

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
UNIVERSIDAD CES
PROGRAMA DE POSGRADO: ESPECIALIZACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA

***CARGA VIRAL DE SEIS TIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE
ALTO RIESGO Y SU ASOCIACION CON LESIONES CERVICALES***

TRABAJO DE GRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN EPIDEMIOLOGÍA

Presentado por

LUISA FERNANDA DEL RÍO OSPINA, M.D.

Dirigido por

SARA CECILIA SOTO DE LEÓN, B.Sc. D.Sc

BOGOTÁ, D.C. 2015

AUTORES

Luisa Fernanda Del Río Ospina, M.D.

Médica Cirujana, egresada del Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario.

Estudiante de la Especialización de Epidemiología Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario.

Investigadora del Grupo Funcional de Biología Molecular; proyecto del Virus del Papiloma Humano, en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

E-mail: delrio.luisa@urosario.edu.co / lfda.drio@gmail.com

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario

Universidad CES – Medellín

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no habría podido realizarse sin la colaboración de las personas que participaron en la recolección de las muestras y diligenciamiento de los cuestionarios de información en cada una de las instituciones de salud que participaron en el desarrollo del estudio multicéntrico.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, a los doctores Manuel Elkin y Manuel Alfonso Patarroyo, mil gracias, por brindarme la oportunidad de realizar éste trabajo. Agradezco el esfuerzo, y dedicación de Sara Cecilia Soto de León, quien dirigió este estudio y el apoyo del grupo de investigadores, Milena Camargo, Marina Muñoz, Andrés Moreno, quienes contribuyeron al desarrollo, con su colaboración, su experiencia y conocimientos.

Al doctor Ricardo Sánchez, por su colaboración y asesoría para el análisis de los resultados. De igual manera agradecida con todos los docentes de la especialización por sus enseñanzas.

Con Dios y mi familia eternamente agradecida.

RESUMEN

Introducción: La infección por un tipo de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR), es el factor principal en el desarrollo de Cáncer de Cérvix (CC). La carga viral puede modular esta asociación, por lo que resulta importante su cuantificación y el establecimiento de su relación con lesiones precursoras de CC.

Metodología: 60 mujeres con lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) y 120 mujeres sin LEI, confirmadas por colposcopia, fueron incluidas en el estudio. Se determinó la carga viral de 6 tipos de VPH-AR, mediante PCR en tiempo real. Se estimaron OR crudos y ajustados para evaluar la asociación entre la carga viral de cada tipo y las lesiones cervicales.

Resultados: 93.22% de mujeres con LEI y 91.23% de mujeres negativas, fueron positivas para al menos un tipo de VPH. VPH-18 y VPH-16 fueron los tipos más prevalentes, junto con VPH-31 en mujeres sin LEI. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las cargas virales entre éstos dos grupos, aunque se observó un mayor carga viral en lesiones para algunos tipos virales. Una mayor frecuencia de lesiones se asoció a infecciones con carga baja de VPH-16 (OR_a: 3.53; IC95%: 1.16 – 10.74), en comparación a mujeres con carga alta de VPH-16, (OR_a: 2.63; IC95%: 1.09 – 6.36). En infecciones por VPH-31, la presencia de carga viral alta, se asoció con una menor frecuencia de lesiones (OR_a: 0.34; IC95%: 0.15 – 0.78).

Conclusiones: La prevalencia tipo-específica de VPH se corresponde con las reportadas a nivel mundial. La asociación entre la carga viral del VPH y la frecuencia de LEI es tipo específica y podría depender de la duración de la infección, altas cargas relacionadas con infecciones transitorias, y bajas cargas con persistentes. Este trabajo contribuye al entendimiento del efecto de la carga viral en la historia natural del CC; sin embargo, estudios prospectivos son necesarios para confirmar estos resultados.

Palabras Claves: Displasia del Cuello del Útero, Papillomavirus Humano de alto riesgo, Carga Viral, Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa, Colombia.

ABSTRACT

Background: Infection with high risk of human papillomavirus (HR-HPV) is the main factor in the development of Cervical Cancer (CC). Viral load can modulate this relationship, so it is important to quantify and establish its association with CC precursor lesions.

Methods: 60 women having cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 120 women without CIN and confirmed by colposcopy, were included in the study. Samples were tested for six high-risk HPV types to determine viral copy number by real-time PCR. Crude and adjusted odds ratios (OR_a) were estimated for evaluating the association between each viral type's DNA load and the risk of cervical lesions occurring.

Results: 93.22% of women with CIN and 91.23% negative women were positive for at least one type of HPV. HPV-18 and HPV-16 were the most prevalent types, with HPV-31 in women without CIN. No statistically significant differences in viral load between these two groups were identified, although a higher viral load was observed in CIN regarding some viral types. Lesions were more frequent in HPV-16 patients having a low viral load (3.53 OR_a, 1.16-10.74 95%CI) compared to those having high HPV-16 load (2.62 OR_a, 1.08-6.35 95%CI). High viral load in HPV-31 patients was associated with lower CIN frequency (0.34 OR_a, 0.15-0.78 95%CI).

Conclusions: The type-specific prevalence of HPV is consistent with the reported worldwide. An association between HPV DNA load and CIN frequency was seen to be type-specific and may have depended on the duration of infection, high viral loads related to transient infections and low viral loads with persistent infections. This analysis has provided information for understanding the effect of HPV DNA load on cervical lesion development. However prospective studies are needed.

Key Words: Uterine Cervical Dysplasia, High Risk Human Papillomavirus, Viral Load, Real-Time Polymerase Chain Reaction, Colombia.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
TABLA DE CONTENIDO	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. PROBLEMA.....	10
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	12
3.1 Pregunta de investigación principal	12
3.2 Preguntas secundarias	12
4. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. MARCO TEÓRICO.....	15
5.1 Epidemiología.....	15
5.2 Factores de riesgo	21
5.3 Histopatología	22
5.4 Prevención, Diagnóstico y Tratamiento	23
5.5 Medidas para el control del cáncer de cérvix.	25
5.6 Virus del Papiloma Humano	26
5.6.1 Métodos de identificación	28
5.7 Antecedentes	29
6. PROPÓSITO	31
7. OBJETIVOS.....	32
7.1 Objetivo General	32
7.2 Objetivos Específicos.....	32
8. METODOLOGÍA	33
8.1 Diseño	33
8.2 Hipótesis	33
8.2.1 Hipótesis Conceptual	33
8.2.2 Hipótesis nula.....	33
8.2.3 Hipótesis alterna.....	34
8.3 Población y Muestra	34
8.3.1 Población	34
8.3.2 Muestra.....	34
8.4 Criterios de inclusión y exclusión	34
8.4.1 Criterios de inclusión.....	34
8.4.2 Criterios de exclusión	35
8.5 Fuentes de información y técnicas de recolección.....	35
8.5.1 Base de datos	35
8.5.2 Extracción de ADN de VPH.....	36
8.5.3 Cuantificación de carga viral de VPH por PCR en tiempo real.....	36
8.6 Variables (Manual de codificación de variables. Anexo 1)	40
8.6.1 Sociodemográficas	40
8.6.2 Factores de riesgo relacionados con el huésped	41
8.6.3 Anormalidad cervical.....	41
8.6.4 Virus del Papiloma Humano.....	41

8.6.5	Diagrama de variables.....	43
8.7	Calidad del dato. Control de sesgos y errores.....	43
8.8	Análisis estadístico	45
8.9	Aspectos Éticos.....	46
8.9.1	Respeto por las personas.....	47
8.9.2	Beneficencia	47
8.9.3	Justicia.....	47
8.9.4	Manejo de muestras Biológicas	48
8.9.5	Comités de ética	48
9.	RESULTADOS.....	49
10.	DISCUSIÓN	60
11.	CONCLUSIONES	65
12.	PERSPECTIVAS.....	66
13.	CRONOGRAMA.....	67
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	68
15.	ANEXOS.....	74

Ilustración 1. Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix a nivel mundial, estandarizadas por edad /100.000 mujeres/año. 2012..... 16

Ilustración 2. Prevalencia de VPH por severidad de la lesión cervical y región. 2012. 17

Ilustración 3. Los 10 tipos de VPH más frecuentes en cáncer de cérvix por región. 1990–2010. 18

Ilustración 4. Prevalencia tipo específica de VPH en 1810 mujeres colombianas de diferentes regiones geográficas. 2011..... 20

Ilustración 5. Organización del genoma del virus. 26

Ilustración 6. Diagrama de variables..... 43

Ilustración 7. Diagrama de flujo de la muestra estudiada..... 49

Ilustración 8. Distribución de la carga viral absoluta para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes. 56

Ilustración 9. Distribución de la carga viral normalizada para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes..... 57

Tabla 1. Cebadores, plasmídicos y sondas empleadas para la PCR en tiempo real.....38

Tabla 2. Distribución de características sociodemográficas y factores de riesgo51-53

Tabla 3. Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada.....54

Tabla 4. Distribución de la carga viral de 6 tipos VPH-AR de acuerdo a los resultados de biopsia.....58

Tabla 5. Modelo de regresión logística condicional.....59

1. INTRODUCCIÓN

La Asociación existente entre el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el Cáncer de Cérvix (CC) ha sido claramente establecida, identificándose la infección persistente por tipos virales de alto riesgo (VPH-AR) como el factor más importante (1). Sin embargo, existen otros factores relacionados al huésped y al virus que modulan ésta asociación, siendo uno de éstos la carga viral del VPH (1-4).

La carga viral del VPH ha sido interés de investigaciones científicas, con el propósito de dilucidar las características y la dinámica de la asociación y de esta manera, contribuir en el establecimiento de medidas que permitan la disminución del impacto del CC en la población. Estudios previos se han realizado para determinar la asociación entre la carga viral y la duración de la infección. (5-7); así como su relación con la severidad, progresión y desarrollo de CC (8, 9).

Los resultados de estos estudios han encontrado que la cantidad de ADN viral aumenta con la severidad de las lesiones de manera proporcional, siendo detectable incluso antes del desarrollo de lesiones cervicales (8-11); Sin embargo otros estudios no encontraron dicha asociación (12-15).

Dentro de los tipos virales de alto riesgo, el VPH-16 es el más frecuente en casos de CC (entre 50–70%) (16). Por lo que, la mayor parte del conocimiento que se tiene sobre la relación entre la carga viral del VPH y el CC, se ha basado en este tipo viral. La mayoría de estudios que han evaluado la carga viral de otros tipos de alto riesgo, no han encontrado resultados comparables a los obtenidos para VPH-16 (17-20). Excepto Moberg et al., quienes encontraron que una carga viral alta de VPH-16, VPH-31 y VPH-18/45 incrementaba el riesgo de desarrollar Carcinoma In Situ (CIS) (21). De acuerdo a éstos hallazgos, la carga viral del VPH provee información para determinar el riesgo de CC, pero sujeta a las diferencias tipo-específicas.

Una de las técnicas más empleada y confiable para la determinación viral es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR siglas en inglés de: Polymerase Chain Reaction), la cual provee una alta sensibilidad y especificidad (22-24). Para la detección, tipificación y cuantificación del VPH, se ha descrito ampliamente la PCR en tiempo real, que permite identificar un amplio rango de copias virales, y la normalización de la carga viral de acuerdo a la cantidad de ADN humano, con una alta reproducibilidad, sensibilidad, especificidad y rendimiento (13, 25, 26). Es por esto que se considera como un método que proporciona una medición de la carga de los distintos VPH-AR adecuada y confiable, facilitando así, la investigación del rol de ésta en el desarrollo de CC (11, 12, 27).

Para Colombia, estudios previos, encontraron como principal determinante para la persistencia de la infección por el VPH, la carga viral, siendo la infección por el VPH-16, la que mayor riesgo presenta en el desarrollo de lesiones de alto grado (28). Sin embargo, para nuestro país, aún no se han realizado estimaciones acerca de la asociación entre lesiones precursoras del CC y la carga viral (determinada mediante una técnica cuantitativa como la PCR en tiempo real, para los 6 tipos virales más frecuentes en nuestro país (VPH-16, -18, -31, -33, -45, -58), en una población con diferentes condiciones sociodemográficas, datos que son relevantes al momento de implementar estrategias para el control de CC, como la vacunación, y pruebas de tamización.

2. PROBLEMA

El Cáncer de cérvix (CC), de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud es el cuarto cáncer más frecuente entre las mujeres, con cerca de 528,000 casos nuevos, y 266,000 muertes al año. Se estima que cerca de un 85% de los casos son procedentes de países en vía de desarrollo. En Colombia se reporta una incidencia estandarizada de 18.7 por 100,000 mujeres al año y una mortalidad de 8 por 100,000 mujeres al año. Esta entidad es considerada como un grave problema de salud pública, debido al impacto que genera en la población ya que es causante del fallecimiento de mujeres en edades reproductivas, siendo una enfermedad prevenible y curable (29).

Ha sido claramente establecido que el factor necesario, mas no suficiente para que se desarrolle éste tipo de cáncer es la infección con el VPH. Es importante señalar que factores como la infección persistente, la presencia de tipos virales de alto riesgo (VPH-AR), la infección simultánea por más de un tipo de VPH (coinfección) y una elevada carga viral, facilitan la progresión de las lesiones cervicales (9, 30, 31).

Teniendo presente que tan sólo un 5 a 10% de las mujeres con infección por VPH, desarrollan una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEI-AG), y que la progresión a CC tarda hasta 20 años, se establece que la mayor parte de los casos pueden prevenirse mediante la detección oportuna y el tratamiento anticipado de las lesiones precancerosas. Por lo anterior, la tasa de curación está estrechamente relacionada con el momento en que se realiza el diagnóstico, el estadio de la enfermedad y la disponibilidad del tratamiento. Se considera que de no tratarse el cáncer de cérvix, es por lo general mortal (32, 33).

Con el propósito de disminuir el impacto que ha generado el CC, a nivel mundial se han desarrollado estrategias, encaminadas a la prevención, control y reducción de la morbi-mortalidad de ésta neoplasia (34-36). Actualmente el método de tamización mundialmente aceptado, es la citología, con la cual se identifican mujeres con anomalías cervicales. Sin embargo ésta técnica tiene una sensibilidad limitada para la detección de lesiones precancerosas (41-73%) (37). Además, aunque en Colombia se ha reportado una cobertura de la citología de 76,3%, cercana a la de países desarrollados (Estados Unidos, de 83%), persisten dificultades para la reducción del impacto del CC en nuestro país, al igual que en la mayoría de países en vía de desarrollo (38, 39).

En los últimos años, se han desarrollado técnicas moleculares para la detección de ADN del VPH, que buscan superar las limitaciones de la citología. Además, teniendo en cuenta la asociación entre la persistencia de las infecciones por VPH-AR y el desarrollo de CC, la detección molecular, facilita la identificación de mujeres en riesgo de desarrollar esta enfermedad, aún cuando cambios morfológicos no hayan ocurrido (40).

Estas técnicas son potencialmente útiles en el ámbito clínico como métodos de tamización inicial, como pruebas para identificación de mujeres con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEI-BG) que requieran valoración por colposcopia, para la evaluación de mujeres sin hallazgos por colposcopia y para evaluar la tasa de curación posterior al tratamiento de LIE-AG (37). Para dichas pruebas se podría implementar el uso de técnicas como la PCR, que provee una mayor sensibilidad y especificidad, y la PCR en tiempo real, que además de permitir la identificación del virus, determina el número de copias virales presente en la muestra (13, 41).

La cuantificación de la carga del virus de VPH es un factor que ha sido considerado importante desde el punto de vista clínico, ya que se ha demostrado que la persistencia de la infección y el mantenimiento elevado de la carga viral contribuyen a la progresión de lesiones de bajo grado a CC (9, 10, 13, 42). La determinación y el conocimiento del número de copias presente en mujeres colombianas, teniendo en cuenta las diferencias sociodemográficas de la población (mujeres de distintas regiones y etnias), y su asociación con la presencia de lesiones cervicales, permiten una aproximación oportuna a mujeres bajo un riesgo importante de desarrollar CC. Estos resultados contribuirán en la generación de información para la implementación de nuevas estrategias de prevención, diagnóstico y control, del desarrollo de vacunas más apropiadas, de tal manera que se logre disminuir la carga que representa esta enfermedad en nuestro país.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

3.1 Pregunta de investigación principal

Existe asociación entre la carga viral de seis tipos de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo y la presencia de lesiones escamosas intraepiteliales?

3.2 Preguntas secundarias

Cuáles son los aspectos sociodemográficos que caracterizan a la población en estudio?

Cuál es la frecuencia de los factores de riesgo encontrados en los dos grupos de mujeres y que diferencias existen entre los grupos?

Cuál es la distribución tipo-específica de VPH en la muestra?

Cuál es la carga viral de cada uno de los seis tipos de VPH de alto riesgo que se presenta en mujeres con y sin lesiones cervicales?

Existe diferencia en la distribución de la carga viral de cada tipo entre los dos grupos de mujeres (con y sin lesiones cervicales)?

4. JUSTIFICACIÓN

El Cáncer de Cérvix (CC) es una enfermedad con alto impacto a nivel mundial, sin embargo, un 85% de carga recae en países en vía de desarrollo. Se estimaron cerca de 528.000 casos nuevos y 266.000 muertes para el 2012 (29); en Colombia el CC es el segundo cáncer en frecuencia, con una incidencia y mortalidad ajustadas de 18,7 y 8 por cada 100,000 mujeres al año respectivamente. La carga viral del VPH se relaciona con la persistencia de la infección, y el desarrollo de Cáncer de Cérvix (CC) (6, 10), por lo cual ha sido interés de numerosas investigaciones científicas.

Para discernir cuáles son los factores intrínsecos del virus y del hospedero que permiten la regresión o el desenlace de la infección, así como también la progresión de lesiones precursoras, la identificación de la carga viral para VPH se ha llevado a cabo en diferentes escenarios; con diferentes tipos virales, principalmente de alto riesgo (7, 43, 44), en muestras variables (cervical, orina, sangre, parafina) (45), en relación a la duración de la infección (9) y con la eliminación de la infección, entre otros (6, 37).

Estudios previos se han llevado a cabo para establecer la asociación entre la carga de VPH y las lesiones cervicales presentes. Se ha encontrado un mayor número de copias virales en mujeres con lesiones de alto grado, lo que sugiere a la carga viral como un factor importante para la progresión de las lesiones a nivel cervical (8, 9, 11, 46, 47).

Actualmente, la información que se tiene no es consistente, se han empleado diferentes técnicas de cuantificación y además, la mayoría de los estudios que han realizado la cuantificación por técnicas cuantitativas, han sido diseñados para VPH-16, por lo cual, no es posible generalizar a todos los tipos virales de alto riesgo (9, 48, 49). Aquellos estudios que han incluido otros tipos virales, no han encontrado ninguna asociación (17-20, 43).

Algunos estudios que han incluido otros tipos virales, han utilizado la Captura Híbrida Viral II (HCII) que permite la valoración cualitativa de 13 tipos virales de alto riesgo, teniendo como limitantes, no hacer una detección tipo-específica, ni cuantificar con exactitud el número de copias virales del tipo o tipos virales involucrados en la infección (40, 46).

Los hallazgos encontrados, tienen implicaciones importantes considerándose que la carga viral es un factor del virus, que puede modificar la historia natural del CC. Por lo tanto, el presente proyecto resulta relevante, puesto que permitió identificar en mujeres colombianas provenientes de diferentes regiones, la asociación entre la carga viral de los 6 tipos de VPH de alto riesgo (más prevalentes en el país) y la presencia de lesiones cervicales.

