta muestra, además de tener un comportamiento diagnóstico similar a lo reportado para la muestra cervical, presenta mayor aceptabilidad por parte de la población femenina, su colección resulta ser más fácil, práctica y económica, y no genera micro-lesiones que podrían favorecer el progreso de la historia natural de la enfermedad [60].

Finalmente, y de acuerdo a los resultados obtenidos, el auto-muestreo de orina podría ser sugerido como fuente de muestra óptima para la tamización rutinaria y la identificación de VPH, principalmente en mujeres con características de riesgo, como es el caso de aquellas infectadas con VIH, o poblaciones en países en vías de desarrollo, donde las tasas de incidencia y mortalidad son elevadas, y los programas de promoción y prevención actualmente implementados no han logrado una reducción significativa de las tasas de mortalidad por esta neoplasia cervical.

6.Divulgación de los resultados

Finalmente, los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo han permitido la generación de dos artículos científicos, el primero de ellos publicado en la revista PLoS ONE (Anexo 3) y el segundo se encuentra sometido a revisión en la revista Journal of Clinical Microbiology (Anexo 4 – Portada).

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

La población de mujeres incluida en este estudio puede ser considerada como una población en riesgo para el desarrollo de CC, al estar constituida por mujeres infectadas con VIH y por presentar una elevada prevalencia de anomalías cervicales; esto le confiere especial interés para ser incluida en programas de prevención y seguimiento, enfocados a disminuir la carga de la enfermedad cervical.

Las frecuencias de infección por VPH encontradas fueron elevadas, tanto en muestra cervical como en la de orina, siendo principalmente relacionadas con la presencia de más de un tipo viral (co-infección). A pesar de que la prevalencia es mayor que lo reportado para Colombia en población general, coincide con lo encontrado en otras poblaciones infectadas con VIH. Los resultados mostraron que la identificación molecular de VPH a través del uso de varios juegos de iniciadores, brinda robustez al estudio epidemiológico y permite la identificación de una mayor cantidad de mujeres que cursan infecciones con este virus.

La distribución viral específica encontrada en este estudio permitió determinar que VPH-16 es el tipo viral más prevalente para las dos fuentes de muestra, y que los demás tipos virales tuvieron distribuciones diferentes entre ellas, por ejemplo, el segundo tipo más prevalente en cérvix fue VPH-31, mientras que para orina fue VPH-58. De esta forma, los resultados indican la existencia de variaciones tipo-específicas en la población infectada con VIH.

A pesar de que las características operativas de las pruebas en general fueron bajas, se encontró que la detección molecular de VPH a través de PCR es sensible en la

identificación de mujeres con anomalías cervicales. Adicionalmente, se encontró que las pruebas llevadas a cabo en muestra de orina tuvieron comportamiento diagnóstico similar a las realizadas en muestra de cervix.

Entre los factores de riesgo analizados, se encontró una asociación positiva entre la detección de VPH en cervix y el uso de anticonceptivos de barrera, en comparación con aquellas mujeres que no emplean métodos anticonceptivos. Para las demás variables analizadas no se encontraron tendencias de asociación.

Finalmente, se puede sugerir la detección molecular de la infección por VPH en muestra de orina como una potencial estrategia de tamización de CC, por ser fácil de colectar, económica, de mayor aceptabilidad en la población y por tener características operativas similares a la muestra cervical.

7.2 Recomendaciones

Los resultados de este trabajo pueden ser complementados y fortalecidos a través de nuevos estudios que evalúen las condiciones de colección, almacenamiento y procesamiento de la muestra de orina, y que puedan mejorar las estrategias de amplificación de los genes de interés de VPH. En este sentido, se deben realizar estudios experimentales que contemplen diferentes condiciones en los protocolos mencionados.

Los hallazgos de esta investigación confirman la importancia de avanzar en la evaluación de la relación biológica y clínica de la infección simultánea VIH-VPH, virus de transmisión sexual de mayor prevalencia a nivel global. Sin embargo, es necesaria la realización de estudios adicionales donde se evalúen características clínicas involucradas en la historia natural de la infección con VIH (como conteo de linfocitos T CD4+ o tratamiento utilizado, entre otras), con el fin de identificar su efecto en el comportamiento de las pruebas para la detección molecular de VPH.

Las asociaciones encontradas entre la detección de VPH y los hallazgos citológicos anormales, abren paso al planteamiento de estudios de cohorte que permitan establecer la verdadera fuerza de asociación de estos determinantes en la historia natural de la enfermedad.

El diseño de este tipo de estudios podría contribuir además a la evaluación de la eficiencia de la muestra de orina en la identificación de mujeres en riesgo de desarrollar la lesiones cervicales, y así determinar su utilidad en programas de seguimiento de un amplio número de mujeres o de población en riesgo (inmunosuprimidas, entre otras).

Finalmente, resulta importante y necesario desarrollar estudios de costo efectividad y de validación de una prueba basada en la identificación molecular de ADN a partir de muestra de orina, que a futuro permitan su implementación como parte de los programas de prevención y control de CC.

Bibliografía

1. Ferlay, J., et al., *GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, in Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, Fecha de consulta: 06/11/20122010.
2. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). *Human Papillomavirus and Related Cancers in Colombia. Summary Report*. 2010. **Disponible en:** www.who.int/hpvcentre, **Fecha de consulta: 06/11/2012**.
3. Bosch, F.X., Y.-L. Qiao, and X. Castellsagué, *Chapter 2. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer*. International Journal of Gynecology and Obstetrics, 2006. **94** (Supplement 1): p. S8-S21.
4. Molano, M., et al., *Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology*. Br J Cancer, 2002. **87**(3): p. 324-33.
5. Mendez, F., et al., *Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines*. J Infect Dis, 2005. **192**(7): p. 1158-65.
6. Camargo, 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): p. 68-74.
7. Camargo, M., et al., *Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia*. Ann Epidemiol, 2011. **21**(3): p. 204-13.
8. Soto-De Leon, S.C., et al., *Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(1): p. 100-2.
9. Wright, T.C., Jr. and M. Schiffman, *Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 489-90.
10. Kenney, J.W., *Ethnic differences in risk factors associated with genital human papillomavirus infections*. J Adv Nurs, 1996. **23**(6): p. 1221-7.
11. Grulich, A.E., et al., *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 59-67.
12. Del Mistro, A. and L. Chieco Bianchi, *HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals*. Eur J Cancer, 2001. **37**(10): p. 1227-35.
13. Levi, J.E., et al., *Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women*. Gynecol Oncol, 2004. **92**(1): p. 225-31.
14. Clarke, B. and R. Chetty, *Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer*. Mol Pathol, 2002. **55**(1): p. 19-24.