De ésta manera se aportan datos relevantes para la caracterización del comportamiento del VPH, la prevalencia, la distribución tipo-específica y la relación con factores de riesgo. Estos resultados ampliarán el conocimiento y contribuirán en el mejoramiento de los programas de promoción y prevención que contemplen la detección y tipificación de VPH, la cuantificación de la carga viral, entre otros. Finalmente con lo anterior se logrará la identificación temprana de mujeres en riesgo de desarrollar CC, buscando con esto, contribuir en la reducción de la incidencia y mortalidad debida al CC.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Epidemiología

El Cáncer de Cérvix (CC) representa el tercer cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial, después del cáncer de seno y el cáncer colorrectal. Según el último reporte de The International Agency for Research on Cancer (IARC), se estimaron cerca de 528.000 casos nuevos para el 2012, teniendo una tasa de incidencia ajustada por edad de 14 por 100.000 mujeres/año. Cerca del 85% del impacto a nivel mundial, ocurre en países en vía de desarrollo, principalmente de África, sur y centro de Asia, y Suramérica. En contraste, en países desarrollados, se han reportado incidencias menores a 10 por cada 100.000 mujeres/año. Se ha identificado que el pico de detección de neoplasia intraepitelial cervical 3, es hacia los 30 años, mientras que el pico de CC se evidencia a los 40 años (29, 38).

El CC fue responsable de 266.000 muertes a nivel mundial durante el 2012 (tasa ajustada: 6.8 por 100.000 mujeres/año), de las cuales cerca del 87% ocurrieron en países en desarrollo de África, Asia, América Latina y el Caribe. Se estima una tasa de mortalidad de 10 a 25 mujeres por cada 100.000 mujeres/año en países en vía de desarrollo, mientras que en países desarrollados (Asia occidental, Europa occidental y Australia/Nueva Zelanda) se estima entre 2 a 8 por cada 100.000 mujeres/año (Ilustración 1) (29).

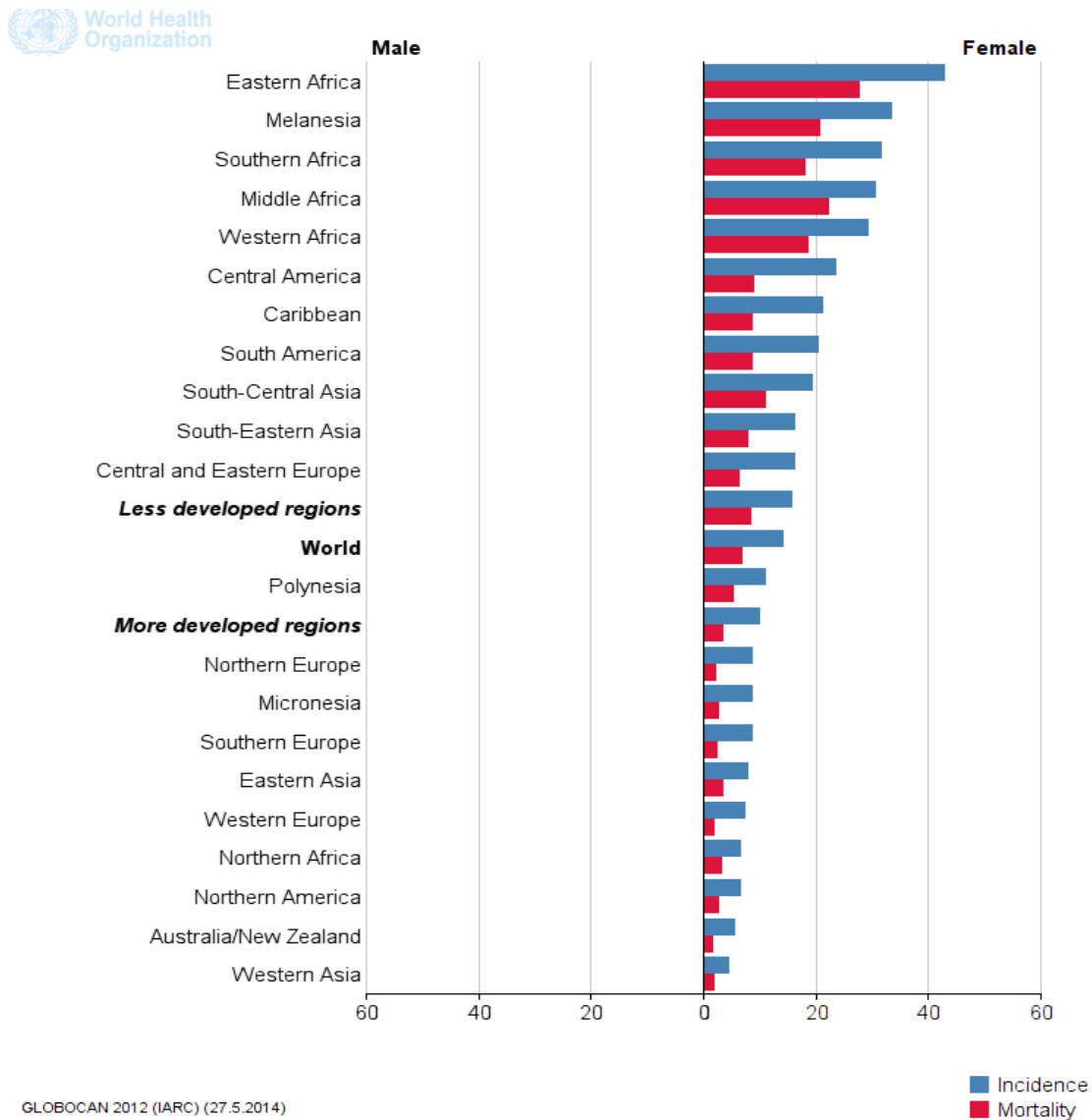
Para América, se estima una incidencia ajustada de CC de 14,9 por 100.000 mujeres/año, siendo el cuarto cáncer más frecuente en mujeres, luego del cáncer de seno, pulmón y colorrectal, con una mortalidad ajustada de 5,9 por 100.000 mujeres/año (29).

En Colombia, el CC es, después del cáncer de seno, el segundo cáncer con mayor frecuencia entre las mujeres, con una incidencia ajustada de 18,7 por cada 100,000 mujeres al año, con una prevalencia para el 2012 de 15,7%. Se estima una mortalidad ajustada de 8 por cada 100,000 mujeres al año, siendo así la primera causa de muerte relacionada con la salud sexual y reproductiva (29, 39).

El Virus de Papiloma Humano (VPH) está asociado a un 99,7% de casos de CC, principalmente los genotipos de alto riesgo (VPH-AR) (50). Las más altas prevalencias de infección por el VPH se registran en África (94,2%) y las más baja en Oceanía (88,3%) (51). Dificultades en el acceso a los servicios de tamización, no adherencia a los programas de prevención y promoción, son factores sociales asociados a un bajo

estrato socioeconómico y a menores niveles de educación, que suelen ser más frecuentes en regiones donde la prevalencia de VPH es mayor (16).

Ilustración 1. Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix a nivel mundial, estandarizadas por edad /100.000 mujeres/año. 2012.

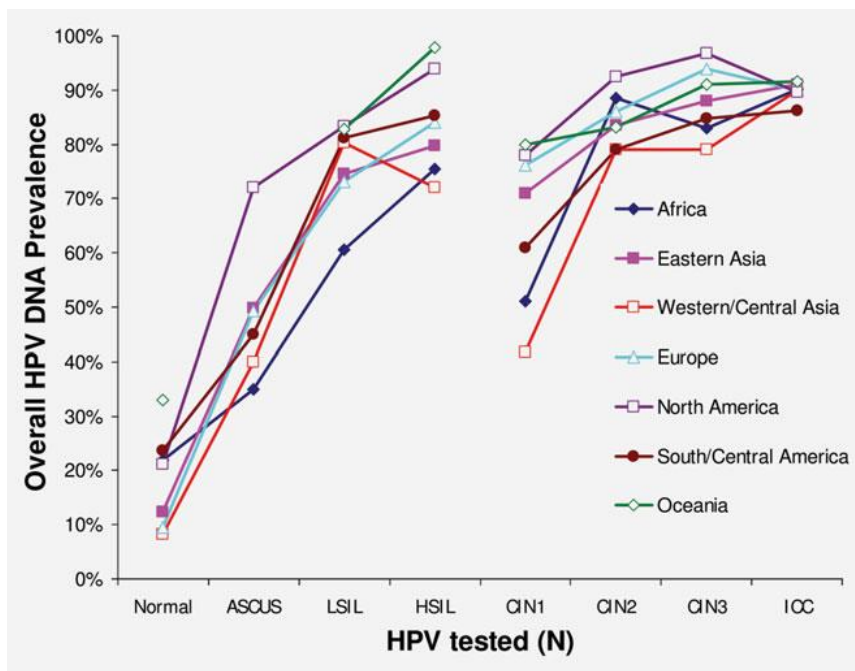


Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

De acuerdo al grado de severidad de las lesiones cervicales, la prevalencia en general de VPH incrementa de un 12% en mujeres con citología normal, a un 89 % en mujeres con CC. En mujeres con citología normal, la prevalencia de VPH varía de un 8-9% en Asia

central/ occidental y Europa, a más de un 20% en África, América y Oceanía. Entre los diferentes grados de severidad de las lesiones, se encuentran diferencias en las prevalencias de VPH por región (Ilustración 2) (52).

Ilustración 2. Prevalencia de VPH por severidad de la lesión cervical y región. 2012.



Abreviaciones: VPH: human papillomavirus; ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance; LEI-BG: low-grade squamous intraepithelial lesion; LEI-AG: high-grade squamous intraepithelial lesion; CIN: cervical intraepithelial neoplasia grade; ICC: invasive cervical cancer.

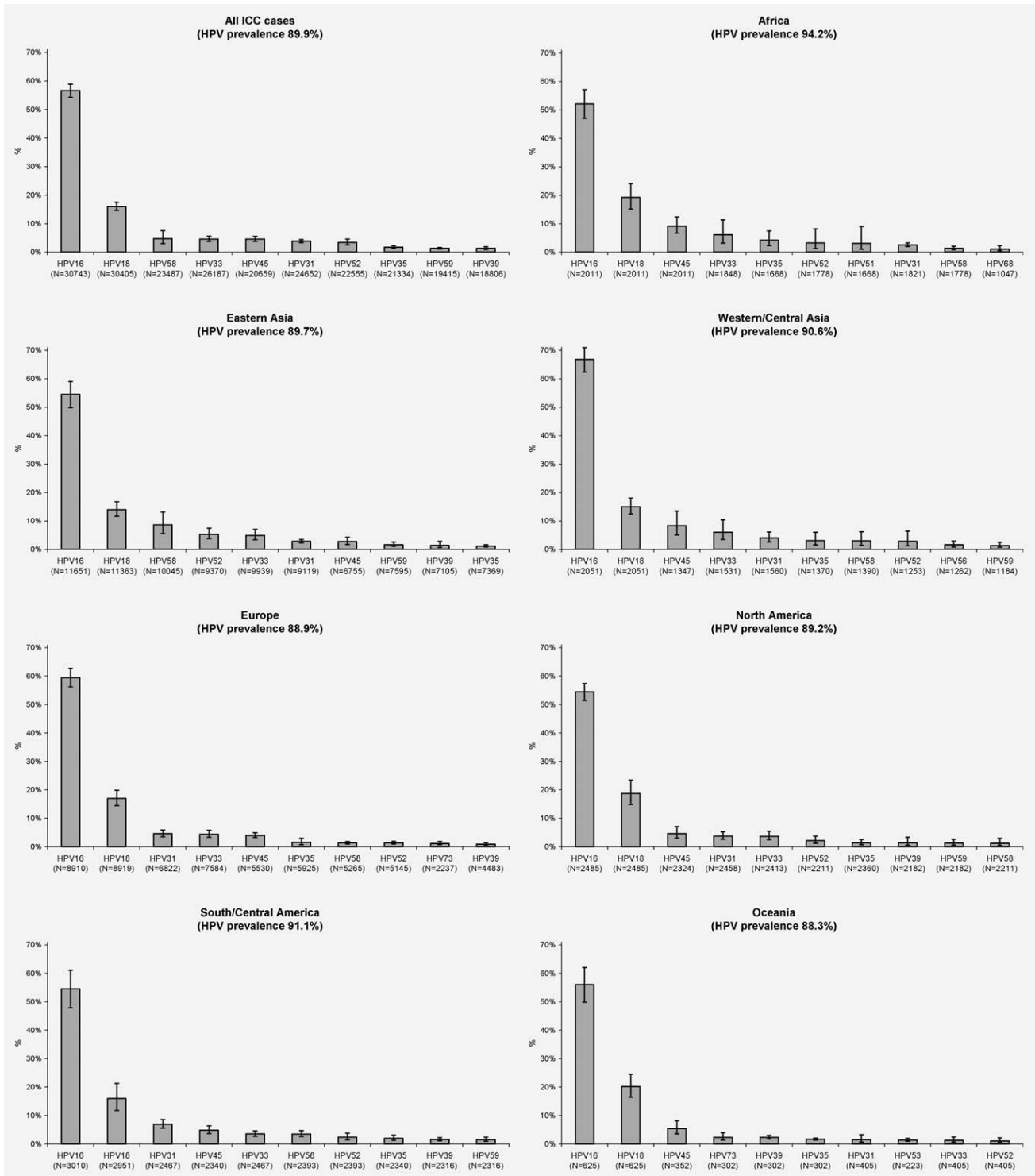
Fuente: Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. International journal of cancer Journal international du cancer. 2012 Nov 15;131(10):2349-59.

Los tipos virales más frecuentes son VPH-16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58. Sin embargo se encuentran diferencias de prevalencias tipo específicas de acuerdo a la región analizada. VPH-16 y -18, son los dos tipos más prevalentes a nivel mundial (Ilustración 3) (51).

En Colombia, se han reportando prevalencias de VPH entre un 14.9% a 49.5%. Estudios que han analizado los 15 tipos virales de alto riesgo, son consistentes al encontrar que los dos tipos virales más frecuentes son VPH 16 y -18. Sin embargo, existe variación en las prevalencias encontradas dependiendo de la población y región estudiada (53, 54). Se ha identificado que VPH-16 es más frecuente en Leticia, VPH-18 en Girardot, VPH-31, -33 y -45 en Girardot y Leticia, y VPH-58 en Girardot, Leticia y Bogotá.

(Ilustración 4) (55).

Ilustración 3. Los 10 tipos de VPH más frecuentes en cáncer de cérvix por región. 1990–2010.



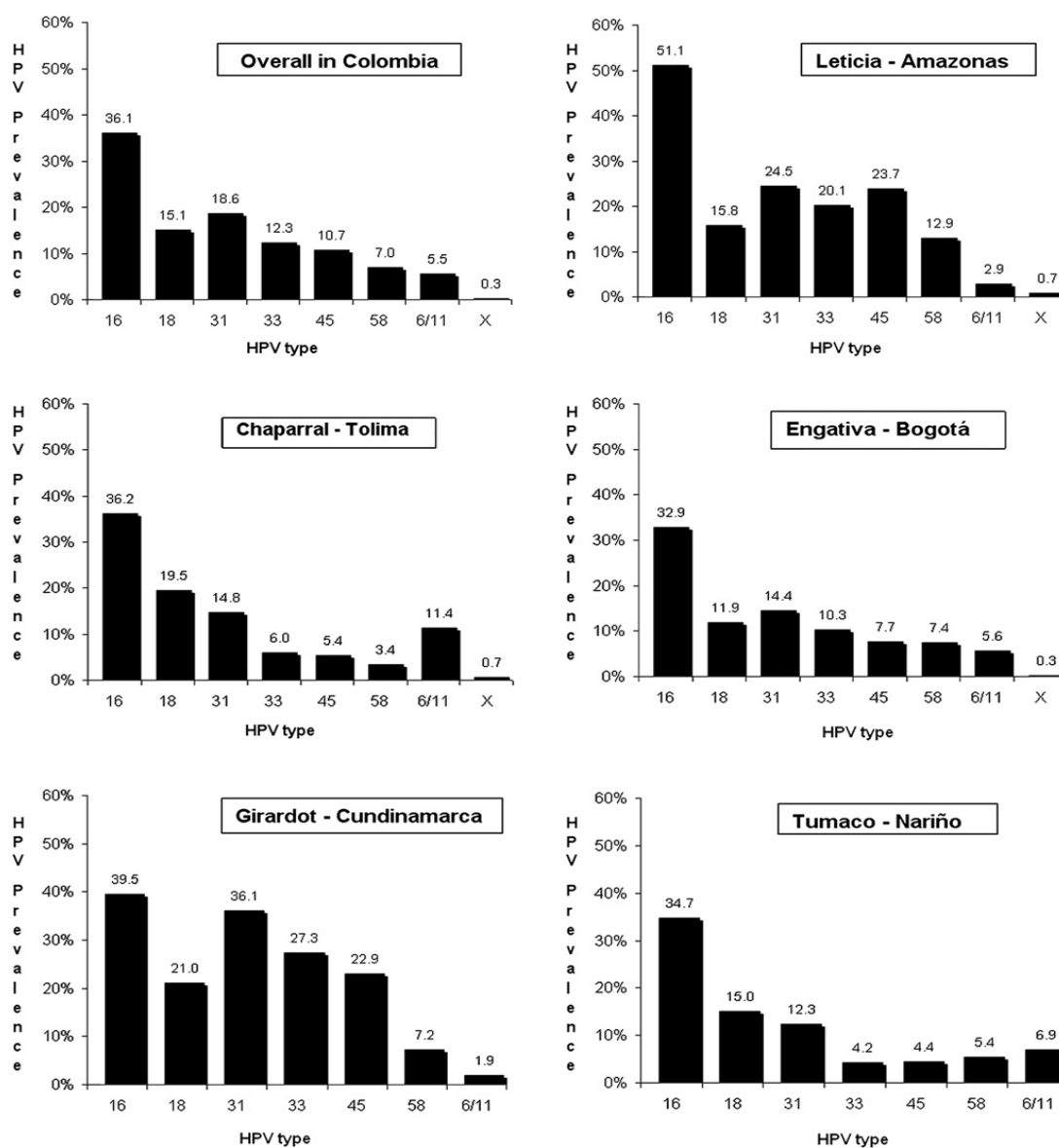
Abreviaciones ICC: invasive cervical cancer; VPH: human papillomavirus.

Fuente: Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011 Feb 15;128(4):927-35.

El CC se considera como un problema importante para el campo de la salud pública, y es reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una prioridad, al igual que la infección por el VPH. Lo anterior teniendo en cuenta que el CC es una enfermedad prevenible y curable a bajos costos y riesgos, además del impacto que genera a nivel mundial, al ser una enfermedad que aún es causante de un gran número de muertes de mujeres principalmente en edades productivas, con una gran pérdida de años de vida potencial (38, 56).

Dado que el CC tiene una larga historia natural, existe la posibilidad de detectar mujeres de manera temprana, al realizar intervenciones mediante estrategias tanto de prevención primaria como secundaria, acompañado de un amplio acceso y oportunidades de tratamiento y rehabilitación. Como medida de prevención se ha instaurado la citología, mundialmente aceptada, y otros métodos aún en evaluación, relacionados con la detección viral y factores relacionados (57).

Ilustración 4. Prevalencia tipo específica de VPH en 1810 mujeres colombianas de diferentes regiones geográficas. 2011.



Abreviaciones: VPH: human papillomavirus.

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

Los programas de tamización establecidos en la mayoría de países en América Latina, y el Caribe (Cuba, Brasil, México, Perú y Colombia), que han incluido la citología ya sea mediante el tamizaje oportunista u organizado, no han tenido el impacto esperado en la

reducción de las tasas de incidencia y mortalidad del CC. Se ha proyectado la cantidad de muertes nuevas para el año 2020, considerando que no se presentarán cambios en la dinámica actual, siendo ésta de 57,000 sólo para América y el caribe (38, 56). En contraste con lo anterior, en países de Europa, EE.UU, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, se ha observado una disminución importante en la incidencia y mortalidad por CC, tras 5 décadas de la introducción de programas de tamización (38).

Las posibles causas que se han planteado para explicar el bajo impacto de los programas de tamización en los países en desarrollo, son las limitaciones de la citología como prueba de detección de la anormalidad cervical, referentes a la calidad de la misma; problemas dentro de la organización de los sistemas de salud que disminuyen la cobertura de mujeres en riesgo, además de inadecuados programas de seguimiento para el diagnóstico temprano y tratamientos adecuados; y también, creencias personales y culturales que interfieren con la adherencia a los programas.

En algunos países se ha realizado una reorganización de los programas ya existentes, con mejoras a nivel de cobertura, organización y calidad, como en el caso de Chile, Costa Rica y México, donde se ha observado una reducción en la incidencia y mortalidad (38, 57).

5.2 Factores de riesgo

Para el desarrollo de cáncer de cérvix, se ha identificado que el factor central es la infección persistente por tipos de alto riesgo del VPH. Sin embargo, se requieren otros factores tanto a nivel del virus como del huésped, que facilitan la infección y/o persistencia del VPH, la regresión o progresión de las lesiones (16).

Más del 70% de las mujeres sexualmente activas adquieren una infección por VPH. Algunos estudios han demostrado un pico de infección antes de los 25 años, luego la prevalencia decrece rápidamente debido a que la mayoría de las infecciones son transitorias, eliminadas mediante inmunidad celular entre 1-2 años luego de la exposición. Se encuentra un segundo pico de incidencia de infección en mujeres mayores de edad donde el riesgo de cáncer cervical aumenta. Aproximadamente un 25% progresan a lesión intraepitelial de bajo grado (LIE-BG); de estas lesiones, del 20 a 40% se desarrollan a lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG). Lo anterior indica que del total de mujeres que en alguna ocasión adquieren VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una LEI-AG, mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses (58). En caso de ser una mujer con alguna deficiencia inmune, heredada o inducida farmacológicamente, tiene mayor riesgo de presentar persistencia de la infección, y progresión a cáncer de cérvix (59). El tiempo estimado desde la infección inicial hasta la carcinogénesis es de 10 a 20 años (16).

Respecto al virus, se considera que el principal factor de riesgo es la infección persistente por uno de los 15 tipos oncogénicos. Otro factor asociado, es la infección por más de un tipo viral (coinfección); se ha descrito que existe una fuerte asociación entre el número de tipos virales y la severidad de las lesiones. Se cree que entre un 20-50% de las mujeres infectadas, presentan más de un tipo viral (31). Además de esto, mientras más alta sea la carga viral, existe un mayor riesgo de desarrollar lesiones de alto grado, aún cuando se tenga un resultado normal de la citología y a su vez, podría predecir la severidad de las lesiones cervicales y la presencia de lesiones ocultas. Una alta carga viral al parecer es indicio de la persistencia viral y desarrollo de enfermedad (28, 60).

Otros factores se han asociado al riesgo de infección o a la susceptibilidad y progresión de las lesiones, tales como aquellos relacionados con el comportamiento sexual tanto de la mujer como de su pareja, (inicio temprano de la actividad sexual, múltiples compañeros sexuales, exposición a otras enfermedades de transmisión sexual); con la paridad (más de 4 partos, menor edad al primer parto); con el estado inmune (infección por VIH y tratamiento inmunosupresor) y la exposición a mutágenos y factores hormonales (tabaquismo, y uso de anticonceptivos orales). También se ha reportado la existencia de susceptibilidad genética en mujeres que tienen simultáneamente HLA-B*07 y HLA-B*0302, con menor riesgo entre quienes tienen HLA-DRB1*1301. Por otro lado se han descrito factores de riesgo sociales como estrato socioeconómico bajo y bajo nivel educativo y cultural, sin lograr establecer con claridad si implica mayor exposición al virus o dificultades para acceder a los servicios (50, 61).

5.3 Histopatología

La infección por VPH induce el cambio de la arquitectura a nivel de la zona de transición, hacia la displasia celular, como también en áreas adyacentes. El canal endocervical está constituido en su parte proximal por epitelio columnar y en su parte distal por epitelio escamoso. La unión escamo-columnar es conocida como la zona de transición, la cual suele ser el origen de la mayoría de las lesiones displásicas, y carcinomatosas. Esta zona cambia dependiendo del estado hormonal de la mujer, ya que durante la pre adolescencia y en la posmenopausia, ésta se hace difícil de visualizar al examen visual. Durante la edad reproductiva, dado el ambiente ácido predominante en la vagina, lleva a la destrucción de las células columnares e induce una metaplasia escamosa en la zona de transición, clínicamente considerada benigna (16) .

Aproximadamente el 95% de los casos de cáncer de cérvix, corresponden a cáncer de células escamosas, mientras que un 5% son adenocarcinomas. Otros tipos que se han identificado, representan un porcentaje mínimo dentro del cáncer de cérvix, dentro de

éstos se encuentran los carcinomas de células claras, de tipo adenoescamoso, y de células pequeñas. La distribución de los tipos de VPH dentro de los tipos histológicos de cáncer difiere (los adenocarcinomas se asocian más a VPH tipo 18 y lesiones escamosas a VPH 16) (16, 62).

5.4 Prevención, Diagnóstico y Tratamiento

La detección temprana y el tratamiento oportuno de mujeres en riesgo pueden prevenir la progresión a cáncer. El test de Papanicolaou o citología es la prueba más aceptada a nivel mundial para la tamización (63). Valora la calidad de la muestra, la presencia de infecciones y de anomalías de células epiteliales clasificando los hallazgos en: células escamosas atípicas de significado incierto (ASC-US por siglas en inglés de Atypical squamous cells of undetermined significance); células escamosas atípicas sugestivas de alto grado (ASC-H por siglas en inglés de Atypical squamous cells cannot exclude LEI-AG); lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI-BG por siglas en inglés de Low-grade squamous intraepithelial lesion); lesión intraepitelial de alto grado (LEI-AG por siglas en inglés de High-grade squamous intraepithelial lesion); carcinoma de células escamosas, células glandulares atípicas o adenocarcinoma in situ (61, 64).

La tamización debe realizarse cada año con el test de Papanicolaou. Por recomendación de la OMS, los programas nuevos deben comenzar en mujeres de 30 años de edad en adelante e incluir mujeres más jóvenes únicamente después de que el grupo de mayor riesgo esté cubierto. La edad óptima para tamización es entre los 35 y los 45 años. En mujeres mayores de 50 años, un test cada cinco años resulta adecuado. En mujeres entre 25 y 49 años de edad, el intervalo puede ser de tres años. No es necesario realizar el test en mujeres mayores de 65 años de edad si los dos últimos han sido normales. En pacientes inmunocomprometidas, será con más frecuencia. Según la American Cancer Society se realizará hasta los 70 años o cuando se han tenido 3 o más citologías negativas y ninguna anormal en los últimos 10 años (33, 62).

En Colombia las normas vigentes, establecen que la toma de la citología debe ser entre los 25 y 69 años de edad, siguiendo el esquema 1-1-3. Además se plantea la necesidad que existe de contar con estrategias de tamización que permitan la continuidad de la atención, en relación al seguimiento de pacientes con anormalidades y la remisión de aquellas que requieran otro nivel de atención. La cobertura de la citología durante 3 años en el país, según un estudio fue de 76,3%, llegando a valores superiores al 80% en algunas regiones (Bogotá, Caldas, Quindío y Risaralda) (39, 65).

Por otro lado se cuenta con vacunas contra el VPH (tetraivalente 6,11 16 y 18 y bivalente 16 y 18), disponibles desde el año 2007, para el uso en mujeres entre 9 y 26 años, con una efectividad de cerca del 90% en la prevención de infecciones persistentes

y con un 95% de efectividad en prevenir lesiones precancerosas. Sin embargo no son útiles en mujeres con infección previa a la inmunización ni en infecciones por otros tipos virales de alto riesgo, por lo cual las recomendaciones se basan en la inmunización de niñas previo el inicio de las relaciones sexuales, con metas a aumentar la efectividad contra otros tipos de alto riesgo y a implementar la vacuna dentro de los programas de promoción y prevención de la salud. La OMS recomienda la vacunación rutinaria contra el VPH, que debe ser incluida en los programas de inmunización de cada nación, con mira a la población entre 9 y 13 años. Estudios recientes sugieren que las diferencias biológicas y funcionales entre las llamadas variantes virales, pueden tener impacto en la etiología del cáncer, así como la distribución geográfica y el potencial oncogénico de estas pueden proporcionar datos que ayudarán a un diseño más eficiente de vacunas y protocolos de vacunación (38, 66).

En el caso de obtener un resultado anormal en la citología, se procede a una evaluación mediante colposcopia. Esta prueba ha mostrado tener una sensibilidad que puede variar entre 11 y 90% y una especificidad entre 14 y 97%. Mediante la cual se realizará examen del cuello uterino, de la vulva, vagina y región perianal. En la colposcopia, se establece el grado de la lesión (bajo o alto grado), la extensión, se descarta la presencia de carcinoma invasor y toma de biopsia si es necesario (61).

La estadificación del cáncer se determina en el momento del diagnóstico. Para esto se utiliza el sistema de clasificación de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). Para tales fines, se determina con evaluación clínica, teniendo en cuenta hallazgos al examen físico, en estudios radiológicos y procedimientos tipo biopsias, y estudios de endoscopia, y según el tamaño del tumor o su extensión hacia la pelvis, ya que los posibles hallazgos influyen en el tratamiento a seguir, como también determinan el pronóstico de cada mujer (62).

Con respecto al tratamiento, se han desarrollado guías y algoritmos para el manejo de las mujeres. Como posibilidades para el tratamiento, se plantea, el manejo conservador, con observación y seguimiento; cirugías como criocirugía- conización o excisión electroquirúrgica con asa; también se considera la histerectomía simple o radical por vía vaginal o abdominal, con o sin linfadenectomía, con tratamiento adyuvante quimioterapia y/o radioterapia. La elección del tratamiento más adecuado se realiza basándose en la edad de la mujer, el deseo de preservar la fertilidad que se tenga, la estadificación de la FIGO y el compromiso local o sistémico del CC (16, 62).

La tasa de curación de cáncer cervicouterino invasor está estrechamente relacionada con el estadio de la enfermedad en el momento en que se realiza el diagnóstico y con la disponibilidad de tratamiento. El cáncer cervicouterino casi siempre es mortal si no se trata (33).

5.5 Medidas para el control del cáncer de cérvix.

Se han implementado estrategias para el adecuado control del CC, dentro de la cual está la propuesta por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) que da recomendaciones para la adecuada implementación de programas con un abordaje integral. Se considera el establecimiento de métodos para la detección temprana de mujeres, asegurando una cobertura y calidad apropiadas; la vacunación como método de prevención; se contempla la educación sanitaria; como también la disponibilidad de diagnóstico, tratamiento, seguimiento y cuidados paliativos en el momento adecuado. Se plantea la necesidad de contar con servicios de consejería e información para asegurar la calidad de los servicios prestados y garantizar la participación activa de las mujeres (56, 57).

Se ha identificado que países con un adecuado sistema de tamización, diagnóstico y tratamiento pueden prevenir hasta un 80% de casos de CC. Sin embargo en países en desarrollo, aún hay dificultades con su implementación, con lo que aún no se observan cambios en las cifras demográficas. La principal razón de no éxito en estos países es una combinación de test sub-óptimo, falta de calidad, pobre cobertura de mujeres en riesgo e inadecuado seguimiento de mujeres con alteraciones citológicas con diagnóstico y tratamiento (67).

Se han evaluado métodos alternativos para la detección de mujeres en estadios tempranos de la enfermedad, con el propósito de disminuir el impacto del cáncer de cérvix. Dentro de éstas se ha considerado, el examen visual con ácido acético o yodo de lugol y la detección del VPH. Este último con una sensibilidad y especificidad comparables a las de la citología. En relación a lo anterior se podrían ampliar los métodos, garantizando que sea simple, asequible y adecuado para ser usado en conjunto con las estrategias de los programas de promoción y prevención actuales y de acuerdo al grado de acceso a los sistemas de salud, la disponibilidad de recursos humanos y económicos (15, 38, 57).

La implementación de métodos basados en la detección del VPH, resulta factible según estudios previamente realizados, en los cuales se consideran los factores de riesgo asociados al virus con el fin de establecer parámetros para identificar tempranamente a las mujeres en riesgo de desarrollar CC. Estos serían de una importancia invaluable al facilitar el monitoreo de mujeres con infección persistente, sin hallazgos citológicos de anormalidad, además de permitir un direccionamiento más apropiado para el manejo de las mujeres dependiendo del o los tipos virales encontrados, el número de copias, en asociación con los hallazgos citológicos (37, 56).

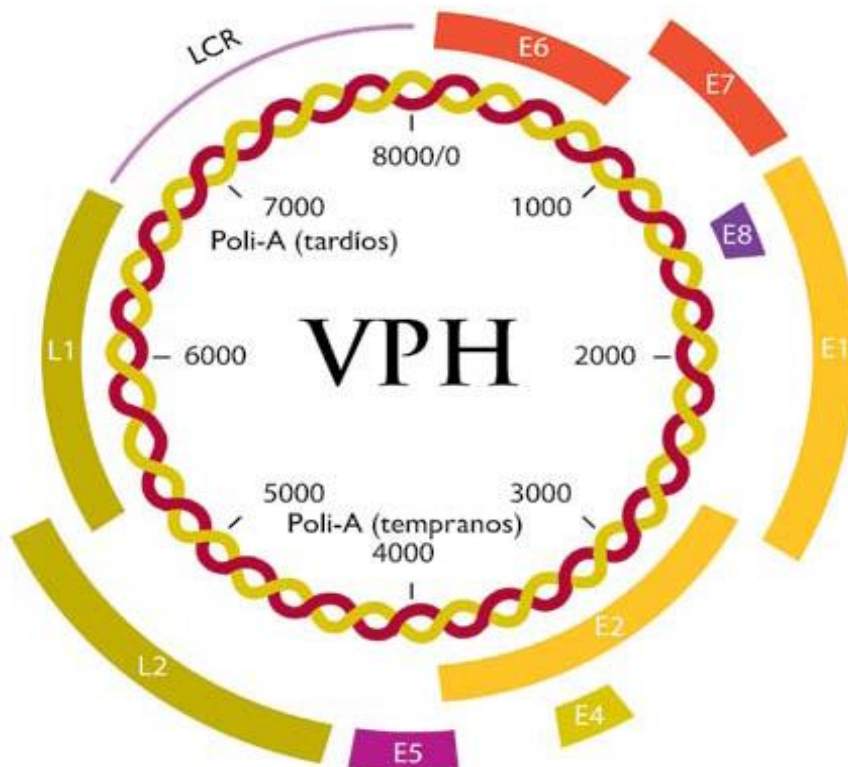
5.6 Virus del Papiloma Humano

El Virus de Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia Papillomaviridae, se han descrito 118 tipos de VPH de los cuales 40 afectan el epitelio escamoso estratificado de la mucosa y piel, de cérvix, vagina, vulva, pene y región perianal; algunos de ellos se clasifican como tipos virales de alto o bajo riesgo (VPH-AR, -BR) y se han agrupado en géneros denominados por letras griegas, tales como alfa, beta y gama papilomavirus, entre otros (30).

El genoma del VPH, consiste en una molécula de DNA circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb, dividida en tres regiones: la región larga de control (LCR), que no contiene marco de lectura alguno; la región de proteínas tempranas (E1 a E8) y la región de proteínas tardías (L1 y L2) (Ilustración 5) (68).

Los genes E codifican las proteínas reguladoras (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8) necesarias para los procesos de replicación, transcripción y cito transformación. E1 y E2 juegan un papel importante en la replicación del genoma viral, activan la transcripción de E6 y E7 y por lo tanto la proliferación celular, además contribuye a la partición del genoma viral en las células hijas y los altos niveles reprimen la transcripción de E6 y E7. También juegan un papel importante en la segregación del genoma viral durante la división celular ligándolo a cromosomas mitóticos (69).

Ilustración 5. Organización del genoma del virus.



Fuente: López, A. and M. Lizano (2006). "Cancer de cuello uterino y el virus de papiloma humano: la historia que no termina." 31-55.

La proteína E4 codifica la proteína tardía NS y aparentemente rompe el citoesqueleto, la denominada E5 actúa como proteína transformante interactuando con los factores de crecimiento celular (69). La proteína E7 interactúa con la proteína supresora de tumor de retinoblastoma (pRB) y daña su función como regulador de crecimiento celular (70).

Los genes L codifican las proteínas mayores de la cápside viral (L1 y L2) que ensamblan nuevos viriones en las capas cutáneas superiores. La proteína está implicada en la invasión del virus a las células epiteliales (71). La unión entre estas proteínas tiene consecuencias importantes para el empaquetamiento de ADN viral (13, 72).

Existen cerca 118 tipos de VPH, clasificados mediante la comparación de las secuencias de nucleótidos de regiones de replicación temprana (E) y tardía (L) cuya homología entre E6, E7, L1, L2 debe sobrepasar el 90% (16, 30). Los diferentes genotipos del VPH pueden clasificarse como de alto riesgo (tipos 16 y 18), de riesgo intermedio (VPH tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 82) o de bajo riesgo (VPH tipos 6 y 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66) según su capacidad de inducir cambios histológicos de carcinoma escamoso (66, 69).

Los genotipos 16 y 18 han sido encontrados en lesiones displásicas de alto grado y en la mayoría de los cáncer de cérvix invasivo; son responsables de cerca del 50-70% y 20-30% de los casos de cáncer de cérvix invasivo respectivamente. Mientras el genotipo 16 se asocia con mayor frecuencia en carcinomas escamocelulares, el genotipo 18 a adenocarcinomas. También están ligados a la persistencia y progresión de lesiones de alto grado a cáncer invasivo. Otros tipos como el VPH 6 y 11 se conocen como de bajo riesgo ya que se han asociado al 90% de verrugas genitales (16, 32).

La vía principal de transmisión del virus es mediante contacto piel-piel o mucosa-mucosa, no necesariamente transmisión por penetración sexual. Generalmente se transmiten varios tipos de VPH juntos resultando en una proporción cerca de 20-30% de coinfecciones (32, 62). Sin embargo en un estudio realizado en Colombia, se encontró que el porcentaje de coinfecciones era mucho más alto, siendo este de 60,2% (55).

La replicación se da principalmente intraepitelial, con ausencia de viremia que permita detectar en estadios preclínicos la infección por VPH, y así mismo se evade la activación del sistema inmune, lo cual se debe tener en consideración al momento de establecer estrategias de tamización donde el principal objetivo sea detectar mujeres en riesgo de padecer la enfermedad (16).

Se ha identificado que el VPH es encontrado tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos. Mujeres que presentan ADN viral sin lesiones cervicales se encuentran en riesgo de desarrollar lesiones precursoras (16).

5.6.1 Métodos de identificación

La citología, que se introdujo hace más de 60 años, ha demostrado ser una poderosa herramienta en la detección de lesiones precursoras de cáncer de cuello uterino. Como prueba de tamización la citología cervical es eficaz para la detección de cambios neoplásicos cervicales. Sin embargo se ha identificado que hay un alto porcentaje de falsos positivos, principalmente en mujeres con hallazgo de ASC-US, ASC-H, y LEI-BG (73).

Considerando el papel crucial del VPH en el desarrollo del CC, se ha evaluado la utilidad de su detección como test de tamización. Se ha identificado una sensibilidad entre 66 y 100 % con una especificidad de 62 a 96 %. Presenta ventajas como el ser un método práctico para regiones de bajos recursos, donde se dificulte la tamización repetida, ya que permite la identificación de mujeres en riesgo. Sin embargo, requiere una infraestructura más sofisticada, como también personal más entrenado. A pesar de esto se presenta como un método que podría utilizarse junto a la citología asegurando un programa de tamización simple, asequible, rápido y eficaz para detectar a mujeres en riesgo principalmente en países de medios y escasos recursos (38).

Se han descrito y evaluado diferentes técnicas para la detección del VPH, dentro de estas se menciona el uso de inmunofluorescencia e inmunoquímica, ELISA, sin embargo, se enfrentan al problema de la baja sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (40).

En la actualidad, se han desarrollado técnicas moleculares con el fin de detectar e identificar el ADN viral. Una de ellas es la Captura Híbrida Viral II (HC-II), que incluye un número mayor de tipos de alto riesgo y mejora los límites de detección de la técnica, además al ser realizada junto con la citología se tiene un mejor tamizaje de la paciente infectada, sin embargo presenta una alta proporción de falsos negativos y hace reacción cruzada con tipos virales de alto riesgo, con la consecuente dificultad de identificar el tipo viral específico (16).