15. Brinkman, J.A., et al., *Detection of human papillomavirus DNA in urine specimens from human immunodeficiency virus-positive women*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3155-61.
16. Kojic, E.M. and S. Cu-Uvin, *Update: human papillomavirus infection remains highly prevalent and persistent among HIV-infected individuals*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(5): p. 464-9.
17. Denny, L., *Cytological screening for cervical cancer prevention*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012. **26**(2): p. 189-96.
18. Ferenczy, A., et al., *Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments*. CMAJ, 2003. **169**(5): p. 431-4.
19. Nanda, K., et al., *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review*. Ann Intern Med, 2000. **132**(10): p. 810-9.
20. Iftner, T. and L.L. Villa, *Chapter 12: Human papillomavirus technologies*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 80-8.
21. Stanczuk, G.A., et al., *Detection of human papillomavirus in urine and cervical swabs from patients with invasive cervical cancer*. J Med Virol, 2003. **71**(1): p. 110-4.
22. Sellors, J.W., et al., *Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions*. CMAJ, 2000. **163**(5): p. 513-8.
23. Bosch, F.X. and S. de Sanjose, *Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 3-13.
24. Burd, E.M., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(1): p. 1-17.
25. Castellsague, X., F.X. Bosch, and N. Munoz, *Environmental co-factors in HPV carcinogenesis*. Virus Res, 2002. **89**(2): p. 191-9.
26. Chirenje, Z.M., *HIV and cancer of the cervix*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2005. **19**(2): p. 269-76.
27. Denny, L.A. and T.C. Wright, Jr., *Human papillomavirus testing and screening*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2005. **19**(4): p. 501-15.
28. Zheng, Z.M. and C.C. Baker, *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. Front Biosci, 2006. **11**, : p. 2286-302.
29. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Munger, *Viruses associated with human cancer*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(3): p. 127-50.
30. de Villiers, E.M., L. Gissmann, and H. zur Hausen, *Molecular cloning of viral DNA from human genital warts*. J Virol, 1981. **40**(3): p. 932-5.
31. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
32. Munger, K., et al., *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11451-60.
33. Munoz, N., X. Castellsague, and A.B. de Gonzalez, *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **24S3**: p. S1-S10.

34. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. **68**(2): p. 362-72.
35. Conger, K.L., et al., *Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(5): p. 2696-705.
36. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*. *J Clin Virol*, 2005. **32 Suppl 1**: p. S7-15.
37. Jagu, S., et al., *Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(11): p. 782-92.
38. Evander, M., et al., *Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses*. *J Virol*, 1997. **71**(3): p. 2449-56.
39. Giroglou, T., et al., *Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate*. *J Virol*, 2001. **75**(3): p. 1565-70.
40. Smith, J.L., S.K. Campos, and M.A. Ozbun, *Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes*. *J Virol*, 2007. **81**(18): p. 9922-31.
41. Crow, J.M., *HPV: The global burden*. *Nature*, 2012. **488**(7413): p. S2-3.
42. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. *Lancet*, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
43. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
44. Pardo, C., et al., *New Cancer Cases at the Instituto Nacional de Cancerología, Colombia, 2002*. *Revista Colombiana de Cancerología*, 2003. **7**(3): p. 4-19.
45. McMurray, H.R., et al., *Biology of human papillomaviruses*. *Int J Exp Pathol*, 2001. **82**(1): p. 15-33.
46. Herrero, R., et al., *Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(6): p. 464-74.
47. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. *J Pathol*, 1999. **189**(1): p. 12-9.
48. Payan, C., et al., *Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(3): p. 897-901.
49. Smith, J.S., et al., *Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review*. *J Adolesc Health*, 2008. **43**(Suppl 4): p. S5-25, S25 e1-41.
50. Murillo, R., et al., *Cervical cancer screening programs in Latin America and the Caribbean*. *Vaccine*, 2008. **26** (Suppl 11): p. L37-48.
51. Bermudez, A., *Can we do the same in the developing world?* *Gynecol Oncol*, 2005. **99**(3 Suppl 1): p. S192-6.
52. Feller, L. and J. Lemmer, *Aspects of immunopathogenic mechanisms of HIV infection*. *SADJ*, 2007. **62**(10): p. 432-6.

53. Heard, I., *Prevention of cervical cancer in women with HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(1): p. 68-73.
54. Setse, R., et al., *Cervical pap screening cytological abnormalities among HIV-infected adolescents in the LEGACY cohort*. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2012. **25**(1): p. 27-34.
55. Garbuglia, A.R., et al., *Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy*. J Clin Virol, 2012. **54**(2): p. 141-6.
56. Ellerbrock, T.V., et al., *Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women*. JAMA, 2000. **283**(8): p. 1031-7.
57. Galvis, V., M. Bustamante, and C. Sarmiento, *Norma técnica para la detección temprana del cáncer de cuello uterino y guía de atención de lesiones preneoplásicas de cuello uterino*. Ministerio de Salud – Dirección General de Promoción y Prevención 2001: p. 1-15.
58. Lee, K.J., J.K. Lee, and H.S. Saw, *Can human papillomavirus DNA testing substitute for cytology in the detection of high-grade cervical lesions?* Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(3): p. 298-302.
59. J, O., et al., *Comparación de la toma de citología cervical con calidad satisfactoria con el método Cervex-brush o Cervex-mex*. Ginecol Obstet Mex, 2008. **76**(7): p. 381-385.
60. Vorsters, A., et al., *Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(5): p. 627-40.
61. Sehgal, A., et al., *Urine HPV-DNA detection for cervical cancer screening: prospects and prejudices*. J Obstet Gynaecol, 2009. **29**(7): p. 583-9.
62. Alameda, F., et al., *Human papillomavirus detection in urine samples: an alternative screening method*. J Low Genit Tract Dis, 2007. **11**(1): p. 5-7.
63. Orlando, G., et al., *Rationale and design of a multicenter prospective cohort study for the eVALuation and monitoring of HPV Infections and relATed cervical diseases in high-risk women (VALHIDATE study)*. BMC Cancer, 2012. **12**(1): p. 204.
64. Jong, E., et al., *The prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in paired urine and cervical smear samples of HIV-infected women*. J Clin Virol, 2008. **41**(2): p. 111-5.
65. Cervantes, J., et al., *Prevalence of human papillomavirus infection in rural villages of the Bolivian Amazon*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2003. **45**(3): p. 131-5.
66. Olmos, M., et al., *Recomendaciones para la tamización de neoplasias del cuello uterino en mujeres sin antecedentes de patología cervical (preinvasora o invasora) en Colombia, 2007*, Instituto Nacional de Cancerología (INS): Bogotá D.C., Colombia. p. 1-64.
67. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
68. Remmerbach, T.W., et al., *PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets*. J Clin Virol, 2004. **30**(4): p. 302-8.

69. Qu, W., et al., *PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(6): p. 1304-10.
70. Fujinaga, Y., et al., *Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction*. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 5)**: p. 1039-44.
71. Munoz, M., et al., *The diagnostic performance of classical molecular tests used for detecting human papillomavirus*. J Virol Methods, 2012. **185**(1): p. 32-8.
72. de Roda Husman, A.M., et al., *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR*. J Gen Virol, 1995. **76 (Pt 4)**: p. 1057-62.
73. Fuessel Haws, A.L., et al., *Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples*. J Virol Methods, 2004. **122**(1): p. 87-93.
74. Parkin, D.M., K.S. Louie, and G. Clifford, *Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the Asia Pacific region*. Vaccine, 2008. **26**(Suppl 12): p. M1-16.
75. Sotlar, K., et al., *Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3176-84.
76. Karlsen, F., et al., *Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(9): p. 2095-100.
77. Lee, Y.M., et al., *Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer*. J Microbiol Immunol Infect, 2001. **34**(2): p. 87-91.
78. Manos, M., et al., *The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses*. Cancer Cells, 1989. **7**: p. 209-214.
79. Orjuela, K., C. Amador, and M.A. Patarroyo, *Synthetic genes: a tool for identifying human papillomavirus genotypes by hybridization and polymerase chain reaction-based assays*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. **59**(1): p. 101-4.
80. Kreader, C.A., *Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(3): p. 1102-6.
81. Anderson, J.R., et al., *Accuracy of Papanicolaou test among HIV-infected women*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(4): p. 562-8.
82. Rositch, A.F., et al., *Knowledge and acceptability of pap smears, self-sampling and HPV vaccination among adult women in Kenya*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40766.
83. Bosch, F.X., et al., *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*. J Clin Pathol, 2002. **55**(4): p. 244-65.
84. D'Hauwers, K., et al., *Urine versus brushed samples in human papillomavirus screening: study in both genders*. Asian J Androl, 2007. **9**(5): p. 705-10.