Una de las técnicas más empleadas es la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés de: Polymerase chain reaction)(Iftner and Villa 2003; Cortés et al. 2003). Ésta es una técnica muy sensible y específica, permite identificar la presencia de ADN viral, incluso cuando hay bajas copias en la muestra. Sin embargo presenta limitantes relacionadas con la selección de los sets de cebadores adecuados y la estandarización de

los protocolos. Dentro de la variedad de cebadores que se han desarrollado para la identificación de VPH, se encuentran aquellos que serán utilizados en el presente proyecto y se denominan GP5+/6+, este permite detectar baja cantidad de ADN de VPH (70), MY09/11 diseñado para detectar infección en la existencia de múltiples tipos virales (74) y pU1M/2R el cual es específico para varios tipos de VPH de alto riesgo (31, 55, 71).

5.7 Antecedentes

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés de: Polymerase chain reaction) en tiempo real, una de las técnicas más usadas y confiables para la determinación de cantidad viral en las muestras (75), realiza la detección de mínimas cantidades de copias virales, presentando valores altísimos de sensibilidad y especificidad, con lo cual se hace confiable la detección (13). La identificación de la carga viral para VPH se ha realizado en muestras de mujeres con varios grados de lesión (76), con varios tipos virales (7, 43, 44), y con diferentes muestras (45), entre otros.

Estudios previos, realizados en mujeres de diferentes regiones del mundo, han demostrado una alta relación entre la carga viral y la severidad de la enfermedad. Un estudio transversal realizado en China, encontró una fuerte asociación de alta carga viral en mujeres con CIS, con un OR de 68 (IC95% 17.8-259.7), estableciendo que una carga viral alta podría predecir un riesgo futuro de desarrollar CC y plantean la posibilidad de emplear marcadores adicionales para identificar de manera temprana a mujeres en riesgo (47).

En México, se realizó un estudio de casos y controles con hallazgos que sugieren una relación fuerte entre la cantidad de ADN viral y el estadio de las lesiones cervicales. Encontrando un incremento de la carga viral proporcional a estadios más avanzados de las lesiones, con un OR de 365.8 (IC 95% 94.7-1412) con NIC 2-3, lo cual permite inferir una asociación dosis-respuesta, concluyendo que existe un mayor riesgo de CC, al presentar infecciones persistentes con una alta carga viral (8).

Sin embargo, los estudios realizados en China y México, han empleado como técnica de cuantificación la Captura Híbrida Viral II (HCII), la cual hace una evaluación cualitativa de 13 tipos virales de alto riesgo, y no permite establecer el tipo o tipos virales específicos infectantes (40).

Dentro de los estudios que han empleado la técnica de PCR en tiempo real, uno de ellos encontró que el riesgo de desarrollar Carcinoma In Situ (CIS), incrementa de manera proporcional al aumento en la carga viral del VPH-16 detectada por PCR en tiempo real, reportando que mujeres con alta carga viral del VPH-16, tienen 30 y 60 veces más

de riesgo de desarrollar CC y CIS respectivamente. Identificando, además una asociación entre la infección persistente por VPH-16 y CIS, evidenciándose que un 25% de mujeres menores de 25 años, con infección y alta carga viral, desarrollaban CIS luego de 15 años. Consideraron que mujeres en riesgo podrían identificarse realizando PCR en tiempo real para la detección de VPH, adicional a la citología, y que además la cuantificación del ADN viral podría predecir el riesgo de cáncer previo a la detección por métodos de tamización actuales (9, 10).

En Colombia, un estudio de cohorte con 1728 mujeres, fueron seguidas por 9 años, encontró que la persistencia de un tipo como VPH-16, aporta mayor riesgo para el desarrollo de lesiones de alto grado, planteándose que la carga viral es un determinante para la persistencia de la infección y la eliminación, ocurriendo ésta a los 5 años sin cambio en el tipo viral (28).

Con este proyecto se pretende determinar la carga viral mediante una técnica cuantitativa como lo es la PCR en tiempo real, de seis tipos virales de alto riesgo, previamente identificados como los de mayor prevalencia en Colombia, teniendo como base una población de mujeres heterogénea como la que se encuentra en nuestro país, con la finalidad de comparar la carga viral de los seis tipos del VPH de alto riesgo con mayor prevalencia en nuestra población, entre mujeres con y sin alteraciones citológicas, estableciendo así su asociación.

6. PROPÓSITO

Con la realización del presente proyecto se espera aportar al conocimiento que se tiene acerca de la asociación entre la carga viral del Virus del Papiloma Humano (VPH) con la progresión de lesiones cervicales hacia Cáncer de Cérvix (CC) en la población de mujeres colombianas, provenientes de diferentes regiones sociodemográficas y etnias.

De ésta manera, y en conjunto con información obtenida previamente (31, 55, 71), se espera discernir cuáles factores intrínsecos del virus y del hospedero, y de qué manera interactúan en el desenlace de la infección, en la regresión o la progresión de lesiones precursoras. Teniendo presente lo anterior, los resultados constituyen la base, que permita contribuir en el mejoramiento, y/o diseño de programas de prevención y control del CC en Colombia, que incluyan métodos de detección, genotipificación, y cuantificación de la carga viral y así permitan la identificación temprana de mujeres en riesgo de desarrollar CC, tal y como se ha planteado en algunos estudios (37).

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Identificar la asociación entre la carga viral de seis tipos de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR), y la frecuencia de lesiones escamosas intraepiteliales en mujeres colombianas.

7.2 Objetivos Específicos

Describir las características sociodemográficas de las mujeres participantes en el estudio.

Identificar los factores de riesgo presentes en dos grupos de mujeres (con y sin lesiones cervicales) y determinar si existen diferencias entre éstos.

Determinar las prevalencias tipo-específicas para seis tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) en mujeres provenientes de diferentes regiones del país.

Cuantificar el ADN genómico y el número de copias virales presentes en muestras cervicales de las mujeres incluidas en el estudio.

Establecer las diferencias existentes en la distribución de la carga viral de seis tipos de VPH entre mujeres con y sin lesiones cervicales.

8. METODOLOGÍA

8.1 Diseño

Para el presente proyecto se diseñó un estudio transversal analítico. Este estudio parte de una base de datos que comprende información completa relacionada con datos sociodemográficos, características de comportamiento sexual, factores de riesgo, hallazgos colposcópicos y tipificación de VPH por PCR convencional, de 266 mujeres provenientes de diferentes regiones del país, que participaron en un estudio longitudinal multicéntrico, realizado previamente por la FIDIC entre el 2007 y 2010.

Tras la revisión de la base de datos, se seleccionaron 180 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión de éste estudio. Teniendo en cuenta los hallazgos colposcópicos, se realizó la distinción de dos grupos de mujeres: el primer grupo, constituido por mujeres con LEI, (mujeres cuya colposcopia reportaba lesiones intraepiteliales de bajo o alto grado); y un segundo grupo de mujeres compuesto por aquellas con resultado de colposcopia negativa para lesiones intraepiteliales. Cada mujer con LEI fue emparejada con dos mujeres negativas para LEI, teniendo en cuenta la edad (+/- 5 años) y la fecha de ingreso al estudio multicéntrico.

En las muestras de cérvix de las 180 mujeres incluidas en el estudio, se realizó la detección y cuantificación del gen constitutivo celular *HMBS* (*Homo sapiens hydroxymetilbilano sintasa*) y de seis tipos de VPH de alto riesgo (VPH-16, -18, -31, -33, -45 y -58), empleando la técnica de PCR en tiempo real. Las mujeres cuyas muestras no tuvieron amplificación del gen *HMBS* fueron excluidas de los análisis estadísticos realizados en el presente estudio.

8.2 Hipótesis

8.2.1 Hipótesis Conceptual

La presencia de lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) está asociada al nivel de carga viral del Virus del Papiloma Humano.

8.2.2 Hipótesis nula

La frecuencia de LEI es igual entre mujeres que presentan una carga viral de VPH baja y aquellas con carga viral alta.

8.2.3 Hipótesis alterna

La frecuencia de LEI es diferente entre mujeres que presentan una carga viral de VPH baja y aquellas con carga viral alta.

8.3 Población y Muestra

8.3.1 Población

Diana o Blanco: Mujeres colombianas entre 18 y 69 años de edad.

Accesible: Mujeres entre 18 y 62 años de edad, de 3 regiones del país, que aceptaron participar en el Proyecto multicéntrico “*Comparación de la prueba serológica de ELISA de anticuerpos anti-VPH con la citología y con la detección del ADN viral, al ser utilizadas como prueba de tamización para la detección de infección persistente por el Virus del Papiloma Humano*”. Todas las mujeres asistieron voluntariamente a los programas de promoción y prevención (PyP) de Cáncer de Cérvix (CC), entre Abril del 2007 y Marzo del 2010 a las siguientes instituciones: Hospital de Engativá de Bogotá (n=921), Hospital San Juan Bautista de Chaparral-Tolima (n=174), Nuevo Hospital San Rafael de Girardot-Cundinamarca (n=334).

8.3.2 Muestra

El tamaño mínimo adecuado de muestra, se calculó teniendo en cuenta una diferencia de proporciones para una alta carga viral de VPH entre mujeres con y sin LEI de 0.42 y 0.052 respectivamente (8, 47). Además se estableció una significancia de 0.05, un poder estadístico de 90% y una razón entre los dos grupos de 1:2. Con éstos supuestos, se requerían al menos 23 mujeres con LEI y 46 mujeres negativas para lesión cervical. Sin embargo, dada la disponibilidad de pacientes, guardando una razón 1:2, se seleccionaron 60 mujeres con LEI y 120 mujeres sin LEI, que fueron emparejadas por edad (+/- 5 años) y fecha de ingreso al estudio multicéntrico. El cálculo se efectuó con el comando Sampsi de STATA 10®.

8.4 Criterios de inclusión y exclusión

8.4.1 Criterios de inclusión

- Mujeres entre 18 y 62 años, que aceptaron voluntariamente participar en el proyecto “*Comparación de la prueba serológica de ELISA de anticuerpos anti-VPH con la citología y con la detección del ADN viral, al ser utilizadas como prueba de tamización para la detección de infección persistente por el Virus del*

Papiloma Humano”, y accedieron a la toma de muestra cervical, previo diligenciamiento del consentimiento informado, para la participación en estudios de investigación en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

- Mujeres con información relacionada con datos sociodemográficos, factores de riesgo y tipificación de VPH completa.
- Mujeres con resultado de colposcopia verificable.
- Mujeres positivas para infección por VPH, identificadas previamente mediante PCR convencional, con positividad para al menos uno de los cebadores descritos previamente GP5+/6+, MY09/11 y pU1M/2R. (31, 77).
- Mujeres con muestra suficiente para los análisis moleculares por PCR en tiempo real.

8.4.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron las mujeres en las que no se obtuvo amplificación del gen *HMBS* mediante PCR en tiempo real (7 mujeres).

8.5 Fuentes de información y técnicas de recolección

8.5.1 Base de datos

Se contó con una base de datos “Software Validación de registros para el estudio del VPH”, la cual contiene información acerca de las características sociodemográficas, factores de riesgo, hallazgos colposcópicos y resultados de detección de infección por VPH (por PCR convencional), de las mujeres que aceptaron participar en el estudio multicéntrico realizado entre 2007-2010.

Todas las mujeres asistían voluntariamente a programas de PyP de CC, en centros hospitalarios de diferentes regiones del país (Leticia, Girardot, Chaparral, Bogotá y Tumaco) que tenían convenio con la FIDIC. Las mujeres siguieron el protocolo de diagnóstico y tratamiento de CC establecido por cada una de las instituciones. De acuerdo a los resultados de la citología, se procedió a la realización de la colposcopia, sin embargo, ésta también se practicó a aquellas mujeres con citología negativas para lesiones, pero positivas para VPH detectado mediante PCR convencional. La biopsia se realizó de acuerdo con las guías de tamización de CC en Colombia (78).

Se seleccionó la colposcopia como el mejor método para definir la presencia o ausencia de lesiones cervicales, puesto que en estudios previos la colposcopia ha mostrado una buena correlación con el hallazgo de anormalidades histológicas (79).

Adicional a la firma del consentimiento, cada una de las mujeres proporcionó información sociodemográfica y de comportamiento sexual, al diligenciar un cuestionario previamente validado, construido a partir de la revisión de la literatura. Dicho cuestionario se realizó previa toma de muestra cervical. Las preguntas realizadas fueron iguales para todas las mujeres y este cuestionario fue aplicado por personal de la salud capacitado para tal fin, personal que no tenía conocimiento de los objetivos de dicho estudio.

8.5.2 Extracción de ADN de VPH

El ADN genómico de muestras cervicales (almacenadas a 4°C, en etanol al 95%) de pacientes infectadas con Virus de Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR) tipo 16, 18, 31, 33, 45 y 58 previamente confirmado por PCR convencional, (con positividad para al menos uno de los cebadores descritos previamente GP5+/6+, MY09/11 y pU1M/2R) (31), fue extraído usando el kit de Buffer de lisis Quick Extract Solution de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las muestras fueron homogenizadas en 200 µL de buffer de lisis y sometidas a un periodo de incubación de 65 °C por 6 minutos, seguido de 92 °C por 2 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

8.5.3 Cuantificación de carga viral de VPH por PCR en tiempo real

Cebadores y sondas. Los cebadores específicos para cada tipo viral de alto riesgo y para el gen *HMBS* fueron diseñados tomando como referencia el estudio publicado por Moberg, M y colaboradores (13). Un nuevo juego de cebadores dirigido contra la región E7 de VPH-33 y para VPH-58 fue diseñado, ya que los cebadores descritos por Moberg, M, et al., no brindaban una identificación tipo-específica para éstos. El diseño de las sondas para detectar cada tipo viral y el gen control, se realizó teniendo en cuenta que varios tipos virales serían detectados en una sola reacción y de acuerdo al soporte técnico de Integrated DNA technologies (Tabla 1).

Clonación y secuenciación. Las muestras cervicales procesadas e identificadas como positivas para VPH por PCR convencional, fueron usadas como molde en reacciones de PCR de 10µL, que contenían 0.5 U/µL de enzima Mango *Taq* DNA polymerase (Bioline), 1x de Buffer de reacción de color Mango *Taq*, 2 mM de MgCl₂, 250 nM dNTP's, 1 mM de cebadores y agua libre de DNAsa para completar el volumen de reacción.

La PCR para cada fragmento inició con un paso de denaturación de 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 seg, *tm* por 20 seg y 72°C por 30 seg. Una reacción que contenía agua libre de ADN fue usada como control negativo. Los

amplicones obtenidos fueron purificados con el Kit Wizard PCR preps (Promega), una vez su calidad fue evaluada mediante gel de agarosa al 3.25%, luego ligados al vector TOPO TA Cloning y posteriormente transformados en células *E. coli* TOP10 (Invitrogen).

Varios clones crecidos en platos LB selectivos que contenía 50 µg/mL de kanamicina, fueron incubados en caldo LB a 37 °C con 250 rpm durante toda la noche. Los plásmidos recombinantes fueron purificados usando el kit UltraClean mini plasmid prep (MO BIO laboratories, California, USA) y secuenciados con el analizador genético automático ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems, California, USA). La integridad de cada inserto fue confirmada por el alineamiento de los productos secuenciados con los respectivos fragmentos teóricos de cada gen usando el software Clustal W (80).

Tabla 1. Cebadores, plasmídicos y sondas empleadas para la PCR en tiempo real.

Gen	Tipo viral	Cebador	Secuencia cebadores (5' - 3')	T _m (°C)	Longitud del producto (pb)	Número de moléculas ADN viral	Tubo reacción PCR	Sonda	Quencher
<i>E7</i>	VPH-16	F	AGCTCAGAGGAGGAGGAT	54	78	1.43x10 ¹²	1	FAM	ZEN/IBFQ
		R	GGTTACAATATTGTAATGGGCTC						
<i>E1</i>	VPH-18	F	CATTTTGTGAACAGGCAGAGC	53.7	76	1.19x10 ¹²	2	Cy5	IBRQ
		R	ACTTGTGCATCATTGTGGACC						
<i>E6</i>	VPH-31	F	ACGATTCCACAACATAGGAGGA	53.7	81	1.35x10 ¹²	2	HEX	ZEN/IBFQ
		R	TACACTTGGGTTTCAGTACGAGGT						
<i>E7</i>	VPH-33	F	ATTAAGTGACAGCTCAGATGA	53.7	124	1.86x10 ¹²	3	FAM	ZEN/IBFQ
		R	ACATAAACGAACTGTGGTGT						
<i>E1</i>	VPH-45	F	CCATTTGTGAACAGGCAGAGC	53.7	80	1.59x10 ¹²	3	Cy5	IBRQ
		R	CAACACCTGTGCATCATTCTGA						
<i>E7</i>	VPH-58	F	CGAGGATGAAATAGGCTTGG	53.7	109	1.23x10 ¹²	4	HEX	ZEN/IBFQ
		R	ACACAAACGAACCGTGGCGT						
<i>HMBS</i>		F	GCCTGCAGTTTCAAATCAGTG	53.7	119	1.98x10 ¹²	4	FAM	ZEN/IBFQ
		R	CGGGACGGGCTTTAGCTA						

Abreviaciones: F and R: forward and reverse; *T_m*: temperatura melting; VPH: virus del papiloma humano; HMBS: hydroxymethylbilane synthase; PCR: real time polymerase chain reaction; FAM (6-carboxyfluorescein); Cy5: FluoroLink; mono reactive dye Cy5; HEX: hexachlorofluoresceine; ZEN/IBFQ: ZEN and Iowa Black FQ; IBRQ: Iowa Black RQ.

PCR en tiempo real. Se obtuvieron diluciones seriadas de cada plasmídico de 1:10 (10^6 - 10^{11} copias), cuya concentración inicial fue cuantificada empleando el NanoDrop™2000 de Thermo Scientific (Tabla 1). El número de moléculas de ADN fue determinado por medio de la ecuación 1.

Ecuación 1. Número de copias de ADN viral (<http://web.uri.edu/gsc/real-time-pcr> (81)(81)(81)(81)(81)(81)(79).

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad ADN (ng)} * 6.022 \times 10^{23} \text{ (number/mole)}}{\text{Longitud producto (pb)} * 1 \times 10^9 \text{ (ng/g)} * 650 \text{ (g/mole of bp)}}$$

6.022×10^{23} moléculas/mol: Número de Avogadro. 650 Daltons: peso medio de un par de bases (pb). Se multiplica por 1×10^9 , para convertir a ng y luego multiplicando por la cantidad de ADN (en ng).

Se incluyeron 6 puntos de dilución (para cada tipo viral y para *HMBS*), cada uno por triplicado, para la construcción de curvas de calibración, que cubrían el rango de cuantificación esperada. Como criterios para la optimización de la PCR en tiempo real, se tuvieron el coeficiente de correlación, entre 0.926 y 0.995; el rango dinámico de concentraciones (6 puntos en diluciones seriadas 1:10); la precisión, con una desviación estándar entre los triplicados de cada punto de dilución de máximo 0.5 y una eficiencia entre 0.90 a 1.10 (82, 83).

Una vez construidas las curvas de calibración para cada tipo viral y el gen control, se analizó cada muestra para la detección y cuantificación de VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-45 y VPH-58. Adicionalmente, se amplificó el gen *HMBS*, para verificar la integridad del ADN y determinar el número de copias virales por célula. La PCR en tiempo real fue realizada con el sistema de detección CFX96 Touch™ (BIO RAD), el cual puede detectar hasta 6 fluorocromos diferentes. Se realizaron 4 PCR en tiempo real en paralelo para cada paciente. Una para detectar VPH-16, otra para VPH-18 y -31, una tercera para VPH-33 y -45 y la final para VPH-58 y *HMBS* (Tabla 1).

Para todos los tipos virales y *HMBS*, se realizaron reacciones de PCR de 20 uL de volumen final. La reacción de PCR para VPH-16, contenía 1x de Buffer de reacción, 1.5 mM de $MgCl_2$, 250 nM de cada dNTP, 250 nM of cada cebador, 1.5 U/ μ L de enzima Mango *Taq* DNA polymerase (Bioline) y 500 nM de sonda. La reacción para VPH-18 y -31, 1x de Buffer de reacción, 2 mM de $MgCl_2$, 275 nM de cada dNTP, 500 nM de cada cebador de VPH-18, 250 nM de cada cebador de VPH-31, 1.5 U/ μ L de enzima Mango *Taq* DNA polymerase y 500 nM de cada sonda.

El mix de VPH-33 y -45, incluía 1x de Buffer de reacción, 1.75 mM de $MgCl_2$, 275 nM de cada dNTP, 250 nM de cada cebador de VPH-33, 500 nM de cada cebador de VPH-45, 1.5 U/ μ L de enzima Mango *Taq* DNA polymerase y 500 nM de cada sonda. Finalmente, para *HMBS* y VPH-58, contenía 1x de Buffer de reacción, 1.87 mM de $MgCl_2$, 250 nM de cada dNTP, 500 nM de cada cebador, 1.5 U/ μ L de enzima Mango

Taq DNA polymerase, 200 nM de sonde de *HMBS* y 500 nM de sonda de VPH-58. Todas las reacciones de PCR en tiempo real, contenían 2 µL de ADN humano y agua libre de ADN para completar el volumen final.

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

Las condiciones de amplificación para VPH-18, -31, -33, -45, -58 y *HMBS*, incluyeron un paso inicial de denaturación de 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 10 seg a 94° C y 30 seg a 53.7°C. La desnaturalización inicial de VPH-16, fue seguida por 30 ciclos de 30 seg a 54°C y 30 seg a 94°C.

Con estas condiciones y protocolos, se cuantificó tanto la carga viral absoluta, como la relativa para cada tipo viral. Para la carga viral relativa, se utilizó como gen de referencia el gen *HMBS*. De ésta manera se normalizó la carga viral con relación a la cantidad de ADN humano presente en cada muestra, empleando la ecuación 2.

Ecuación 2. Fórmula para obtener la carga viral normalizada.

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

8.6 Variables (Manual de codificación de variables. Anexo 1)

En el desarrollo del proyecto fueron consideradas las siguientes variables:

8.6.1 Sociodemográficas

Edad: Años cumplidos. Categorizada en <30 años, 30-40 años y > 40 años.

Origen: Lugar de residencia. Bogotá, Chaparral y Girardot.

Etnia: Blanca, mestiza, negra e indígena.

Estado Civil: Soltera, unión libre, casada, separada, viuda.

Ingresos mensuales: Categorizada en ≤ SMMLV y > SMMLV. Salario Mínimo Mensual Legal Vigente, año 2014, \$ 616.000 pesos.

Escolaridad: Analfabeta, primaria, secundaria, universitaria y técnica.

Régimen de afiliación a salud: Categorizada en Vinculado-Subsidiado y Contributivo-Particular.

8.6.2 Factores de riesgo relacionados con el huésped

Consumo de cigarrillo: Si o no.

Número de compañeros sexuales: Número de compañeros que ha tenido durante su vida sexual. Categorizada en 1, 2-3 y más de 3.

Edad primera relación sexual: En años. Categorizada en <16 años, 16-19 años y > 19 años

Método de planificación: Sin método, barrera, hormonal, inyectables y quirúrgico.

Número de Partos: Número de partos que ha tenido. Categorizada en 0, 1-2, 3-4, y >4.

Número de Gestaciones: Número de embarazos que ha tenido. Categorizada en 0, 1-2, 3-4, y >4.

Antecedente de aborto: Si o no.

Menopausia: Si o no.

ITS: Infecciones de transmisión sexual. Si o no.

8.6.3 Anormalidad cervical

Resultado citología: Categorizado según anomalía citológica, normal y anormal.

Hallazgo colposcopia: Descripción de la morfología de células cervicales. Categorizada en negativa para lesiones intraepiteliales, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado y lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

Lesión cervical: De acuerdo al resultado de la colposcopia. Categorizada en No: mujeres con colposcopia negativa para lesiones, y Si: mujeres con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado.

8.6.4 Virus del Papiloma Humano

Infección por VPH: infección detectada por PCR en tiempo real, por al menos un tipo viral. Si o no.

Infección por VPH-16: detección por PCR en tiempo real de ADN de VPH-16. Si o no.

Infección por VPH-18: detección por PCR en tiempo real de ADN de VPH-18. Si o no.

Infección por VPH-31: detección por PCR en tiempo real de ADN de VPH-31. Si o no.

Infección por VPH-33: detección por PCR en tiempo real de ADN de VPH-33. Si o no.

Infección por VPH-45: detección por PCR en tiempo real de ADN de VPH-45. Si o no.

Infección por VPH-58: detección por PCR en tiempo real de ADN de VPH-58. Si o no.

Número de tipos virales: Número de tipos virales detectados por PCR en tiempo real. Desde 1 tipo a 6. También categorizada en ≤ 3 tipos y > 3 tipos.

Coinfección: Infección simultánea por más de un tipo viral. Si o no.

Número de copias de HMBS: Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.

Carga viral absoluta de VPH-16: Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.

<i>Carga viral normalizada de VPH-16:</i>	$\frac{\text{Número de copias virales VPH-16}}{\text{Número de copias HMBS/2}}$
<i>Carga viral absoluta de VPH-18:</i>	Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.
<i>Carga viral normalizada de VPH-18:</i>	$\frac{\text{Número de copias virales VPH-18}}{\text{Número de copias HMBS/2}}$
<i>Carga viral absoluta de VPH-31:</i>	Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.
<i>Carga viral normalizada de VPH-31:</i>	$\frac{\text{Número de copias virales VPH-31}}{\text{Número de copias HMBS/2}}$
<i>Carga viral absoluta de VPH-33:</i>	Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.
<i>Carga viral normalizada de VPH-33:</i>	$\frac{\text{Número de copias virales VPH-33}}{\text{Número de copias HMBS/2}}$
<i>Carga viral absoluta de VPH-45:</i>	Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.
<i>Carga viral normalizada de VPH-45:</i>	$\frac{\text{Número de copias virales VPH-45}}{\text{Número de copias HMBS/2}}$
<i>Carga viral absoluta de VPH-58:</i>	Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.
<i>Carga viral normalizada de VPH-58:</i>	$\frac{\text{Número de copias virales VPH-58}}{\text{Número de copias HMBS/2}}$
<i>Carga viral absoluta Total:</i>	$\frac{\text{Suma de cargas absolutas de tipos detectados}}{\text{Número de tipos virales detectados}}$
<i>Carga viral normalizada Total:</i>	$\frac{\text{Suma de cargas normalizadas de tipos detectados}}{\text{Número de tipos virales detectados}}$

Categorización carga viral absoluta

Carga viral absoluta VPH-16 categorizada: negativa: ≤ 0 ; baja: $0 < CV \leq 5.86$ copias virales y alta: > 5.86 copias virales.

Carga viral absoluta VPH-18 categorizada: negativa: ≤ 0 ; baja: $0 < CV \leq 5.95$ copias virales y alta: > 5.95 copias virales.

Carga viral absoluta VPH-31 categorizada: negativa: ≤ 0 ; baja: $0 < CV \leq 5.14$ copias virales y alta: > 5.14 copias virales.

Carga viral absoluta VPH-33 categorizada: negativa: ≤ 0 ; baja: $0 < CV \leq 4.60$ copias virales y alta: > 4.60 copias virales.

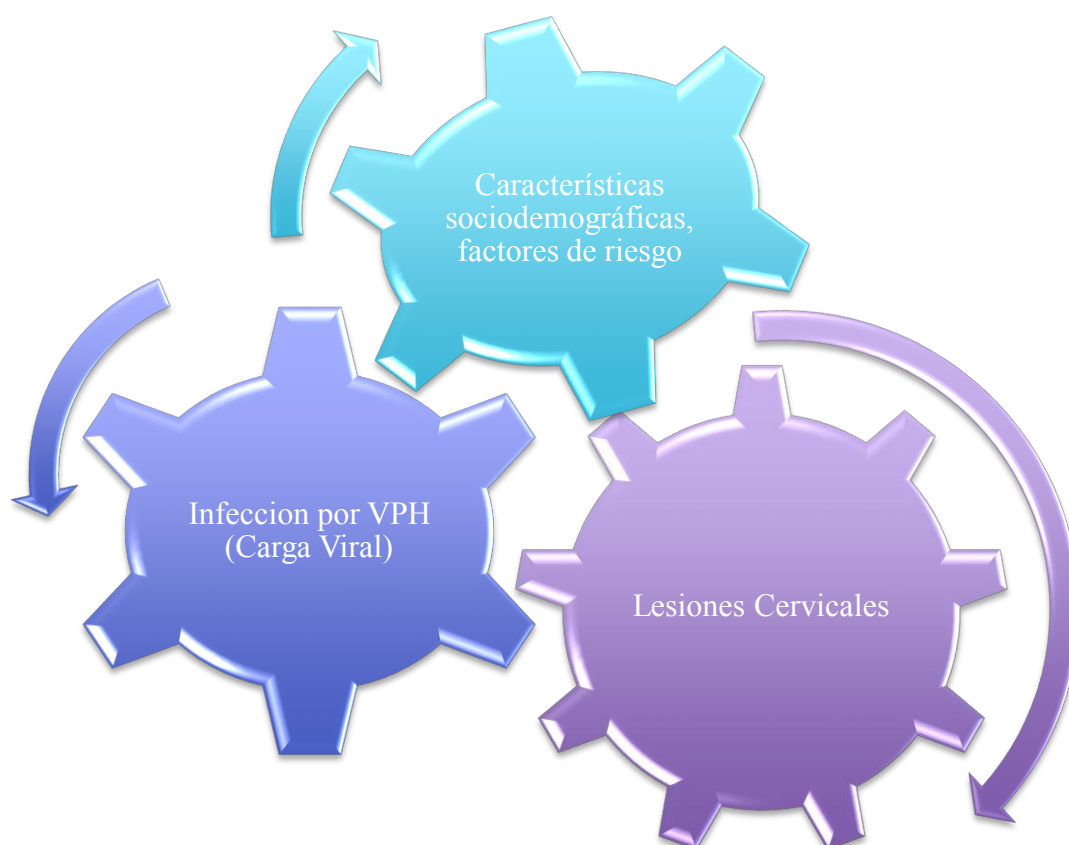
Carga viral absoluta VPH-45 categorizada: negativa: ≤ 0 ; baja: $0 < CV \leq 5.98$ copias virales y alta: > 5.98 copias virales.

Carga viral absoluta VPH-58 categorizada: negativa: ≤ 0 ; baja: $0 < CV \leq 5.97$ copias virales y alta: > 5.97 copias virales.

Carga viral absoluta Total categorizada: negativa: ≤ 0 ; baja: $0 < CV \leq 5.94$ copias virales y alta: > 5.94 copias virales.

8.6.5 Diagrama de variables

Ilustración 6. Diagrama de variables.



8.7 Calidad del dato. Control de sesgos y errores

Para la construcción de la base de datos, se desarrolló el “Software Validación de registros para el estudio del VPH”, por la empresa Siscomputo Ltda. Se realizó entrega e instalación de los módulos correspondientes, con los respectivos manuales de usuario, capacitando de manera presencial a funcionarios de la FIDIC sobre el funcionamiento del Software. Se definieron los puntos de control de la base de datos en la Coordinadora del Grupo Funcional, y el representante de Siscomputo Ltda.; como también las condiciones de confidencialidad de la información regida por el acuerdo de confidencialidad que se firma por parte del personal que tiene acceso a dicha información al momento de hacer del grupo de investigación de la FIDIC. Se definió

una forma de entrada semejante al cuestionario aplicado, definiéndose valores válidos antes del ingreso de los datos, tal como se hizo para el ingreso de los resultados de la carga viral. Los registros de la base de datos fueron ingresados por un grupo de digitadores. El manejo siguiente de los datos, se amplía detalladamente en el plan de análisis.

La recolección de la información fue realizada por profesionales pertenecientes a las diferentes instituciones asociadas, quienes previamente recibieron capacitación para el correcto diligenciamiento del consentimiento informado y la aplicación del cuestionario que contenía las preguntas relacionadas con aspectos sociodemográficos, factores de riesgo, hallazgos citológicos y colposcópicos.

Las muestras de epitelio cervical fueron tomadas por personal de la salud con conocimiento y entrenamiento para tal fin siguiendo metodologías reconocidas y aplicadas. Las muestras fueron almacenadas con etanol al 95%, a 4°C para asegurar su conservación. Cada una de las instituciones asociadas, envió a la FIDIC, las muestras, y los formatos diligenciados. En la FIDIC se realizó la verificación del correcto diligenciamiento tanto del consentimiento como de la historia clínica (cuestionario) y de la conservación de las muestras.

Las técnicas de biología molecular para la extracción de ADN, detección del gen de beta-globina, y genotipificación de VPH por PCR convencional, fueron realizadas por profesionales de biología y/o bacteriología con conocimiento y entrenamiento en éstas, siguiendo protocolos previamente diseñados y/o las instrucciones proporcionadas por las casas comerciales. Los protocolos y condiciones de PCR convencional, fueron estandarizados para cada uno de los tipos virales y el gen de la beta-globina previa realización.

Los procedimientos relacionados con el diseño de cebadores y sondas se realizaron teniendo en cuenta reportes previos de la literatura, y haciendo uso de software. La estandarización de los protocolos y condiciones de la PCR en tiempo real, para cada tipo viral y el gen *HMBS*, fue llevada a cabo posterior a la revisión de artículos científicos y de revisión sobre PCR en tiempo real. Para asegurar una técnica óptima, se realizaron múltiples ensayos, empleando un rango dinámico de concentraciones (6 puntos de diluciones seriadas 1:10). Se construyeron curvas estándar para cada tipo viral, corriendo por triplicado cada una de las diluciones de los plasmídicos. Para lo anterior, se procuró alcanzar valores adecuados de eficiencia (0.90 - 1.10), correlación (0.926 - 0.995) y precisión (+/-máximo 0.5 DS) (82, 83).

El personal a cargo de la realización de los protocolos de PCR convencional y en tiempo real, no tenían conocimiento acerca de los datos e información previamente obtenida de cada paciente.

Parte de la información con la que se trabajó, se encuentra en una base de datos (fuente secundaria), los cuales fueron recolectados previa capacitación, siguiendo un formato (Anexo 3). Los procedimientos para la detección y cuantificación de VPH en las muestras, fueron realizados por personal entrenado en técnicas de biología molecular, utilizando termocicladores calibrados y siguiendo protocolos y condiciones especiales para cada PCR, previamente estandarizados.

En relación a la carga viral, los datos fueron recolectados por el investigador, (fuente primaria), siguiendo protocolos y condiciones ya establecidos y estandarizados, para cada prueba, a través de un termociclador calibrado (CFX96 Touch™ real time detection system (BIO RAD)) de acuerdo al manual de fábrica. Para verificar la calidad de los resultados, en cada uno de los procedimientos de PCR en tiempo real, se incluyeron controles negativos con agua libre de ADNAsas (GIBCO) y controles positivos (diluciones seriadas de plasmídico de cada tipo viral).

Para el control de variables de confusión, desde el diseño del estudio, se realizó emparejamiento por edad entre los dos grupos de mujeres (\pm 5 años), y para el análisis, se llevará a cabo un modelo de análisis multivariado ajustado.

8.8 Análisis estadístico

Se contó con una base de datos, que se encuentra en el “Software Validación de registros para el estudio del VPH”, donde está contenida la información con las variables anteriormente mencionadas. La digitación de dicha información la realizó personal capacitado. La codificación de las variables fue realizada por los investigadores, teniendo en cuenta la revisión de la literatura. Con los resultados obtenidos de la cuantificación de la carga viral se completó la base de datos, definiéndose previamente valores válidos para su ingreso. Durante la digitación, se buscaron inconsistencias de valores ilegales o improbables, como también al finalizar la digitación, mediante la realización de lectura de la base de datos, informes de matriz, frecuencias y resumen de datos. Se buscaron y se evitaron errores mediante una doble entrada de datos, dividiendo el proceso por pasos definidos verificando en cada uno lo que se había realizado. Al encontrar errores se hicieron las correcciones necesarias en un archivo comando.

Un número limitado de mujeres incluídas presentaron NIC 2+ o LEI-AG (NIC 2+ de acuerdo al Sistema Bethesda. La categoría NIC se estableció incluyendo mujeres con NIC 2+ y mujeres con NIC 1 o LEI-BG (NIC 1 según sistema Bethesda) (64), lo anterior para mejorar la calidad de los análisis estadísticos del presente proyecto.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia de infecciones múltiples en mujeres colombianas, reportada previamente, los análisis se basaron en la infección tipo-específica más que en infecciones individuales por cada mujer (55).

Frecuencias y proporciones fueron empleados para el análisis univariado de las variables categóricas. En el caso de las variables cuantitativas se utilizaron medianas y rangos intercuartiles teniendo en cuenta la distribución no normal de los datos.

Las diferencias entre los grupos de mujeres en relación a variables categóricas, fueron valoradas con el test de Chi² o el test de Fisher de acuerdo a los valores observados. Se determinó si existían diferencias en la distribución de las variables cuantitativas entre los dos grupos de mujeres mediante el test de Mann-Whitney, se utilizó el test de Kruskal Wallis cuando se compararon más de dos grupos.

La distribución de la carga viral de acuerdo a los resultados de colposcopia y biopsia se analizaron con el test de Mann-Whitney *U* o el test de Kruskal Wallis teniendo en cuenta el número de grupos a comparar.

Tanto la carga viral absoluta como la normalizada, fueron analizadas, y se transformaron en log₁₀ para facilitar la interpretación de los resultados. La carga viral absoluta de cada tipo viral y la total fueron categorizadas para mejorar la calidad de los análisis: negativa: ≤ 0 ; baja : $0 < VL \leq 10^5$ copias virales y alta: $>10^5$ copias virales.

Para el análisis de asociación se estableció una dirección teórica donde la variable dependiente fue el resultado de colposcopia, categorizado como con LEI (mujeres con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado) y sin LEI (mujeres con colposcopia negativa para lesiones escamosas intraepiteliales), y la variable independiente fue la carga viral de cada tipo. Considerando que cada mujer con LEI fue emparejada con 2 mujeres sin LEI, por edad y fecha de ingreso al estudio multicéntrico, se empleó un análisis de regresión logística condicional, para valorar la asociación entre la carga viral de cada tipo y la frecuencia de las lesiones cervicales. De ésta manera se estimaron OR crudos y ajustados (por origen, raza, edad inicio de relaciones sexuales y número de tipos virales detectados), con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Todas las pruebas de hipótesis se realizaron a dos colas, con una significancia de 0.05.

Para el control de variables de confusión, desde el diseño del estudio, se realizó equiparamiento individual por la edad (\pm 5 años), y en el análisis, por medio del análisis multivariado como se mencionó anteriormente.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATA10®.

8.9 Aspectos Éticos

Los resultados de este estudio, permitirán ampliar el conocimiento que se tiene de la asociación entre la carga viral del Virus del Papiloma Humano con el desarrollo de Cáncer de Cérvix (CC) para la población de mujeres Colombianas pertenecientes a

diferentes regiones del país, y en un futuro para contemplar la implementación de la detección de VPH y cuantificación de la carga viral a los programas de prevención y control del CC de alto impacto en la salud y calidad de vida de nuestra población, como también el desarrollo de vacunas que contemplen los datos relevantes encontrados.

El desarrollo de la propuesta está basado en los principios básicos de la ética: el *respeto por las personas, justicia y beneficencia*.