85. Song, E.S., H.J. Lee, and T.S. Hwang, *Clinical efficacy of human papillomavirus DNA detection in urine from patients with various cervical lesions*. J Korean Med Sci, 2007. **22**(1): p. 99-104.
86. Cuschieri, K., et al., *Urine testing as a surveillance tool to monitor the impact of HPV immunization programs*. J Med Virol, 2011. **83**(11): p. 1983-7.
87. Castle, P.E., et al., *A comparison of cervical and vaginal human papillomavirus*. Sex Transm Dis, 2007. **34**(11): p. 849-55.
88. Moscicki, A.B., et al., *Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/42-51.
89. Macleod, I.J., et al., *Prevalence of human papillomavirus genotypes and associated cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women in Botswana*. J Med Virol, 2011. **83**(10): p. 1689-95.
90. D'Hauwers, K.W. and W.A. Tjalma, *Screening for human papillomavirus: is urine useful?* Indian J Cancer, 2009. **46**(3): p. 190-3.
91. Murthy, N.S. and A. Mathew, *Risk factors for pre-cancerous lesions of the cervix*. Eur J Cancer Prev, 2000. **9**(1): p. 5-14.
92. Hildesheim, A., et al., *HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica*. Br J Cancer, 2001. **84**(9): p. 1219-26.

**A. Anexo: Consentimiento
informado para participar en
el estudio**

Consentimiento Informado Para Participar En El Proyecto.

Participante N° _____



DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INFECCIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y PREVALENCIAS TIPO-ESPECÍFICAS EN MUJERES COLOMBIANAS INFECTADAS CON VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).



FIDIC

CONSENTIMIENTO INFORMADO

ASISTENCIA CIENTIFICA DE ALTA COMPLEJIDAD & FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA

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

El virus de papiloma humano (VPH) causa el cáncer de cuello uterino. Es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres del mundo y el primero en países en vías de desarrollo como el nuestro. Tu participación en este estudio es para tu propio beneficio, ya que te tomas la citología cervical de tu control rutinario, obtienes un resultado que podría ayudarte a tomar tratamiento adecuado y además realizas una generosa contribución al desarrollo de la ciencia y a la mejoría de la salud de nuestros semejantes.

Procedimientos a seguir

Si estás de acuerdo en participar en este estudio, se te solicitará la donación de una (1) muestra de orina y una (1) muestra citológica cervico-vaginal para análisis de ADN viral.

Período de participación

El tiempo necesario para la obtención de la muestra de orina y para la toma de la muestra de la citología. El análisis de resultados será junto con tu médico tratante.

Riesgos

Este estudio se considera de bajo riesgo. La toma de la muestra de orina es sencilla y rápida y la toma de la muestra cervical no presenta molestias adicionales a la citología-colposcopia.

Beneficios

Recibirás a través de tu médico tratante, el resultado de los exámenes practicados. Esto ayudará para la toma de decisiones en tu caso particular. Además significa un nuevo conocimiento acerca de la infección por VPH en pacientes conviviendo con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Confidencialidad

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

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

Por medio de la presente constancia, en pleno y normal uso de mis facultades mentales, otorgo en forma libre mi consentimiento a la FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA y ASISTENCIA CIENTIFICA DE ALTA COMPLEJIDAD LTDA para proporcionar la muestra de orina y que me sea practicada la citología y la determinación de infección virus del papiloma humano (VPH) y su correspondiente genotipificación.

Declaro que se me ha suministrado información sobre la prueba y aspectos concernientes a la infección por el VPH, dentro del desarrollo de mi tamización rutinaria para la detección de lesiones cervicales, y para un trabajo de investigación que busca detectar este virus en mi muestra de orina y de mis células cervicales, para recibir posteriormente las indicaciones que se requieran en el manejo de esta infección.

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

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

Firma _____

Nombre: _____ Identificación _____

Dirección: _____

Lugar y fecha: _____

**B. Anexo: Formato de historia
clínica**



DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INFECCIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y PREVALENCIAS TIPO-ESPECÍFICAS EN MUJERES COLOMBIANAS INFECTADAS CON VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).



FIDIC

ASISTENCIA CIENTÍFICA DE ALTA COMPLEJIDAD & FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA

Formato De Historia Clínica

Fecha: _____		Ciudad: _____		Participante N°: _____	
Nombre: _____				Cédula: _____	
Dirección de residencia habitual			Municipio		Departamento
Teléfono Fijo: _____			Teléfono Celular: _____		
Ha pensado cambiar de residencia en los próximos dos años: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>				Estrato Socioeconómico: _____	
Nivel Educativo: Analfabeto <input type="checkbox"/> Primaria <input type="checkbox"/> Secundaria <input type="checkbox"/> Técnica <input type="checkbox"/> Superior <input type="checkbox"/>					
Fecha de Nacimiento: D/M/A			Edad: _____		
Cuántas personas componen su núcleo familiar: _____			Promedio de ingresos mensuales en su núcleo familiar: _____		
Raza: <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Blanca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Mestiza <input type="checkbox"/> Otra				G P A	
Fuma actualmente: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		Cuántos cigarrillos fuma semanalmente: _____			
Ha consumido alguna de estas sustancias: Marihuana <input type="checkbox"/> Heroína <input type="checkbox"/> Cocaína <input type="checkbox"/> Otra <input type="checkbox"/> Cual _____					
Hace cuanto Tiempo: _____		Con Que Frecuencia: _____			
I _____			Edad primera relación: _____		N° de compañeros sexuales: _____
Citologías previas: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		Fecha última citología: D/M/A		Resultado: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal	
Método de planificación: <input type="checkbox"/> 1. Sin Método <input type="checkbox"/> 3. Ant orales <input type="checkbox"/> 5. Condón <input type="checkbox"/> 7. Norplant <input type="checkbox"/> 9. Embarazo					
<input type="checkbox"/> 2. D.I.U <input type="checkbox"/> 4. Inyectables <input type="checkbox"/> 6. Cirugía <input type="checkbox"/> 8. Menopausia					
Infecciones concomitantes: Gonorrea <input type="checkbox"/> Sífilis <input type="checkbox"/> Condiloma <input type="checkbox"/> Candidiasis <input type="checkbox"/> Otras <input type="checkbox"/> Cual _____					
Estado civil: <input type="checkbox"/> Soltera <input type="checkbox"/> Union libre <input type="checkbox"/> Casada <input type="checkbox"/> Separada <input type="checkbox"/> Viuda				Vida sexual activa: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
Alguna vez le practicaron:					
<input type="checkbox"/> Cauterización del Cuello Uterino		<input type="checkbox"/> Histerectomía		<input type="checkbox"/> Ninguna	
<input type="checkbox"/> Conización del Cuello Uterino		<input type="checkbox"/> Radioterapia			
Citología compatible con:					
<input type="checkbox"/> 0. ASC-US		<input type="checkbox"/> 3. Lesión intraepitelial escamosa de Alto grado (LEI AG)			
<input type="checkbox"/> 1. ASC-H		<input type="checkbox"/> 4. Carcinoma Invasivo			
<input type="checkbox"/> 2. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI BG)		<input type="checkbox"/> 5. Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad			
Observaciones:					
Firma del Responsable: _____					