8.9.1 Respeto por las personas

Considerando el respeto de la autonomía y dignidad de las mujeres, y protegiendo la libertad de elección, se incluyeron en el proyecto mujeres que asistían de manera voluntaria a las consultas de prevención del CC, que aceptaron voluntariamente participar en los estudios previos y accedieron a la toma de la muestra cervical y su utilización con fines investigativos. Se otorgó de forma escrita e individual el consentimiento informado con información clara y fácilmente comprensible sobre el Cáncer de Cérvix, el Virus del Papiloma Humano, los procedimientos a realizar, los objetivos de la investigación, los riesgos, beneficios que conllevaban los estudios y el compromiso de confidencialidad (Anexo 1). La información producto de las investigaciones previas fue anónima y manejada confidencialmente por el grupo de investigadores y el equipo de salud, asegurando la no aparición de los nombres de las pacientes en los informes de los estudios. De igual manera, se manejó la información obtenida con éste proyecto.

8.9.2 Beneficencia

Con el proyecto se espera obtener resultados que permitan la modificación de las estrategias de prevención del CC existentes, con miras a la disminución de la incidencia y mortalidad gracias a la identificación temprana de mujeres en riesgo de desarrollarlo.

De acuerdo a la resolución número 008430 de 1993 de la República de Colombia expedida por el Ministerio de Salud y tal como dicta en el Título II, capítulo 1, artículo 11, ésta es una investigación con riesgo mínimo ya que se realizó un registro de muestras previamente tomadas que se encuentran conservadas y no habrá ningún tipo de intervención (84).

8.9.3 Justicia

Los resultados obtenidos se utilizarán en beneficio de las participantes y de la comunidad a la cual pertenecen, de tal forma que las cargas y beneficios del estudio se distribuyan equitativamente, sin ninguna distinción en particular. Éstos resultados se presentarán en medios científicos con el fin de que su conocimiento sea útil para las intervenciones necesarias en todo el país.

8.9.4 Manejo de muestras Biológicas

Las muestras de las mujeres han sido manejadas (almacenamiento, extracción, tipificación, cuantificación) por el grupo de investigación de Biología del Virus del Papiloma Humano de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), asegurando su permanencia en la institución. Para el presente proyecto, se hizo un uso secundario de las muestras de mujeres seleccionadas según los criterios ya establecidos.

8.9.5 Comités de ética

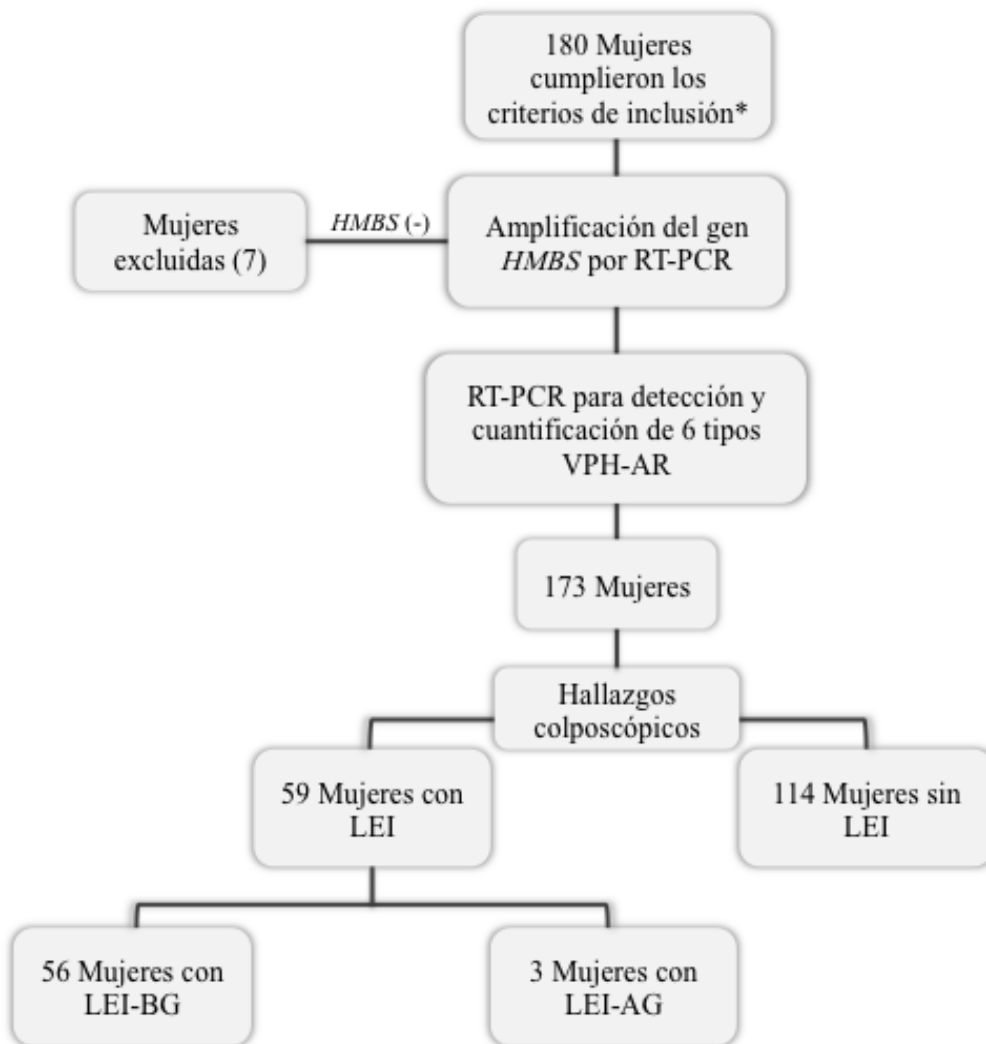
Este estudio se realizó teniendo una aprobación marco para diferentes estudios por parte de los comités de ética de cada institución, previo a la realización del estudio multicéntrico. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia; Nuevo Hospital San Rafael E.S.E, Girardot; Hospital San Juan Bautista de Chaparral E.S.E.; Hospital de Engativá (level II) (Anexo 2).

Los convenios con las instituciones participantes, el cuestionario aplicado a las pacientes y el formato del consentimiento informado se encuentran disponibles en la FIDIC para quien requiera su revisión.

9. RESULTADOS

En el estudio, 180 mujeres cumplieron con los criterios de inclusión, sin embargo, 7 de ellas fueron excluidas, puesto que no se obtuvo amplificación del gen constitutivo celular *HMBS* en sus respectivas muestras cervicales. De ésta manera la muestra quedó constituida por 173 mujeres. De acuerdo a los hallazgos colposcópicos, se establecieron dos grupos de mujeres, aquéllas con colposcopia negativa para lesiones escamosas intraepiteliales (n=114) y mujeres con colposcopia positiva para lesiones escamosas intraepiteliales (n=59). En el grupo de mujeres con LEI, 56 presentaron lesiones de bajo grado (LEI-BG) y 3 lesiones de alto grado (LEI-AG) (Ilustración 7).

Ilustración 7. Diagrama de flujo de la muestra estudiada.



Abreviaciones: PCR tiempo real: polymerase chain reaction; *HMBS*: hydroxymethylbilane synthase; VPH-AR: virus del papilloma humano de alto riesgo; LEI: lesión escamosa intraepitelial; LEI-BG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEI-AG: lesión escamosa intraepitelial de alto

grado. *Criterios de inclusión: Mujeres que aceptaron participar en estudio multicéntrico, con información completa, resultado de colposcopia verificable, positivas para infección por VPH detectada por PCR convencional y con muestra suficiente para los análisis.

Siguiendo el algoritmo diagnóstico, la biopsia fue realizada a 59 mujeres con lesiones cervicales determinadas por colposcopia; sin embargo, se obtuvieron los reportes de patología solo para 45 mujeres puesto que las muestras de las restantes 14 mujeres fueron insatisfactorias o no se obtuvieron. En un 23.73% (n= 14) de las mujeres se confirmó la presencia de NIC 1 por biopsia, (se encontró una mujer con NIC 2+). A las otras dos de las mujeres con NIC 2+ por colposcopia se identificó NIC 1 por biopsia.

En mujeres con LEI, se encontró una mediana para la edad de 40 años (RIC 14 años) y en mujeres sin LEI fue de 41.5 años (RIC 13 años). La mayoría de las mujeres que participaron en el estudio, provenían de la ciudad de Girardot (n=105; 60.69%), y la mayoría de ellas (n=80; 76.19%), no tenían lesiones identificadas por colposcopia. El 95.95% de las mujeres del estudio declararon ser mestizas (n=166). Respecto a las características sociodemográficas, y factores de riesgo, asociados a CC y a la infección por VPH, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de mujeres (con LEI y sin LEI), excepto para el origen $p < 0.005$ (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de características sociodemográficas y factores de riesgo.

Característica	Categorías	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)		Mujeres sin LEI (n =114)		p
				n	%	n	%	
Edad, años	<30	29	16.76	11	18.64	18	15.79	0.493
	30-40	54	31.21	21	35.59	33	28.95	
	> 40	90	52.02	27	45.76	63	55.26	
Origen	Bogotá	65	37.57	32	54.24	33	28.95	0.001*
	Chaparral	3	1.73	2	3.39	1	0.88	
	Girardot	105	60.69	25	42.37	80	70.18	
Ingreso mensual	≤ SMMLV	155	89.60	53	89.83	102	89.47	0.942
	> SMMLV	18	10.40	6	10.17	12	10.53	
Escolaridad	Analfabeta	1	0.58	1	1.69	0	0.00	0.094
	Primaria	82	47.40	22	37.29	60	52.63	
	Secundaria	74	42.77	28	47.46	46	40.35	
	Universitaria	10	5.78	6	10.17	4	3.51	
	Técnica	6	3.47	2	3.39	4	3.51	
Etnia	Indígena	2	1.16	0	0.00	2	1.75	0.321
	Blanca	4	2.31	2	3.39	2	1.75	
	Mestiza	166	95.95	56	94.92	110	96.49	
	Negra	1	0.58	1	1.69	0	0.00	
Estado civil	Soltera	17	9.83	4	6.78	13	11.40	0.673
	Casada	20	11.56	7	11.86	13	11.40	
	Divorciada	8	4.62	4	6.78	4	3.51	
	Unión libre	126	72.83	43	72.88	83	72.81	
	Viuda	2	1.16	1	1.69	1	0.88	

Abreviaciones: LEI: lesión escamosa intraepitelial; SMMLV: salario mínimo mensual legal vigente, año 2014, \$ 616.000 pesos (85); ITS: infección de transmisión sexual. * p < 0.05.

Tabla 2. Distribución de características sociodemográficas y factores de riesgo.

Característica	Categorías	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)		Mujeres sin LEI (n =114)		p
				n	%	n	%	
Régimen de afiliación a salud	Vinculado-Subsidiado	159	91.91	52	88.14	107	93.86	0.191
	Contributivo-Particular	14	8.09	7	11.86	7	6.14	
Consumo de cigarrillo	No	146	84.39	49	83.05	97	85.09	0.726
	Si	27	15.61	10	16.95	17	14.91	
Edad primera relación sexual, años	< 16	41	23.70	10	16.95	31	27.19	0.202
	16-19	82	47.40	33	55.93	49	42.98	
	> 19	50	28.90	16	27.12	34	29.82	
No. Compañeros sexuales	1	72	41.62	26	44.07	46	40.35	0.868
	2-mar	84	48.55	27	45.76	57	50.00	
	> 3	17	9.83	6	10.17	11	9.65	
Método de planificación	Ninguno	65	37.57	19	32.20	46	40.35	0.697
	Quirúrgico	52	30.06	15	25.42	22	19.30	
	Hormonal	19	10.98	18	30.51	34	29.82	
	De barrera	37	21.39	7	11.86	12	10.53	
Gestaciones	0	4	2.31	1	1.69	3	2.63	0.326
	1-feb	76	43.93	28	47.46	48	42.11	
	3-abr	74	42.77	27	45.76	47	41.23	
	> 4	19	10.98	3	5.08	16	14.04	
Partos	0	7	4.05	2	3.39	5	4.39	0.852
	1-feb	95	54.91	35	59.32	60	52.63	
	3-abr	66	38.15	21	35.59	45	39.47	
	> 4	5	2.89	1	1.69	4	3.51	
Abortos	No	82	47.40	27	45.76	55	48.25	0.757
	Si	91	52.60	32	54.24	59	51.75	
Menopausia	No	148	85.55	53	89.83	95	83.33	0.249
	Si	25	14.45	6	10.17	19	16.67	

Abreviaciones: LEI: lesión escamosa intraepitelial; SMMLV: salario mínimo mensual legal vigente, año 2014, \$ 616.000 pesos (85); ITS: infección de transmisión sexual. * p < 0.05.

Tabla 2. Distribución de características sociodemográficas y factores de riesgo.

Característica	Categorías	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)		Mujeres sin LEI (n =114)		p
				n	%	n	%	
ITS	No	137	79.19	47	79.66	90	78.95	0.913
	Si	36	20.81	12	20.34	24	21.05	
Resultado de citología	Normal	161	93.06	55	93.22	106	92.98	0.612
	Anormal	12	6.94	4	6.78	8	7.02	

Abreviaciones: LEI: lesión escamosa intraepitelial; SMMLV: salario mínimo mensual legal vigente, año 2014, \$ 616.000 pesos (85); ITS: infección de transmisión sexual. * $p < 0.05$.

A nivel general, el 91.91% (n=159) de la muestra resultó positiva para VPH mediante la detección por PCR en tiempo real, correspondiendo al 93.22% (n=55) de mujeres con LEI (92.86% en LEI-BG, 100% en LEI-AG) y 91.23% (n=104) de mujeres sin lesión. Del total de mujeres infectadas, 79.24% (n=126) presentaron infección por más de un tipo viral; esto se observó en el 81.82% (n=45) de mujeres con LEI y en el 77.88% (n=81) de mujeres negativas para lesión. La infección simultánea por 2 tipos virales de alto riesgo (VPH-AR) fue más frecuente en mujeres sin lesiones (n= 29; 27.88%) y por 3 tipos virales, en aquellas con lesiones (n=19; 34.54%). Los tipos virales más frecuentes en infecciones múltiples, en ambos grupos, fueron VPH-18 y VPH-16.

La distribución tipo-específica, mostró que VPH-18 fue el tipo viral más frecuente en los dos grupos (69.49% en mujeres con LEI y 66.66% en mujeres sin LEI), seguido por VPH-16 (57.63%) y VPH-45 (38.98%) en mujeres con lesión y por VPH-16 (45.61%), VPH-31 (45.61%) y VPH-45 (38.60%) en mujeres negativas para lesión. El tipo viral menos frecuente en ambos grupos, fue VPH-33.

En mujeres con lesión se registró una mayor proporción de infecciones con carga viral alta por VPH-18, VPH-16, y VPH-31. Mientras que en mujeres sin lesión, fue más frecuente la presencia de carga viral alta en infecciones por VPH-31, VPH-45 y VPH-58 (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada.

Tipo VPH	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)						Mujeres sin LEI (n=114)						p
			Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
VPH-16	86	49.71	25	42.37	12	20.34	22	37.29	62	54.39	13	11.40	39	34.21	0.186
VPH-18	117	67.63	18	30.51	10	16.95	31	52.54	38	33.33	18	15.79	58	50.88	0.928
VPH-31	71	41.04	40	67.80	1	1.69	18	30.51	62	54.39	3	2.63	49	42.98	0.257
VPH-33	14	8.09	54	91.53	0	0.00	5	8.47	105	92.11	1	0.88	8	7.02	0.846
VPH-45	67	38.73	36	61.02	9	15.25	14	23.73	70	61.40	10	8.77	34	29.82	0.366
VPH-58	56	32.37	42	71.19	7	11.86	10	16.95	75	65.79	16	14.04	23	20.18	0.772
VPH-AR	159	91.91	4	6.78	8	13.56	47	79.66	10	8.77	12	10.53	92	80.70	0.777

Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados; LEI: lesión escamosa intraepitelial. *Carga viral VPH: categorizada como ≤ 0 copias virales = negativa, $0 < VL \leq 10^5$ copias virales = baja carga viral, $> 10^5$ copias virales = alta carga viral.

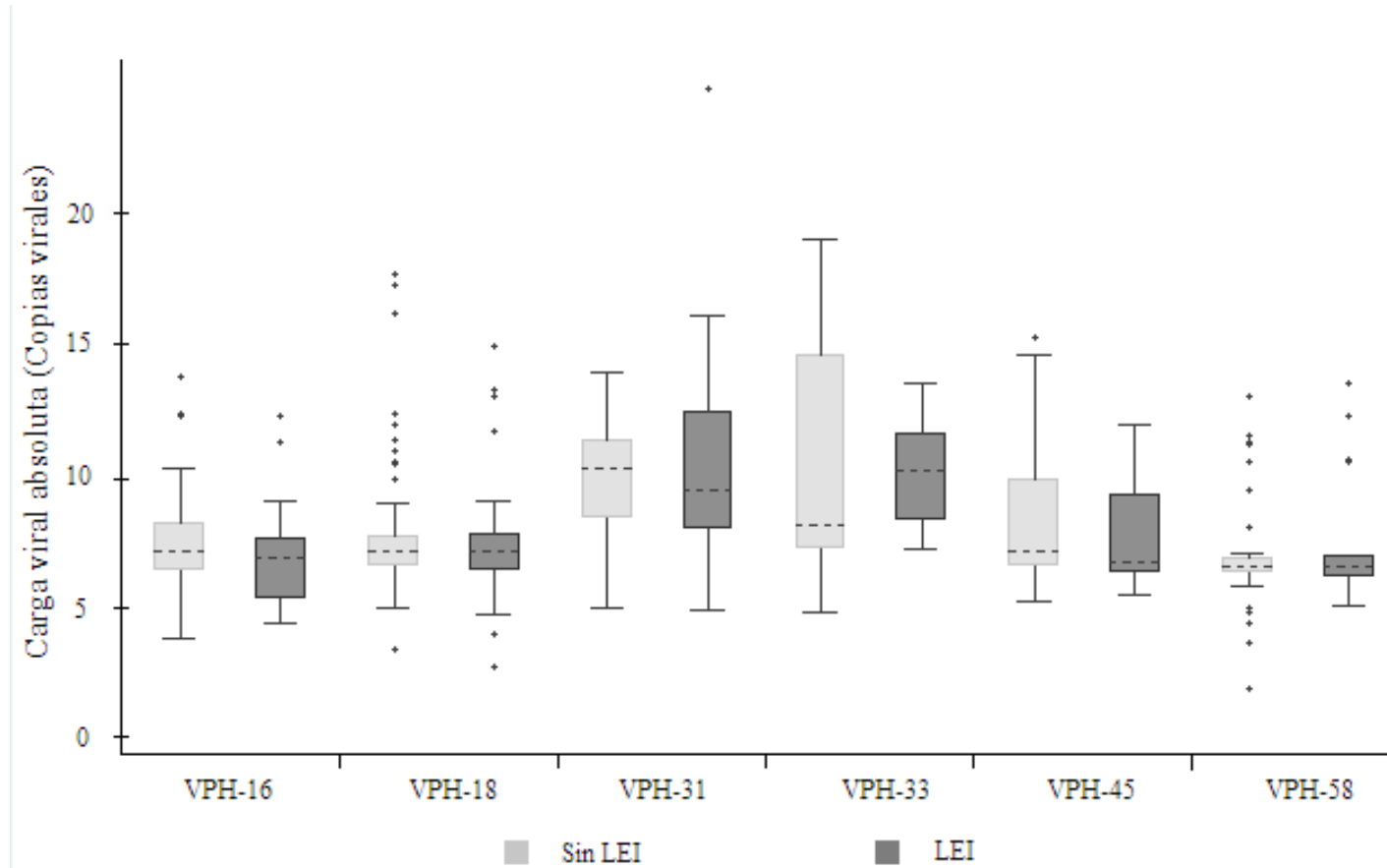
En las ilustraciones 8 y 9, se observa la distribución de la carga viral absoluta y normalizada de cada tipo de VPH-AR, comparando los dos grupos de mujeres. Cabe resaltar que los tipos virales con mayor carga viral absoluta, fueron VPH-31 (en mujeres sin LEI) y VPH-33 (en mujeres con LEI), con medianas para VPH-31 de 9.41 copias virales (RIC 2.58 copias) y para VPH-33 de 9.33 copias virales (RIC 2.94 copias). VPH-58, presentó la carga viral absoluta más baja en ambos grupos. Para la carga viral normalizada, el rango de los valores fue menor que los obtenidos en la carga absoluta (hasta 10^8 copias virales). Los tipos VPH-33 y VPH-31 presentaron los mayores valores de carga normalizada y absoluta para mujeres sin LEI y mujeres con LEI respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la carga viral (absoluta y normalizada) para cada tipo de VPH-AR evaluado, entre los dos grupos de pacientes

Las pacientes con LEI-AG (n=3), presentaron infección por VPH. Dos de ellas con detección de VPH-18 y VPH-31, simultáneamente y la restante fue positiva para VPH-18, VPH-16 y VPH-45. Estas mujeres presentaron valores altos de carga viral total (absoluta y normalizada), carga viral de VPH-18 (normalizada) y carga viral de VPH-16 (absoluta) comparadas con las mujeres con LEI-BG, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, para VPH-31, la carga viral normalizada, fue mayor en mujeres negativas para lesión cervical y con LEI-BG, en comparación con mujeres que tenían LEI-AG, presentando una significancia marginal ($p=0.052$).

De igual manera se analizó la distribución de la carga viral para cada uno de los tipos VPH-AR de acuerdo al resultado de biopsia. Se encontraron resultados similares a los hallados con colposcopia, evidenciándose cargas virales absolutas mayores en las mujeres con mayor grado de lesión y para algunos tipos (VPH-31, VPH-33) cargas virales normalizadas más altas; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido al número de mujeres analizado (Tabla 4).

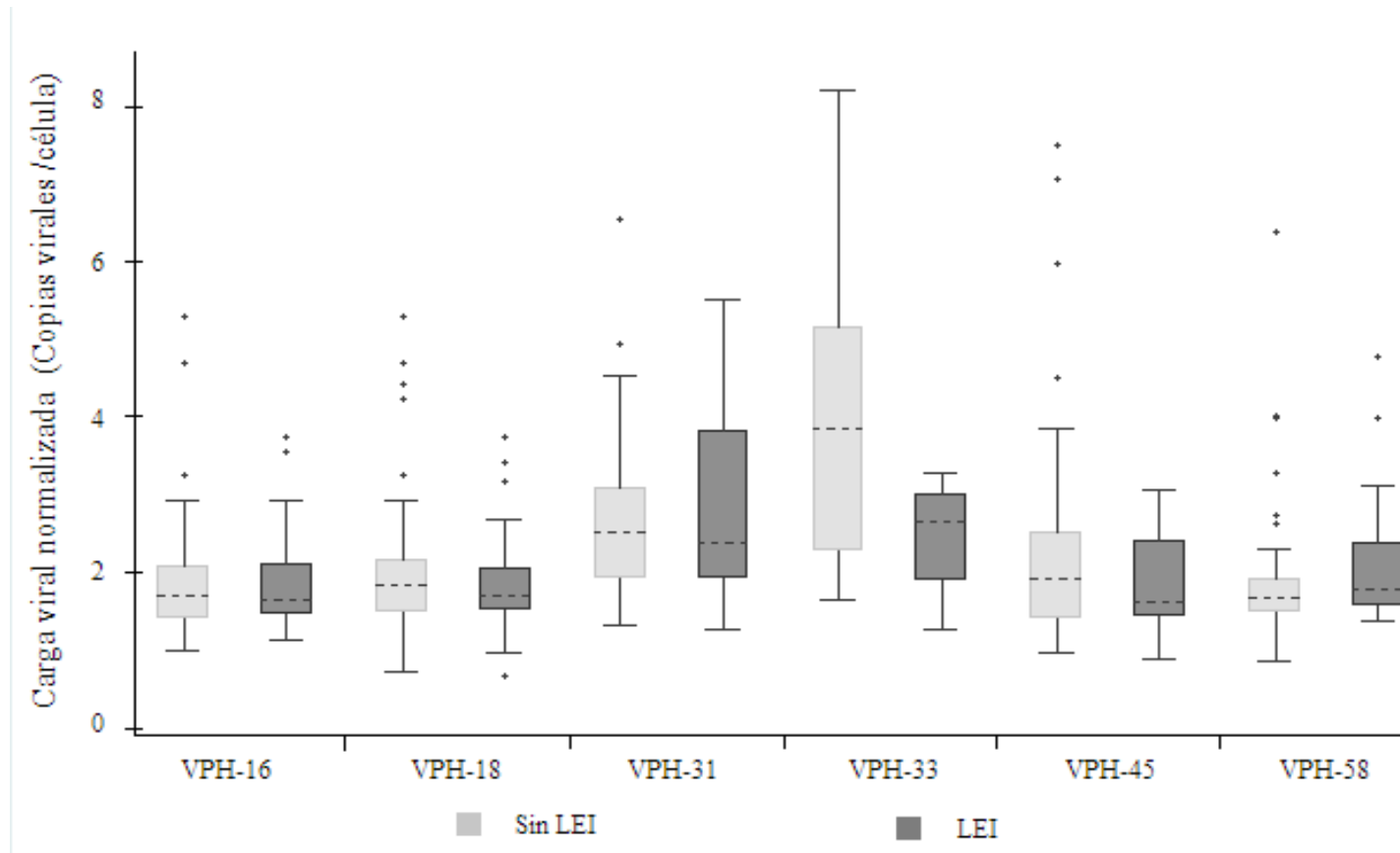
Se calcularon los OR (odds ratios) crudos para estimar la magnitud de la asociación entre la carga viral absoluta de cada tipo viral y la presencia de lesiones escamosas intraepiteliales. Al construir el modelo de regresión logística condicional, ajustando por el origen, la etnia, la edad de inicio de relaciones sexuales y el número de tipos virales infectantes, se evidenció que tener una infección por VPH-16 se asoció significativamente, con una mayor frecuencia de lesiones cervicales. Sin embargo, la presencia de lesiones es más frecuente en el grupo de mujeres con carga viral baja para VPH-16 ($0 < VL \leq 5.86$ copias virales), que en mujeres con carga alta (>5.86 copias virales), ($OR_a: 3.53$, $IC95\%: 1.16 - 10.74$; $OR_a: 2.63$, $IC95\%: 1.09 - 6.36$ respectivamente). Además, se encontró que es menor la frecuencia de lesiones cervicales en mujeres con infección por VPH-31 y una carga viral alta (>5.14 copias virales), $OR_a: 0.34$, $IC95\%: 0.15 - 0.78$. Para los demás tipos virales, no se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas con la presencia de LEI (Tabla 5).

Ilustración 8. Distribución de la carga viral absoluta para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes.



La línea discontinua indica la mediana, la caja representa el rango intercuartil (RIC). Los bigotes que se extienden de las cajas son los límites superior e inferior. Los valores extremos se representan con marcadores de diamantes \diamond . No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a distribución de la carga de ADN de cada tipo de VPH entre los grupos de pacientes (Test de Mann-Whitney). Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; LEI: lesión intraepitelial escamosa.

Ilustración 9. Distribución de la carga viral normalizada para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes.



La línea discontinua indica la mediana, la caja representa el rango intercuartil (RIC). Los bigotes que se extienden de las cajas son los límites superior e inferior. Los valores extremos se representan con marcadores de diamantes \diamond . No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a distribución de la carga de ADN de cada tipo de VPH entre los grupos de pacientes (Test de Mann-Whitney). Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; LEI: lesión intraepitelial escamosa.

Tabla 4. Distribución de la carga viral de 6 tipos VPH-AR de acuerdo a los resultados de biopsia.

Tipo VPH	Negativa (n=33)			LEI-BG (n=19)			LEI-AG (n=1)		
	% (n)	Carga Viral, mediana (RIC)		% (n)	Carga Viral, mediana (RIC)		% (n)	Carga Viral, mediana (RIC)	
		Absoluta	Normalizada		Absoluta	Normalizada		Absoluta	Normalizada
VPH-16	66.67 (22)	6.42 (1.69)	1.79 (0.54)	57.89 (11)	6.77 (3.04)	1.69 (0.64)	0	n/a	n/a
VPH-18	66.67 (22)	6.29 (1.34)	1.84 (0.51)	68.42 (13)	6.61 (2.28)	1.67 (1.79)	100 (1)	7.02 (n/a)	2.07 (n/a)
VPH-31	30.30 (10)	8.51 (1.90)	2.39 (0.38)	31.58 (6)	9.69 (6.00)	3.50 (2.17)	0	n/a	n/a
VPH-33	3.03 (1)	6.75 (n/a)	1.98 (n/a)	10.53 (2)	8.48 (1.70)	2.37 (2.06)	100 (1)	10.57 (n/a)	3.13 (n/a)
VPH-45	51.52 (17)	6.13 (2.95)	1.79 (1.00)	42.11 (8)	6.24 (1.17)	1.61 (0.80)	0	n/a	n/a
VPH-58	21.21 (7)	5.93 (3.89)	2.14 (2.35)	36.84 (7)	6.12 (0.34)	1.75 (0.28)	0	n/a	n/a
VPH-AR	94.34 (31)	6.37 (1.20)	2.06 (0.63)	94.74 (18)	6.77 (2.97)	2.12 (1.37)	100 (1)	8.80 (n/a)	2.60 (n/a)

Las cargas virales fueron transformadas en logaritmo en base 10. Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; LEI: lesión escamosa intraepitelial; RIC: rango intercuartil; n/a: No aplicable. *Copias VPH/célula= Número de copias de VPH/ (Número de copias *HMBS*/2).

**VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados.

Tabla 5. Modelo de regresión logística condicional.

Tipo VPH	Carga viral	Mujeres con LEI / Sin LEI	OR crudo (95%CI)	OR*	IC 95 %
VPH-16	Negativa	25/62	<i>Referencia</i>		
	0 < CV ≤ 5.86	12/13	2.19 (0.88 – 5.43)	3.53	1.16 – 10.74
	5.86 < CV	22/39	1.27 (0.64 – 2.50)	2.63	1.09 – 6.36
VPH-18	Negativa	18/38	<i>Referencia</i>		
	0 < CV ≤ 5.95	10/18	1.14 (0.45 – 2.89)	1.72	0.52 – 5.69
	5.95 < CV	31/58	1.06 (0.52 – 2.17)	1.77	0.68 – 4.63
VPH-31	Negativa	40/62	<i>Referencia</i>		
	0 < CV ≤ 5.14	1/3	0.52 (0.04 – 6.29)	0.15	0.01 – 2.26
	5.14 < CV	18/49	0.60 (0.32 – 1.14)	0.34	0.15 – 0.78
VPH-33	Negativa	54/105	<i>Referencia</i>		
	0 < CV ≤ 4.60	0/1	0.00 (0 - ,)	0.00	0.00 - ,
	4.60 < CV	5/8	1.43 (0.45 – 4.50)	1.67	0.44 – 6.28
VPH-45	Negativa	36/70	<i>Referencia</i>		
	0 < CV ≤ 5.98	9/10	1.53 (0.60 – 3.92)	2.94	0.92 – 9.44
	5.98 < CV	14/34	0.79 (0.38 – 1.67)	1.13	0.43 – 2.96
VPH-58	Negativa	42/75	<i>Referencia</i>		
	0 < CV ≤ 5.97	7/16	0.83 (0.32 – 2.11)	0.73	0.23 – 2.31
	5.97 < CV	10/23	0.83 (0.37 – 1.83)	0.86	0.35 – 2.12
VPH-AR**	Negativa	4/10	<i>Referencia</i>		
	0 < CV ≤ 5.94	8/12	1.73 (0.40 – 7.47)	1.01	0.23 – 4.50
	5.94 < CV	47/92	1.18 (0.35 – 4.00)	1.39	0.25 – 7.81

Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados; CV: carga viral; LEI: lesión escamosa intraepitelial; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza. *Ajustado por origen, etnia, edad de primera relación sexual y número de tipos virales. ** Carga viral total= sumatoria carga viral de los tipos detectados/ número de tipos virales detectados. Valores en negrita, $p < 0.05$.

10. DISCUSIÓN

La realización de éste proyecto, empleando una técnica como la PCR en tiempo real, permitió la cuantificación de la carga viral, de los tipos oncogénicos más frecuentes en nuestro país (VPH-16, 18, 31, 33, 45 y 58) (55). Siendo la PCR en tiempo real, una técnica de alta sensibilidad, especificidad, que facilita la detección y cuantificación de un rango dinámico (hasta 10^{22} copias virales) y amplio de copias de ADN viral, fue un método acertado y adecuado para evaluar la asociación de la carga de cada tipo viral, con la presencia de lesiones cervicales (12, 13, 19, 27, 86-88).

Dentro de las características sociodemográficas y factores de riesgo evaluados, el origen fue la única variable que mostró diferencias entre mujeres con y sin lesiones cervicales. Siendo en su mayoría, las mujeres con lesiones provenientes de Bogotá, mientras que la mayoría de mujeres sin lesiones eran de Girardot. Estas diferencias podrían explicarse por hallazgos previamente reportados en relación a la prevalencia de VPH y la distribución tipo específica, encontrándose mayor frecuencia de infección en Bogotá por los tipos 16, 31 y 18, mientras en Girardot por 16, 31, 33 y 45. Adicionalmente se ha encontrado un mayor porcentaje de infecciones múltiples en Girardot en comparación con Bogotá (45.6% vs 26.9) (55) y finalmente se ha encontrado que mujeres provenientes de Girardot presentan una depuración mas rápida de infecciones por tipos de la especie A9 (VPH-16, VPH-31, VPH-33 y VPH-58) (89). Los anteriores hallazgos podrían determinar que las mujeres de Girardot presenten una menor frecuencia de LEI (depuración mas rápida y mayores infecciones múltiples).

En la muestra estudiada, el mayor número de infecciones por VPH se encontró en mujeres con LEI, donde, todas las mujeres con LEI-AG fueron VPH positivas. Lo anterior es consistente con el hecho de que cerca del 99.7% de casos de CC, están asociados a la infección con VPH (50). Estudios previos han demostrado que la prevalencia del VPH en mujeres con anormalidades cervicales, aumenta proporcionalmente a la severidad de las lesiones (6, 47). Sin embargo las prevalencias, encontradas de acuerdo a los hallazgos colposcópicos en este proyecto fueron mayores a las reportadas en la literatura (100% en LEI-AG, 92.86% en LEI-BG y 91.23% sin LEI). En este estudio se incluyeron mujeres que habían sido previamente identificadas con infección por VPH mediante PCR convencional; lo anterior explica la alta prevalencia de VPH utilizando una técnica como PCR en tiempo real en mujeres sin lesiones, aunque una prevalencia variable de infección en mujeres sin LEI ha sido reportada (media=12.6%) (52, 90).

Con respecto al grupo de mujeres sin anormalidades cervicales, se han encontrado prevalencias de infección variables a nivel mundial, con una media de 12.6%, (4, 90-93). Teniendo en cuenta que como criterio de inclusión, se incluyó la detección previa de VPH por PCR convencional, la prevalencia de VPH, detectada con PCR en tiempo

real, reportada en este estudio, es considerablemente mayor a los estudios previos donde la infección no fue criterio para ingresar a los estudios.

Las frecuencias de infecciones múltiples reportadas por estudios previos, realizados en España y China, con mujeres que presentaban lesiones cervicales, son variables (16.3% – 55%) (93, 94). En mujeres sin lesiones, en otros países, se ha descrito hasta un 3.4% de infecciones por múltiples tipos de VPH-AR (95). Respecto a Colombia, un estudio realizado en el 2011, donde evaluaron la prevalencia de infección por VPH en pacientes con lesiones cervicales, encontró infecciones múltiples en el 78.0% de mujeres sin lesiones, y entre 71.4% - 85.7%, en mujeres con lesiones, con una menor frecuencia a mayor grado de severidad de las lesiones (54). Adicionalmente, otros estudios realizados por nosotros han reportado frecuencias de infecciones altas respecto a las descritas a nivel mundial (31, 71).

En este trabajo se determinó una mayor proporción de infecciones múltiples, considerando toda la muestra, y también al diferenciar entre mujeres con y sin lesiones cervicales, en comparación a reportes a nivel mundial, pero comparables con resultados previamente obtenidos en población colombiana. Las diferencias con respecto a las prevalencias de coinfección reportadas en estos estudios de distintas regiones del mundo, podrían deberse a diferencias en el diseño de los estudios (criterios de inclusión), tamaños de muestra más grandes, los métodos de detección de VPH empleados (la PCR en tiempo real es más específica y detecta cargas mínimas al igual que usa cebadores que amplifican productos más pequeños, lo cual facilita la detección en mujeres con muestras más degradadas) (13, 27) y la población en estudio (Factores geográficos, demográficos y clínicos) (95). Estudios previos que han empleado la PCR en tiempo real, han reportado altas frecuencias de infecciones múltiples (96, 97).

Respecto a las prevalencias tipo-específicas, se han reportado diferencias relacionadas con factores geográficos y demográficos (51, 52). Los dos tipos más frecuentes en la población estudiada, (VPH-16 y VPH-18) son responsables del 70% de los casos de CC (16). Los tipos de VPH evaluados en este trabajo, han sido reportados dentro de los 8 tipos VPH-AR más frecuentes alrededor del mundo tanto en mujeres con lesiones como en mujeres sin lesiones (1, 51, 52).

Las cargas virales absolutas fueron más altas en las mujeres que presentaban LEI en comparación con mujeres sin lesiones determinadas tanto por colposcopia como por biopsia. Se observó un aumento en la carga viral de VPH-18 y VPH-33 proporcional al grado de lesión cervical. Lo anterior es consistente con estudios previos que han descrito el efecto de la carga viral en el desarrollo de CC (9, 11).

Se evidenció una asociación entre la carga viral y la frecuencia de lesiones cervicales, para los tipos VPH-16 y VPH-31. Lo anterior es consistente con estudios previos que han revelado el efecto de la carga viral en el desarrollo de CC. La mayoría de los estudios para VPH-16, han encontrado que la carga viral aumenta en relación al grado

de severidad de las lesiones cervicales (9-11, 18, 19, 49, 98-100).

Se encontró también que mujeres con infecciones con carga baja de VPH-16 (< 5.86 copias virales), presentan con mayor frecuencia lesiones cervicales. Estos se relacionan a los obtenidos en el estudio de Manawapat, Stubenrauch y colaboradores en el 2012, encontraron datos similares (101), donde mujeres con infecciones persistentes por VPH-16, tenían una carga viral más baja que aquellas que eliminaron la infección (4.72 copias/célula contra 20 copias/célula $p=0.0003$). Adicionalmente, recientemente se encontró que una carga viral baja es característica de infecciones persistentes detectadas de manera intermitente (102).

Se ha descrito que existe una disminución de la carga viral en mujeres con LEI, explicable por la integración del genoma del VPH que regula a la baja de la síntesis del AND viral, lo que afecta la activación del sistema inmune, y así disminuye la probabilidad de eliminar la infección (101, 103-105). De acuerdo a esto, es probable que se observe un periodo de latencia prolongado, con una carga viral baja, que represente un mayor riesgo para persistencia de la infección y progresión de las lesiones (106).

En este mismo contexto, se encontró que una carga alta de VPH-31 (>5.14 copias virales) se asocia con una menor frecuencia de lesiones cervicales. De tal manera como se mencionó, se ha demostrado que la carga viral es mayor en infecciones transitorias en comparación con infecciones persistentes (101). Esto se correlaciona con el hallazgo de un pico transitorio de carga viral de VPH-31 o una fase de meseta, previo a la depuración de la infección (107); una carga viral alta probablemente fue necesaria para la inducción del sistema inmune, favoreciendo así la eliminación de la infección.

Es probable que estas infecciones por VPH-31 sean transitorias y ésta asociación esté mediada por la respuesta del sistema inmune ante una alta carga viral, siendo capaz de eliminar la infección y por lo tanto no progresen las lesiones precursoras de CC o dichas lesiones regresen espontáneamente (105). Se han reportado pacientes que presentaron una elevación de la carga viral, y posterior a esto, eliminaron la infección. Probablemente ésa carga alta, fue necesaria para inducir el sistema inmunológico y favorecer la eliminación del virus (107). Además, en estudios longitudinales, se ha demostrado que en infecciones transitorias, la carga viral es mayor que en pacientes con infecciones persistentes (96, 101).