C. Anexo: Artículo Publicado

Human Papillomavirus Detection from Human Immunodeficiency Virus-Infected Colombian Women's Paired Urine and Cervical Samples

Marina Munoz^{1,2,3}, Milena Camargo^{1,2}, Sara C. Soto-De Leon^{1,2}, Ricardo Sanchez^{1,3}, Diana Parra⁴, Andrea C. Pineda², Otto Sussmann⁴, Antonio Perez-Prados⁵, Manuel E. Patarroyo^{1,3}, Manuel A. Patarroyo^{1,2*}

1 Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia, **2** School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia, **3** Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, **4** Asistencia Científica de Alta Complejidad S.A.S., Bogotá, Colombia, **5** Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain

Abstract

Infection, coinfection and type-specific human papillomavirus (HPV) distribution was evaluated in human immunodeficiency virus (HIV)-positive women from paired cervical and urine samples. Paired cervical and urine samples (n = 204) were taken from HIV-positive women for identifying HPV-DNA presence by using polymerase chain reaction (PCR) with three generic primer sets (GP5+/6+, MY09/11 and pU1M/2R). HPV-positive samples were typed for six high-risk HPV (HR-HPV) (HPV-16, -18, -31, -33, -45 and -58) and two low-risk (LR-HPV) (HPV-6/11) types. Agreement between paired sample results and diagnostic performance was evaluated. HPV infection prevalence was 70.6% in cervical and 63.2% in urine samples. HPV-16 was the most prevalent HPV type in both types of sample (66.7% in cervical samples and 62.0% in urine) followed by HPV-31 (47.2%) in cervical samples and HPV-58 (35.7%) in urine samples. There was 55.4% coinfection (infection by more than one type of HPV) in cervical samples and 40.2% in urine samples. Abnormal Papanicolaou smears were observed in 25.3% of the women, presenting significant association with HPV-DNA being identified in urine samples. There was poor agreement of cervical and urine sample results in generic and type-specific detection of HPV. Urine samples provided the best diagnosis when taking cytological findings as reference. In conclusion including urine samples could be a good strategy for ensuring adherence to screening programs aimed at reducing the impact of cervical cancer, since this sample is easy to obtain and showed good diagnostic performance.

Citation: Munoz M, Camargo M, Soto-De Leon SC, Sanchez R, Parra D, et al. (2013) Human Papillomavirus Detection from Human Immunodeficiency Virus-Infected Colombian Women's Paired Urine and Cervical Samples. PLoS ONE 8(2): e56509. doi:10.1371/journal.pone.0056509

Editor: Sten H. Vermund, Vanderbilt University, United States of America

Received: September 26, 2012; **Accepted:** January 10, 2013; **Published:** February 13, 2013

Copyright: © 2013 Munoz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project was funded by the Basque Cooperation Agency Development and by the Spanish Agency for International Development Cooperation (AEICID). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mapatarr.fidic@gmail.com

Introduction

The human immunodeficiency virus (HIV) is a sexually-transmitted infection (STD) having a great impact around the world due to the large amount of people living with such infection (34.2 million) and the frequent appearance of new cases (2.5 million in 2011) [1]. It is characterized by affecting immune system CD4+ cells, thereby leading to a reduction in the body's efficiency regarding the presentation of a response against other pathogens, making an individual more vulnerable to other types of infection [2].

Some studies have suggested that women living with HIV/AIDS have increased frequency and incidence of single and multiple infections caused by human papillomavirus (HPV) [3]; the natural history of infection becomes altered, thereby leading to an increased risk of developing cervical cancer (CC) and contributing towards this type of cancer being the most frequently diagnosed in HIV-positive women [4]. This relationship may be due to: higher HPV exposure in HIV-infected women, increased frequency of main risk factors involved in CC development or the

role of HIV-related immunosuppression in favoring carcinogenesis [5].

The immunosuppression can be attenuated through using antiretroviral therapy which favors balanced counts of CD4 lymphocytes, however, this therapy has not been consistently implicated in the reduction of HPV-related diseases [6].

The CC incidence in the Colombian general population is 36.4 cases/year/100,000 women [7]; the disease onset occurs approximately between 7 and 12 years after initial HPV infection [8]. These clinical features are altered in women infected simultaneously with HPV and HIV where a short-term clinical outcome usually occurs, involving lesions developing more aggressively, slower HPV infection regression rates and poorer responses to treatment [9]; such factors mean that pre-cancerous lesions could reach 60% (evolving in less than 3 years) [10].

Cervical cytology is the most widely used strategy for reducing the cervical cancer burden around the world [11]. However, this screening test has reduced impact in HIV-infected women, as this group has a greater probability of becoming infected with HPV and developing cervical lesions [12], which has led to cytological

screening guidelines being rewritten, now including a test every six months during the first year followed by a yearly check-up scheme if no lesions are observed [13]. Nevertheless, cytology coverage in this group of women is poor and insufficient [10], therefore, monitoring programs that allow the constant screening in extended time periods is thus suggested, considering the high risk associated with this group of women.

In view of the above, the use of complementary techniques to the Papanicolaou test could represent a useful tool in detecting women at risk. Some of these methods are non-invasive, such as self-sampling, as when they are used in screening programs they could provide advantages related to increased acceptance regarding sample-taking, adherence and following-up women, especially those having some form of immunological compromise [14,15].

Specimen tampons, vaginal swabs and urine samples have been studied as self-sampling methods; such sampling methods are also used for detecting other sexually-transmitted pathogens affecting the cervical area [9,16], urine samples being the easiest to obtain and having had the greatest acceptance in the population. However, they do have some limitations, including low cellular load and they are not taken directly from the HPV infection site; this could mean that the results obtained from this type of sample might not reflect the real clinical state of an infection [14].

In spite of their limitations, using urine samples as a test for detecting HPV-DNA presence could facilitate frequent sample-taking due to their practicality and greater acceptance among women. This could be useful in studies involving a large number of samples and a pelvic examination is also not required, meaning that sample-taking will not affect the natural history of HPV infection as there is no risk of micro-lesions being produced, nor will inflammatory reactions occur [15].

Despite of multiple studies available in the literature that have evaluated HPV-DNA detection from urine sample [15], a few number of these have been described the diagnostic performance of this sample in HIV-positive women population. Furthermore those who have done it had included a limited number of individuals [9,17].

In Colombia high prevalence of HPV infection and co-infection in healthy women population have been reported, using cervical samples [18,19]. However haven't be evaluated HPV DNA detection from urine samples neither in HIV-positive women population.

This study aimed at identifying the infection, coinfection (defined here as being infection by more than one type of HPV simultaneously) and type-specific distribution profile of six high-risk HPV (HR-HPV) types and two low-risk (LR-HPV) types, from paired cervical and urine samples of women diagnosed with HIV/AIDS, confirmed by Western blot. Finally, we evaluated the diagnostic performance of urine samples compared to cervical samples for detecting HPV infection.

Materials and Methods

Study population and sample size

HIV-infected women (such infection having been confirmed by Western blot) participating in cervical cancer screening campaigns being offered by the Centro de Asistencia Científica de Alta Complejidad S.A.S., in Bogotá, Colombia, were included in the present study. The study was approved and supervised by the participating institutions' ethics committees: Fundación Instituto de Inmunología de Colombia's ethics committee and Centro de Asistencia Científica de Alta Complejidad S.A.S.' ethics committee.

Sample size was calculated assuming an estimated 80% HPV infection rate in HIV-positive women [4,17,20], according to data reported in the literature. Estimators were calculated using 0.05 precision along with 95% confidence intervals (95%CI) using STATA9 software `sampsi` command.

Collecting and processing cervical and urine samples

All the women enrolled in the study were informed about the research objective; they signed an informed consent form and filled in a questionnaire to facilitate collecting socio-demographic data and information regarding their sexual habits and other risk factors related to acquiring HPV infection.

Each woman's urine and cervical samples were taken on the same day; the first sample from a midstream urine specimen was self-collected, kept at 4°C and processed within 72 hours after being collected. The second sample taken from cervical cells was obtained during Papanicolaou test, following Colombian obligatory health plan guidelines regarding cervical cancer detection and control programs in Colombia [21]; these cells were preserved in 95% ethanol [22,23] and kept at 4°C until being processed. The histological findings were reported following the Bethesda classification [13].

The cells were precipitated by spinning at 2,300× *g* for 20 minutes at 4°C for urine samples and at 15,000× *g* for 10 minutes at 4°C for cervical samples. DNA was extracted from cell pellets of paired samples using a QuickExtract DNA extraction kit (Epicentre, Madison, WI), following the manufacturer's instructions. Two PCR amplifications were made with specific primers directed at a segment of the human β -globin constitutive gene (GH20/PC04 and PC03/PC04) for evaluating DNA integrity [18,22,24].

Detecting human papillomavirus DNA by PCR amplification

Samples yielding a positive result for the human β -globin gene were amplified for detecting HPV using three consensus primer sets (for detecting more infected women) as it has been reported that using a single set might lead to underestimating viral prevalence compared to studies using more than one generic detection system [25].

Two of the primers sets were directed to the region encoding late viral protein L1: GP5+/6+ and MY09/11 [26,27]; PCR conditions have been described previously [22]. A third set of primers (pU1M/2R) was directed to the HR-HPV E6/E7 region [28,29]. Assays were run in a final 25 μ l volume. The mix contained 1× amplification buffer, 100 μ M of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1 U MangoTaq DNA polymerase (Bioline, London, UK) and 1 μ M of each primer. The following amplification profile was used: an initial denaturing step at 94°C for 10 min, followed by 30 amplification cycles lasting 1 min at 94°C, 2 min at 53°C and 2 min at 72°C, followed by a final extension step for 7 min at 72°C.

Generic primer sets' HPV-DNA detection analytical sensitivity has been reported in previous studies, the detection limit being 10² and 10⁴ plasmid copies in 100 ng HPV-DNA for HPV-16 and -45, respectively, using a GP5+/6+ primer set [30], 10 HPV copies of HPV-31 type and 10² HPV copies of HPV-16, -18, -33, -45 and -58 using an MY09/11 primer set [31] and 0.1 copies of the HPV-16 genome per cell using a pU1M/2R primer set [28].

Samples which proved positive for any of the three generic primer sets were amplified by PCR for identifying the six HR-HPV viral types (HR-HPV-16, -18, -31, -33, -45, -58), using type-specific primers targeting the E5, E6 and E7 regions, according to that reported in the literature for each viral type [22,32,33]. Two

types of LR-HPV were detected (LR-HPV-6/11) [22,34]. The amplification products were visualized on 2% agarose gels for human β -globin and the three generic reactions, and on 2.5% gels for the type-specific reactions. All gels were stained with SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Statistical analysis

Means and standard deviations were used for describing continuous variables; categorical variables were expressed in terms of frequencies and percentages. The frequency of events of interest was reported together with their corresponding 95% confidence intervals that were calculated using the bootstrap method. The association between categorical variables was evaluated with Chi-square (χ^2) tests, using a significance level of 0.05.

Agreement between HPV results for urine and cervical samples was evaluated using the kappa coefficient (κ), and its corresponding 95%CI, classified as follows: negative values, as well as values from 0 to 0.2 = poor, from 0.21 to 0.4 = slight, from 0.41 to 0.6 = fair, from 0.61 to 0.8 = moderate, from 0.81 to 0.99 = substantial and 1.0 = perfect agreement [27]. The urine HPV tests' operative characteristics were evaluated for determining sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and receiver operating characteristic (ROC) area (as the average of sensitivity and specificity), taking the HPV cervical sample result as reference. STATA 9 software was used for all statistical analysis.

Results

Socio-demographic data

Two hundred and forty five women between 20 and 73 years old, were enrolled in the study (mean age: 38.1 years; SD 10.7 years) (Table 1). Two hundred and thirty nine of the 245 cervical samples (97.6%) were positive by human β -globin amplification and 208 of the 226 urine samples (92.4%). Fifty one women were not included in the statistical analysis due to their samples' low DNA quality (negative result for β -globin) or a lack of either of the samples (cervical or urine).

Human papillomavirus prevalence and type-specific distribution

HPV infection frequency in cervical and urine samples was 70.6% (n = 144; 63.8–73.7 95%CI) and 63.2% (n = 129; 56.2–69.9 95%CI), respectively. Type-specific viral identification revealed that HPV-16 had the greatest prevalence in both samples, whilst HPV-31 had the second greatest prevalence in the cervical samples and HPV-58 in urine samples; the other viral types had a variable distribution in both samples (Figure 1).

It was found that 55.4% (n = 113; 95% CI = 48.3–62.3) of the cervical samples had coinfection, compared to 40.2% (n = 82; 33.4–47.3 95%CI) of the urine samples. Regarding a description of the number of types of HPV simultaneously present in each sample analyzed, urine samples revealed more uninfected women or those having just one HPV-type compared to the results obtained for cervical samples where more coinfections were detected (2 to 8 types of HPV). The presence of multiple infection per sample type had a statistically significant relationship (Fisher's exact test, p = 0.000) (Figure 2).

Cytological abnormalities and HPV presence

The Papanicolaou test gave abnormal cytological findings in 28.9% of the population (n = 56; 95% CI = 22.6–35.8), results being classified as follows: 10.3% (n = 20) had atypical squamous cells of undetermined significance (AS-CUS), 16.5% (n = 32) low-

Table 1. Description of the socio-demographic characteristics of the female population enrolled in the study.

Characteristic	Categories	n (%)*
Age, years (201)	20–34	91 (45.3)
	35–49	72 (35.8)
	≥50	38 (18.9)
Ethnicity (197)	White	132 (67.0)
	Indigenous	3 (1.5)
	Mestizo	58 (29.5)
	Black	4 (2.0)
Marital status (186)	Single	52 (27.9)
	Married	24 (12.9)
	Common law marriage	60 (32.3)
	Separated	21 (11.3)
	Widowed	29 (15.6)
Age at first intercourse (195)	<18	118 (60.5)
	≥18	77 (39.5)
Pregnancies (192)	None	9 (4.7)
	1	45 (23.4)
	2	51 (26.6)
	3	47 (24.5)
	≥4	40 (20.8)
Life time number of sexual partners (194)	1	30 (15.5)
	2	48 (24.7)
	3	43 (22.2)
	≥4	73 (37.6)
Contraceptive method** (165)	None	33 (20.0)
	Hormonal contraceptives	5 (3.0)
	Intrauterine device	11 (6.7)
	Surgery	35 (21.2)
	Condom	54 (32.7)
Smoking status (193)	Condom + other	27 (16.4)
	No	163 (84.5)
	Yes	30 (15.5)

*Categories have a size lower than 204, given that data was missing from the surveys.

**Contraceptive method used at the moment of enrollment in this study.
doi:10.1371/journal.pone.0056509.t001

grade squamous intraepithelial lesions (L-SIL) and 2.1% (n = 4) high-grade squamous intraepithelial lesions (H-SIL).

The HPV infection results obtained from the two samples were classified according the cytological results; data are shown in Table 2.

The association between the presence of HPV-DNA in each sample and the cytological findings (categorized as being normal/abnormal) revealed that 20.4% (n = 12) of the women having abnormal cytological findings had a negative result for HPV infection in the cervical sample while 78.6% gave a positive result (n = 44). Such difference was not statistically significant ($\chi^2(1) = 2.69$; p = 0.101). On the other hand, it was found that 19.6% (n = 11) of the samples having abnormal cytological findings had negative test for HPV-DNA in the urine sample,

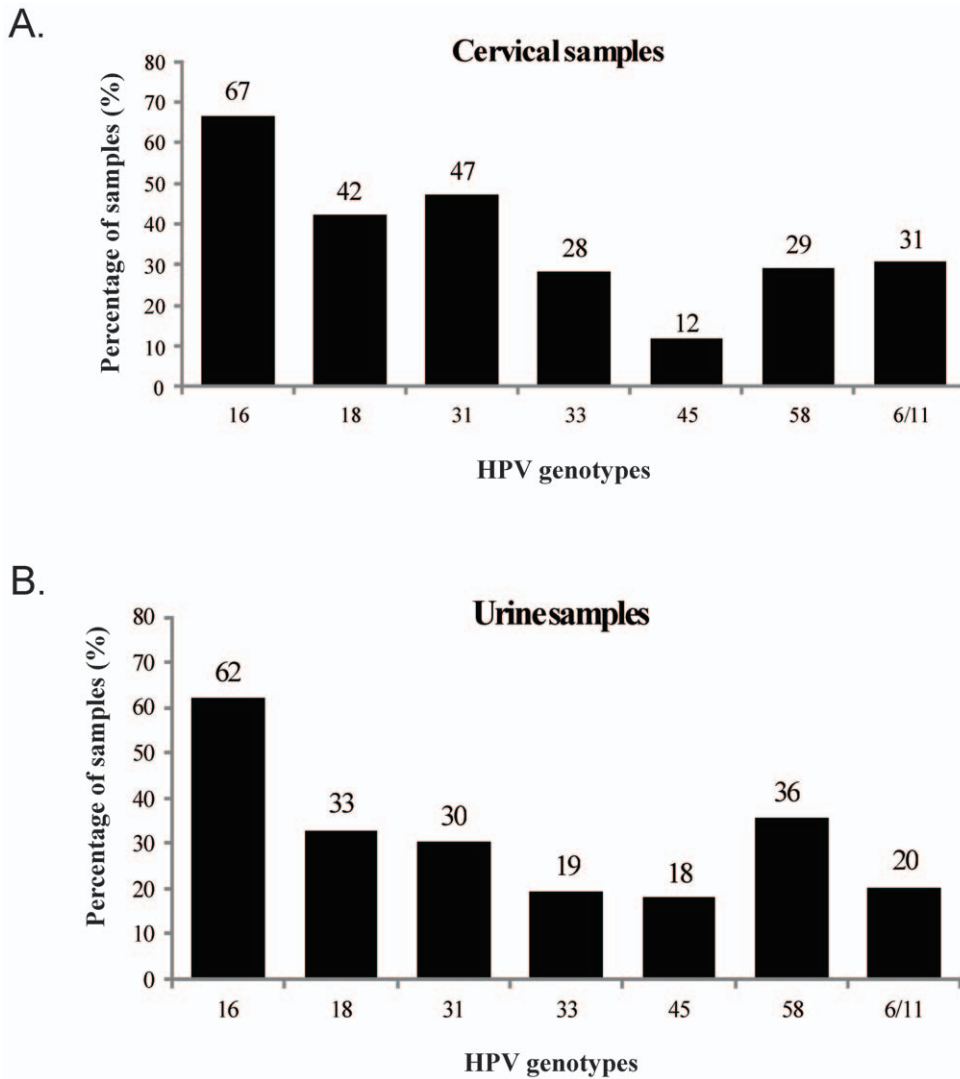


Figure 1. Prevalence of HPV types in cervical and urine samples for 204 HIV-infected Colombian women.
doi:10.1371/journal.pone.0056509.g001

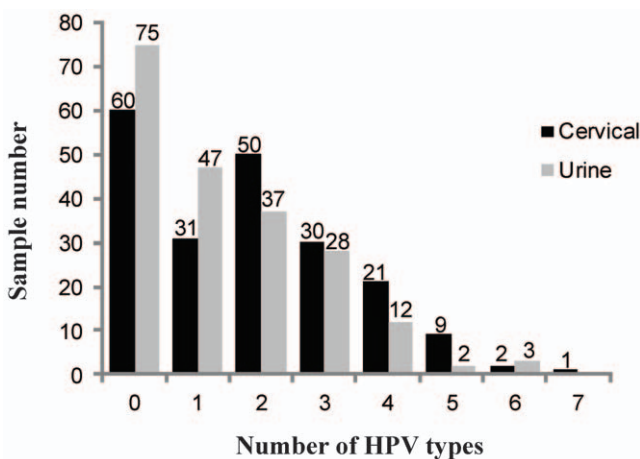


Figure 2. Number of HPV types in cervical and urine samples for 204 HIV-infected Colombian women.
doi:10.1371/journal.pone.0056509.g002

Table 2. HPV detection in both sample sources according to the cytological results.

	HPV detection n (%)				Total (194)
	Both positive	Cytology only	Urine only	Both negative	
Normal	57 (41.3)	35 (25.4)	22 (15.9)	24 (17.4)	138
ASC-US	12 (60.0)	4 (20.0)	3 (15.0)	1 (5.0)	20
L-SIL	24 (75.0)	1 (3.1)	3 (9.4)	4 (12.5)	32
H-SIL	2 (50.0)	1 (25.0)	1 (25.0)	0 (0.0)	4

The percentages show the frequency of women that tested positive with respect to the total per row. **AS-CUS**: Atypical squamous cells of undetermined significance. **H-SIL**: high-grade squamous intraepithelial lesions. **L-SIL**: Low-grade squamous intraepithelial lesions.
doi:10.1371/journal.pone.0056509.t002

compared to 80.4% (n = 45) where viral DNA was detected; this trend was statistically significant ($\chi^2(1) = 9.22$; $p = 0.002$).

Agreement between both samples and clinical performance

The results obtained for infection (generic and type-specific) in both samples (cervical and urine) were compared to cytological findings, categorizing the population as normal or abnormal (Tables 3-A and 3-B, respectively), where the generic identification of HPV-DNA, showed the greatest percentage agreement.

Agreement between paired samples showed that generic viral detection had greater than 50% agreement in the results obtained for the three sets of primers used, while greater agreement was found for HPV-33 and HPV-45 types for type-specific identification (even though these were the least prevalent in the population being studied). However, the κ values gave poor correlation in all cases (Figure 3).

The urine sample’s diagnostic performance revealed 68.8% sensitivity (60.5–76.2 95%CI), 50% specificity (36.8–63.2 95%CI), 76.7% positive predictive value (PPV) (68.5–83.7 95%CI), 40% negative predictive value (NPV) (28.9–52 95%CI) and a 0.59 ROC area (0.52–0.67 95%CI).

Discussion

Developing cervical cancer has been related to factors determining its progression, including the type of HPV infection, viral load and persistence of the infection [35]. Nevertheless, as most women have an efficient immune system they can manage to rid themselves of infection within a period of less than two years [36].

However, when immune system activity becomes compromised, as in HIV-positive women, the elimination of concomitant infection is less efficient; a clear example lies in that described for women suffering simultaneous HIV-HPV infection whose natural history of infection becomes altered, thereby leading to the appearance of cervical lesions in less time. This is related to a reduction in HPV elimination rates, greater efficiency regarding the cellular transformation of all viral types and lower lesion regression rates [4].

According to the data obtained in this study, DNA integrity confirmed by amplifying two segments of the human β -globin gene (as an indirect measurement method) revealed that the percentage of samples having degraded or non-amplifiable DNA were low in both cervical and urine samples, thereby highlighting that the latter also represents a good source of DNA for amplifying specific targets using molecular biology techniques and could thus be considered as a useful cervical screening tool (in spite of 30% inhibition having been reported for such amplification) [37,38].

The frequency of HPV infection detected in the present population agreed with that reported in previous studies carried out on populations having similar characteristics, such as that reported by Ferenczy *et al.*, who described 73.6% crude HPV infection prevalence from cervical samples taken from sexually-active HIV-positive women [3]. Nevertheless, HPV infection prevalence in urine in the present study was lower than that in cervical samples; similar data have been reported previously for this type of sample [39]. Such difference in viral detection percentage could have been related to the low number of exfoliated cervical cells present in urine, to the presence of PCR inhibitors in this sample [37] or to methodological issues related with sampling strategies, storage conditions, sample manipulation and DNA extraction method that could affect the HPV-DNA detection [15]; therefore is necessary to continue working on the improvement of protocols for HPV-DNA detection from urine sample.

Regarding type-specific distribution, the data obtained from cervical samples agreed with published reports concerning the general Colombian population, HPV-16 being the most prevalent type, followed by HPV-31 [18]. However, urine samples’ type-specific distribution profile revealed some differences compared to that for the cervical samples, HPV-18 being the second most prevalent type, this being similar to worldwide data reported in the pertinent literature [40]. It was also found that HPV-58 and HPV-45 were the only two viral types more prevalent in urine samples than in cervical samples, which could have been related to the fact that some viral types may preferentially infect the vagina’s keratinized tissue than the non-keratinized tissue of the cervix [41]; however, more research needs to be done into HPV infection profiles regarding different areas of the lower genital tract.

Table 3. HPV detection and type-specific distribution from each source sample (cervical and urine) in the group of women having normal and abnormal cytological findings.

	Women having a normal cytology result (n = 138)				Women having an abnormal cytology result (n = 56)			
	n (%)				n (%)			
	Both positive	Cervical sample only	Urine sample only	Both negative	Both positive	Cervical sample only	Urine sample only	Both negative
HPV infection*	57 (41.3)	35 (25.4)	22 (15.9)	24 (17.4)	38 (67.9)	6 (10.7)	7 (12.5)	5 (8.9)
HPV-16	23 (20.2)	41 (36.0)	22 (19.3)	28 (24.5)	14 (27.5)	12 (23.5)	17 (33.3)	8 (15.7)
HPV-18	6 (5.3)	33 (28.9)	19 (16.7)	56 (49.1)	6 (11.8)	12 (23.5)	10 (19.6)	23 (45.1)
HPV-31	7 (6.1)	31 (27.2)	17 (14.9)	59 (51.8)	5 (9.8)	21 (41.2)	9 (17.6)	16 (31.4)
HPV-33	4 (3.5)	20 (17.6)	12 (10.5)	78 (68.4)	5 (9.8)	11 (21.6)	3 (5.9)	32 (62.7)
HPV-45	0 (0.0)	7 (6.2)	12 (10.5)	95 (83.3)	1 (2.0)	7 (13.7)	10 (19.6)	33 (64.7)
HPV-58	4 (3.5)	20 (17.5)	22 (19.3)	68 (59.7)	6 (11.8)	9 (17.6)	13 (25.5)	23 (45.1)
HPV-6/11	2 (1.8)	20 (17.5)	14 (12.3)	78 (68.4)	5 (9.8)	13 (25.5)	2 (3.9)	31 (60.8)

*The positivity percentage for HPV infection (using generic primers) in each sample source. Type-specific identification was used in some HPV infection-positive women regarding any of the sample sources (n = 114 and n = 51 for the groups of women having normal or abnormal cytology result, respectively).

doi:10.1371/journal.pone.0056509.t003

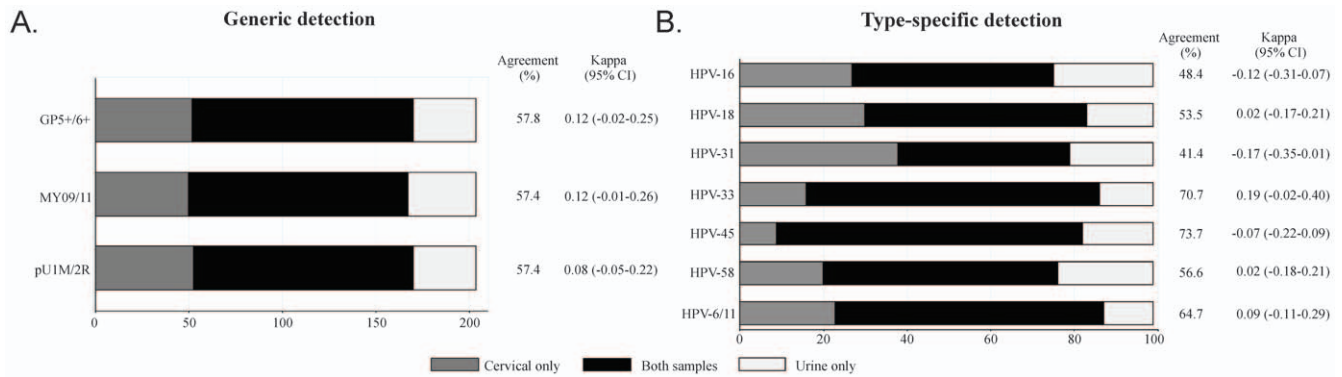


Figure 3. Agreement between generic and type-specific detection in cervical and urine samples taken from HIV-positive women. doi:10.1371/journal.pone.0056509.g003

In addition, the variations in HPV type-specific distribution profile could have been related to the presence of HIV infection as it has been described that such distribution in immunologically-compromised women could vary; moreover, it has been described that such incidence is 16 times higher in the immunologically-compromised group than that found in immunologically-competent women [3]. An additional explanation for the different viral type distribution between samples could be attributable to a varying exfoliation pattern in cells infected with each viral type, however, it has not yet been established whether exfoliated cells in urine are influenced by viral infection type or the state of infection [15].

Coinfection was found in both urine and cervical samples in around half the study population; this could have been attributed to the low infection elimination rate allowing different viral types to settle in the cervical epithelium; multiple infection events could have been also due to the reduced systemic and local cell immunity found in HIV-positive women [12].

There was poor agreement between generic and type-specific identification results; this may have been related to the samples' different nature, as well as HPV tropism for cervical epithelium. A lower number of viral copies in urine are expected regarding cervical samples, as the latter would have been taken from the pathogen's direct localization site.

Interestingly, the test involving self-collected urine samples had greater sensitivity (68.8% in this study vs. 55.3%) and more specificity (50.0% in this study vs. 44.9%) for detecting HPV-DNA compared with a previous study using the same identification protocol [19], which could indicate a potential use for the clinical

application of this sample source. Nevertheless, additional studies must be carried out in the general population for determining clinical applicability, storage conditions, suitable extraction method, the most appropriate urine fraction to be used in the molecular analysis, and other factors that could affect the diagnostic performance of this sample source.

Developing strategies in cervical cancer control and prevention programs will be particularly determinant in contributing towards increasing coverage, sample taking, adherence and follow-up of women, mainly those presenting some type of immunosuppression. According to the results obtained here, self-sampling methods, such as urine sampling, could be taken into account as useful tools for preventing this pathology, since they offer good diagnostic performance and greater acceptability among women.

Acknowledgments

We would like to express our thanks to Camilo Jaimes for technical support and Jason Garry for translating and revising this manuscript. We would also like to extend our thanks to the IDIME laboratory for contributing to sampling logistics. In loving memory of Luis Segundo Fontanilla De La Hoz.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM MC SCS DL RS MEP MAP. Performed the experiments: MM MC SCS DL. Analyzed the data: MM MC SCS DL RS DP ACP OS APP MEP MAP. Contributed reagents/materials/analysis tools: DP ACP OS APP. Wrote the paper: MM MC SCS DL RS APP MEP MAP.

References

- WHO (2011) GLOBAL HIV/AIDS RESPONSE: Epidemic update and health sector progress towards Universal Access. Global summary of the AIDS epidemic.
- Feller L, Lemmer J (2007) Aspects of immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *SADJ* 62: 432–436.
- Ferencyz A, Coutlee F, Franco E, Hankins C (2003) Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ* 169: 431–434.
- Clarke B, Chetty R (2002) Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol* 55: 19–24.
- Chirenje ZM (2005) HIV and cancer of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 19: 269–276.
- de Sanjose S, Palefsky J (2002) Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res* 89: 201–211.
- WHO/ICO (2010) Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Colombia. Summary Report.
- Moscicki AB (2005) Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health* 37: S3–9.
- Brinkman JA, Jones WE, Gaffga AM, Sanders JA, Chaturvedi AK, et al. (2002) Detection of human papillomavirus DNA in urine specimens from human immunodeficiency virus-positive women. *J Clin Microbiol* 40: 3155–3161.
- Heard I (2009) Prevention of cervical cancer in women with HIV. *Curr Opin HIV AIDS* 4: 68–73.
- Denny L (2012) Cytological screening for cervical cancer prevention. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26: 189–196.
- Del Mistro A, Chicco Bianchi L (2001) HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer* 37: 1227–1235.
- Olmos M, Acosta J, Preciado S, Arias S, Ballesteros M, et al. (2007) Recomendaciones para la tamización de neoplasias del cuello uterino en mujeres sin antecedentes de patología cervical (preinvasora o invasora) en Colombia. Bogotá D.C., Colombia: Instituto Nacional de Cancerología (INS). pp. 64.
- Sehgal A, Gupta S, Parashari A, Sodhani P, Singh V (2009) Urine HPV-DNA detection for cervical cancer screening: prospects and prejudices. *J Obstet Gynaecol* 29: 583–589.
- Vorsters A, Micalessi I, Bilcke J, Ieven M, Bogers J, et al. (2012) Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 627–640.

16. Sellors JW, Lorincz AT, Mahony JB, Mielzynska I, Lytwyn A, et al. (2000) Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions. *CMAJ* 163: 513–518.
17. Jong E, Mulder JW, van Gorp EC, Wagenaar JK, Derksen J, et al. (2008) The prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in paired urine and cervical smear samples of HIV-infected women. *J Clin Virol* 41: 111–115.
18. Camargo M, Soto-De Leon SC, Sanchez R, Perez-Prados A, Patarroyo ME, et al. (2011) Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia. *Ann Epidemiol* 21: 204–213.
19. Munoz M, Camargo M, Soto-De Leon SC, Rojas-Villarraga A, Sanchez R, et al. (2012) The diagnostic performance of classical molecular tests used for detecting human papillomavirus. *J Virol Methods* 185: 32–38.
20. Gillison ML, Shah KV (2003) Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 57–65.
21. Posso HJ, Wiesner C, Piñeros M, Hernando R, González M, et al. (2005) Acciones en el plan obligatorio de salud. Manual de normas técnico – administrativas para el programa de detección y control del cáncer de cuello uterino en el sistema general de seguridad en salud. II ed. Bogotá - Colombia. pp. 190.
22. Camargo M, Soto-De Leon S, Sanchez R, Munoz M, Vega E, et al. (2011) Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: Comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets. *J Virol Methods* 178: 68–74.
23. Cervantes J, Lema C, Hurtado L, Andrade R, Quiroga G, et al. (2003) Prevalence of human papillomavirus infection in rural villages of the Bolivian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45: 131–135.
24. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
25. Ifitner T, Villa LL (2003) Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 80–88.
26. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76 (Pt 4): 1057–1062.
27. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kuhndel K, et al. (2004) PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 30: 302–308.
28. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, et al. (1991) Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 72 (Pt 5): 1039–1044.
29. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Rys J, Kope J, et al. (2006) Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochim Pol* 53: 603–607.
30. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M (2008) Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 46: 1050–1059.
31. Depuydt CE, Boulet GA, Horvath CA, Benoy IH, Vereecken AJ, et al. (2007) Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *J Cell Mol Med* 11: 881–891.
32. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, et al. (1996) Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 34: 2095–2100.
33. Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Liu WT (2001) Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect* 34: 87–91.
34. Sotlar K, Diemer D, Dethlefs A, Hack Y, Stubner A, et al. (2004) Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42: 3176–3184.
35. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N (2002) Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89: 191–199.
36. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL (2006) Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/42–51.
37. D'Hauwers K, Depuydt C, Bogers JP, Stalpaert M, Vereecken A, et al. (2007) Urine versus brushed samples in human papillomavirus screening: study in both genders. *Asian J Androl* 9: 705–710.
38. Song ES, Lee HJ, Hwang TS (2007) Clinical efficacy of human papillomavirus DNA detection in urine from patients with various cervical lesions. *J Korean Med Sci* 22: 99–104.
39. Cuschieri K, Nandwani R, McGough P, Cook F, Hogg L, et al. (2011) Urine testing as a surveillance tool to monitor the impact of HPV immunization programs. *J Med Virol* 83: 1983–1987.
40. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S (2007) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370: 890–907.
41. Castle PE, Rodriguez AC, Porras C, Herrero R, Schiffman M, et al. (2007) A comparison of cervical and vaginal human papillomavirus. *Sex Transm Dis* 34: 849–855.

**D. Anexo: Artículo sometido a
revisión**

1 **Classical molecular tests using urine samples as a potential screening tool for human**
2 **papillomavirus detection in human immunodeficiency virus-infected women**

3
4 **Running title:** Urine samples: a tool for HPV detection in HIV infected women

5
6 Marina Munoz^{a,b,c}, Milena Camargo^{a,b}, Sara C. Soto-De Leon^{a,b}, Ricardo Sanchez^{a,c}, Andrea C.
7 Pineda-Peña^d, Antonio Perez-Prados^e, Manuel E. Patarroyo^{a,c} and Manuel A. Patarroyo^{a,b} #

8
9 **Author Affiliations**

10 ^a Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia.

11 ^b School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

12 ^c Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

13 ^d Faculty of Natural and Mathematical Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

14 ^e Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain.

15
16 **# Corresponding author**

17 Manuel A. Patarroyo, M.D., Dr.Sc.

18 Address: Cra. 50 # 26-20

19 Telephone number: +57-1-3244672 Ext. 141

20 Fax number: +57-1-4815269

21 E-mail: mapatarr.fidic@gmail.com

22