Respecto al resto de tipos evaluados en este trabajo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la carga viral y la frecuencia de las lesiones cervicales. Estos resultados son soportados por otros autores, que han encontrado relaciones más claras con respecto a las infecciones con VPH-16 (15, 18, 19, 43, 98, 108). Sin embargo, un estudio realizado por Moberg, Gustavsson *et al.*, reporta que altas cargas de VPH-16, VPH-31 y VPH-18/45, incrementan el riesgo de desarrollar carcinoma in situ (CIS) (21).

En la literatura se encuentran puntos de corte diferentes al categorizar la carga viral. Lo anterior se ha encontrado que depende de la técnica empleada para la cuantificación (PCR en tiempo real, Captura Híbrida II (HCII)) (8) y de la distribución como tal en la población evaluada (10, 21). En un estudio donde se evaluó la correlación clínica de las cargas virales de VPH-16 y VPH-18, se encontró que la carga viral de VPV-16 se relaciona con la severidad de las lesiones cervicales con un umbral de 3.0×10^6 copias/millón de células, permitiendo realizar el diagnóstico en este punto de NIC 2 (18). Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro estudio, con el fin de asegurar la calidad de los análisis, la carga viral fue categorizada de acuerdo a la distribución percentil, y dejando como punto de corte entre cargas bajas y altas 10^6 copias.

Considerando los altos valores de carga viral detectados (hasta 20 logs), aún después de estratificar por resultado de colposcopia y por tipo viral, no se lograron establecer puntos de corte para la carga viral, en razón de identificar mujeres con mayor riesgo de desarrollar lesiones cervicales; de igual manera ésta dificultad se ha presentado en otros estudios (12, 19, 86, 107), donde no logran establecer puntos de corte para carga altas predictivas de enfermedad.

La importancia de este trabajo yace en el uso de una técnica reproducible, sensible y específica (PCR en tiempo real) para la detección y cuantificación de la carga viral (absoluta y normalizada) no solo para un tipo viral, sino para los 6 tipos de VPH de alto riesgo más frecuentes en Colombia. Además, es el primer estudio donde se incluyen regiones con altas prevalencias de infección por VPH, para evaluar la asociación entre la carga viral de VPH con la frecuencia de lesiones cervicales.

Teniendo en cuenta que se trata de un estudio de corte transversal, los resultados que se obtuvieron, corresponden a una valoración única de la carga viral del VPH, por lo tanto no es posible saber si ésta puede predecir el riesgo de progresión de las lesiones y posterior desarrollo de CC. Sin embargo, estos resultados son consistentes con hallazgos reportados en estudios longitudinales (101, 102, 106, 107). Otras limitaciones del estudio son que se desconoce la duración de la infección de las mujeres incluidas, y que se contó con pocas mujeres que presentaban lesiones de alto grado, con lo cual no es posible generalizar los resultados a todas las lesiones precursoras de CC. Es por esto que estudios prospectivos en mujeres con infección por VPH que incluyan la determinación tipo-específica (de acuerdo a la prevalencia local) de la carga viral y mujeres con lesiones precursoras en diferentes grados de severidad, son necesarios para confirmar los resultados del presente estudio.

Los hallazgos de este estudio, en conjunto con otros reportados, apoyan las nociones que se tienen a nivel mundial sobre la implementación de la cuantificación de la carga viral (como marcador de riesgo, tipo-específico para CC), además de citología, para mejorar y fortalecer los programas de tamización de CC, permitiendo identificar mujeres VPH positivas, que presentan un mayor riesgo de desarrollar lesiones

precursoras, y además identificar mujeres aún sin anomalías cervicales, para predecir el inicio de un proceso neoplásico.

11. CONCLUSIONES

- Los tipos más prevalentes en la población de este estudio, fueron VPH-18, VPH-16 en mujeres con lesiones, y en mujeres sin lesiones, además de éstos dos, VPH-31.
- Aunque la distribución de la carga viral de los seis tipos de VPH evaluados, no fue diferente entre los dos grupos de mujeres, al analizar entre mujeres sin anormalidad, con LEI-BG y LEI-AG, la carga de VPH-31 fue menor en mujeres con lesiones de alto grado.
- Se observó un aumento en la carga viral de VPH-18 y VPH-33 proporcional al grado de lesión cervical, determinadas tanto por colposcopia como por biopsia.
- En este estudio se identificó una asociación entre la carga viral del VPH, con la presencia de lesiones cervicales. Sin embargo, dicha asociación fue tipo-específica, puesto que fue estadísticamente significativa para los tipos VPH-16 y VPH-31. Encontrando una mayor asociación entre la presencia de lesiones cervicales y cargas virales bajas de VPH-16, y cargas altas de VPH-31. Así como estudios previos longitudinales han reportado, ésta asociación podría relacionarse con el tiempo de duración de la infección y con la respuesta del sistema inmune ante cargas virales altas o bajas. De ésta manera, cuantificar la carga viral podría mejorar el valor predictivo de la detección de VPH, aunque, el alcance de la cuantificación dependerá del tipo viral detectado.

12. PERSPECTIVAS

Todos los resultados del presente estudio, están consolidados en un artículo científico, el cual ha sido publicado en la revista BMC Cancer, el día 05 de Marzo del presente año (Anexo 3).

Con la realización de este estudio, surgió interés por otros aspectos relacionados con el CC y la infección por VPH, que merecen ser objeto de nuevas investigaciones.

En el caso de infecciones múltiples, pueden encontrarse diferentes combinaciones de tipos virales, unas más prevalentes que otras. Sin embargo, no se conoce si en una población determinada hay predominio de ciertas agrupaciones de tipos virales, como tampoco si factores sociodemográficos, o factores de riesgo, se asocian con una agrupación específica.

Adicionalmente, el análisis de la dinámica de la carga viral del VPH en el tiempo, permitiría conocer el comportamiento de ésta, y aportar información para determinar si una infección por VPH persistirá o se eliminará. Conociendo la dinámica de la carga viral, podría establecerse su relación con el desarrollo, la presencia y la regresión de lesiones precursoras y CC. De ésta manera, se podría evaluar la utilidad de la cuantificación de la carga viral del VPH, para predecir el desarrollo de CC o de lesiones precursoras.

13. CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	2012					2013												2014							2015				
	MESES																												
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5
Elaboración anteproyecto	■	■																											
Estandarización condiciones y protocolos de RT-PCR para cada tipo viral y <i>HMBS</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■																			
Construcción curvas de calibración RT-PCR, para cada tipo viral y <i>HMBS</i>									■	■	■	■	■	■															
Cuantificación carga viral muestras														■	■	■													
Digitación resultados en base de datos														■	■	■													
Plan de análisis																	■	■											
Procesamiento de la información																	■	■	■										
Escritura y envío de artículo																		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Análisis e informe final																						■	■						
Revisión, correcciones y entrega																													■
Presentación Trabajo de Grado																													■

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348(6):518-27.
2. de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecologic oncology*. 2012;126(2):304-11.
3. Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus research*. 2002;89(2):183-90.
4. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F12-23.
5. Marks M, Gravitt PE, Utaipat U, Gupta SB, Liaw K, Kim E, et al. Kinetics of DNA load predict HPV 16 viral clearance. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;51(1):44-9.
6. Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez F, Molano M, Posso H, Moreno V, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *British journal of cancer*. 2009;100(7):1184-90.
7. Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlee F, et al. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC infectious diseases*. 2010;10:326.
8. Hernández-Hernández DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecologic oncology*. 2003;90(2):310-7.
9. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000;355(9222):2194-8.
10. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qvarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000;355(9222):2189-93.
11. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *British journal of cancer*. 2005;92(5):891-4.
12. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British journal of cancer*. 2005;92(12):2195-200.
13. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3221-8.
14. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, Biri A, Erdem O, Acar A, et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *European journal of gynaecological oncology*. 2005;26(6):632-5.
15. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study G. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(2):102-7.
16. Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer biology & therapy*. 2011;11(3):295-306.
17. Abba MC, Mouron SA, Gomez MA, Dulout FN, Golijow CD. Association of human papillomavirus viral load with HPV16 and high-grade intraepithelial lesion. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2003;13(2):154-8.
18. Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boubli L, Olive D, et al. Significance of HPV 16 and 18 viral load quantitation in women referred for colposcopy. *J Med Virol*. 2012;84(2):306-13.
19. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol*. 1999;37(4):1030-4.

20. Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Wheeler CM, Galloway DA, Mao C, et al. Human papillomavirus type 18 DNA load and 2-year cumulative diagnoses of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(3):153-61.
21. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;112(5):854-9.
22. Boulet GA, Horvath CA, Berghmans S, Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(4):810-7.
23. Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Thinkhamrop J, Yuenyao P, et al. Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2007;8(2):279-82.
24. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskeva E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecologic oncology*. 2007;104(1):232-46.
25. Jenkins A, Allum AG, Strand L, Aakre RK. Simultaneous detection, typing and quantitation of oncogenic human papillomavirus by multiplex consensus real-time PCR. *Journal of virological methods*. 2013;187(2):345-51.
26. Jentschke M, Soergel P, Lange V, Kocjan B, Doerk T, Luyten A, et al. Evaluation of a new multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of human papillomavirus infections in a referral population. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2012;22(6):1050-6.
27. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Pawlita M, et al. Viral load of high-risk human papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(3):406-14.
28. Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez F, Molano M, Posso H, Moreno V, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *British journal of cancer*. 2009;100(7):1184-90.
29. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
30. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
31. Soto-De Leon S, Camargo M, Sanchez R, Munoz M, Perez-Prados A, Purroy A, et al. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. *PLoS One*. 2011;6(2):e14705.
32. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
33. Salud Omdl. Control integral del cáncer cervicouterino. *Guía de prácticas esenciales Colombia 2007*. p. 292.
34. Salud OPdl. Estrategia y plan de acción regional para la prevención y el control del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington, D.C. : OPS; 2008. p. 1-24.
35. Ministerio de Salud y Protección Social- Instituto Nacional de Cáncerología E. Plan Decenal para el Control del Cáncer en Colombia 2012-2021. In: Colombia, editor. Bogotá, D.C.2012-2021. p. 1-124.
36. Murillo R. [Cervical cancer control in Colombia: achievements and challenges of cytology based programs]. *Biomedica*. 2008;28(4):467-70.
37. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K29-41.
38. Boyle P, Levin B. *World cancer report 2008*. Research Against Cancer: World cancer report In: Lyon, editor. 2008. p. 1-260.
39. Piñeros M, Cendales R, Murillo R, C W, S T. Cobertura de la Citología de Cuello Uterino y Factores Relacionados en Colombia, 2005. *Revista de Salud Pública*. 2007;9(3):327-41.
40. Coutlee F, Rouleau D, Ferenczy A, Franco E. The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(2):83-91.
41. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;32 Suppl 1:S43-51.
42. Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003(31):35-40.

43. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, et al. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;121(12):2787-93.
44. Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol*. 2007;20(2):256-66.
45. Coutlee F, Mayrand MH, Roger M, Franco EL. Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids. *Public Health Genomics*. 2009;12(5-6):308-18.
46. Santos AL, Derchain SF, Martins MR, Sarian LO, Martinez EZ, Syrjanen KJ. Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. *Sao Paulo Med J*. 2003;121(6):238-43.
47. Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, Zhang Y, He Y. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2006;35(3):264-9.
48. Tabora N, Ferrera A, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(5):843-6.
49. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecologic oncology*. 2007;106(3):549-57.
50. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2006;2006 Suppl:40470.
51. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011;128(4):927-35.
52. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;131(10):2349-59.
53. Murillo R, Molano M, Martinez G, Mejia JC, Gamboa O. HPV prevalence in Colombian women with cervical cancer: implications for vaccination in a developing country. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2009;2009:653598.
54. Garcia DA, Cid-Arregui A, Schmitt M, Castillo M, Briceno I, Aristizabal FA. Highly Sensitive Detection and Genotyping of HPV by PCR Multiplex and Luminex Technology in a Cohort of Colombian Women with Abnormal Cytology. *Open Virol J*. 2011;5:70-9.
55. Camargo M, Soto-De Leon SC, Sanchez R, Perez-Prados A, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia. *Ann Epidemiol*. 2011;21(3):204-13.
56. Lewis M. Situational Analysis of cervical cancer in Latin America & Caribbean. 2004:1-40.
57. Organization PAH. Abordaje integral para la prevención y el control del cáncer cervicouterino. 2011.
58. Bosch X, Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecologic oncology*. 2006;103(1):21-4.
59. Lopez A, Lizano M. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano: La historia que no termina. 2006:31-57.
60. Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A, et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(3):897-901.
61. Ortiz R, Uribe C, Díaz L, Dangond Y. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino . *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* . 2004;55(2):146-60.
62. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet*. 2003;361(9376):2217-25.
63. Safaeian M, Solomon D. Cervical Cancer Prevention- Cervical Screening: Science in Evolution. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2009;34(4):1-20.
64. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*. 2002;287(16):2114-9.
65. Galvis V, Bustamante M, Sarmiento C. Norma técnica para la detección temprana del cáncer de cuello uterino y guía de atención de lesiones preneoplásicas de cuello uterino 2001:1-15.

66. Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K62-7.
67. Scarinci IC, Garcia FA, Kobetz E, Partridge EE, Brandt HM, Bell MC, et al. Cervical cancer prevention: new tools and old barriers. *Cancer*. 2010;116(11):2531-42.
68. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006;11:2286-302.
69. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451-60.
70. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kuhndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2004;30(4):302-8.
71. Soto-De Leon SC, Camargo M, Sanchez R, Leon S, Urquiza M, Acosta J, et al. Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2009;15(1):100-2.
72. Liu J, Rose B, Huang X, Liao G, Carter J, Wu X, et al. Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in high- versus low-incidence regions. *Gynecologic oncology*. 2004;94(3):803-10.
73. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/63-70.
74. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1304-10.
75. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003(31):80-8.
76. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecologic oncology*. 2004;92(3):873-80.
77. Munoz M, Camargo M, Soto-De Leon SC, Rojas-Villarraga A, Sanchez R, Jaimes C, et al. The diagnostic performance of classical molecular tests used for detecting human papillomavirus. *Journal of virological methods*. 2012;185(1):32-8.
78. Ramírez VG, Bustamante MA, Sarmiento CA. Norma Técnica para la Detección Temprana del Cáncer de Cuello Uterino y Guía de Atención de Lesiones Preneoplásicas de Cuello Uterino. Colombia2000. p. 1-26.
79. Boicea A, Patrascu A, Surlin V, Iliescu D, Schenker M, Chiutu L. Correlations between colposcopy and histologic results from colposcopically directed biopsy in cervical precancerous lesions. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(3 Suppl):735-41.
80. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673-80.
81. . Available from: <http://web.uri.edu/gsc/real-time-pcr/>.
82. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
83. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:85.
84. Resolución N008430 de 1993. 8430. Colombia1993.
85. Trabajo Md. Decreto 3068 del 2013. In: Colombia, editor. 2013.
86. Al-Awadhi R, Chehadeh W, Al-Jassar W, Al-Harmi J, Al-Saleh E, Kapila K. Viral load of human papillomavirus in women with normal and abnormal cervical cytology in Kuwait. *Journal of infection in developing countries*. 2013;7(2):130-6.
87. Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *Journal of virological methods*. 2003;112(1-2):23-33.
88. Tábota N, Annabelle F, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG. High HPV 16 Viral Load is Associated with Increased Cervical Dysplasia in Honduran Women. *Am JTrop Med Hyg* . 2008;78(5):843-6.

89. Soto-De Leon SC, Del Rio-Ospina L, Camargo M, Sanchez R, Moreno-Perez DA, Perez-Prados A, et al. Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. *BMC infectious diseases*. 2014;14:395.
90. Poljak M, Seme K, Maver PJ, Kocjan BJ, Cuschieri KS, Rogovskaya SI, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Central and Eastern Europe. *Vaccine*. 2013;31 Suppl 7:H59-70.
91. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(7):453-9.
92. Moore RA, Ogilvie G, Fornika D, Moravan V, Brisson M, Amirabbasi-Beik M, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in 5,000 British Columbia women--implications for vaccination. *Cancer causes & control : CCC*. 2009;20(8):1387-96.
93. Selva L, Gonzalez-Bosquet E, Rodriguez-Plata MT, Esteva C, Sunol M, Munoz-Almagro C. Detection of human papillomavirus infection in women attending a colposcopy clinic. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;64(4):416-21.
94. Zhang R, Velicer C, Chen W, Liaw KL, Wu EQ, Liu B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grades 1 or worse among 4215 Chinese women in a population-based study. *Cancer epidemiology*. 2013;37(6):939-45.
95. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(1):68-72.
96. Xi LF, Hughes JP, Edelstein ZR, Kiviat NB, Koutsky LA, Mao C, et al. Human Papillomavirus (HPV) type 16 and type 18 DNA Loads at Baseline and Persistence of Type-Specific Infection during a 2-year follow-up. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(11):1789-97.
97. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, et al. Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(5):1458-64.
98. Zerbini M, Venturoli S, Cricca M, Gallinella G, De Simone P, Costa S, et al. Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(5):377-80.
99. Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, Bulkman NW, van Tellingene JE, Meijer CJ, et al. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(2):381-6.
100. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(5):1187-93.
101. Manawapat A, Stubenrauch F, Russ R, Munk C, Kjaer SK, Iftner T. Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *American journal of cancer research*. 2012;2(2):192-203.
102. Winer RL, Xi LF, Shen Z, Stern JE, Newman L, Feng Q, et al. Viral load and short-term natural history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult women. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;134(8):1889-98.
103. Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllenstein UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *Journal of clinical pathology*. 2006;59(5):513-7.
104. Nakagawa M, Stites DP, Patel S, Farhat S, Scott M, Hills NK, et al. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(2):595-8.
105. Brenna SM, Syrjanen KJ. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Sao Paulo Med J*. 2003;121(3):128-32.
106. van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002;98(4):590-5.
107. Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mouglin C, Pretet JL. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2006;35(3):270-7.

108. Chan PK, Cheung JL, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu SS, et al. Profile of viral load, integration, and E2 gene disruption of HPV58 in normal cervix and cervical neoplasia. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(6):868-75.

15. ANEXOS

ANEXO 1. MANUAL DE CODIFICACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	NOMBRE	INDICADOR	CODIFICACIÓN	CÓDIGO DE EXCEPCIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	OBJETIVO ESPECÍFICO
Fecha ingreso al proyecto	FECHAING	Cuestionario	DDMMAAAA	. : Sin dato	Intervalo	1
Número de historia clínica	HC	Cuestionario	#	. : Sin dato	Razón	1
Edad	EDAD	Cuestionario	#	. : Sin dato	Razón	1
Edad	EDADCAT	Cuestionario	1: <30 años, 2: 30-40 años, 3: >40 años	. : Sin dato	Nominal	1
Origen	ORIGEN	Cuestionario	1: Bogotá , 2: Chaparral, 3: Girardot	. : Sin dato	Nominal	1
Etnia	ETNIA	Cuestionario	1: Blanca, 2: Mestiza, 3: Negra, 4: Indígena, 5: Otra.	. : Sin dato	Nominal	1
Estado civil	EC	Cuestionario	1: Soltera, 2: Unión Libre, 3: Casada, 4: Separada, 5: Viuda.	. : Sin dato	Nominal	1
Estado civil	EC	Cuestionario	1: Soltera, 2: Unión Libre, 3: Casada, 4: Separada, 5: Viuda.	. : Sin dato	Nominal	1
Ingresos mensuales	ING	Cuestionario	1: ≤ SMMLV 2: > SMMLV	. : Sin dato	Nominal	1
Nivel de escolaridad	ESCOL	Cuestionario	1: Analfabeta, 2: Primaria, 3: Secundaria, 4: Técnica, 5: Universitaria	. : Sin dato	Nominal	1
Régimen de afiliación a salud	REGAFILIA	Cuestionario	1: Vinculado-Subsidiado, 2: Contributivo-Particular	. : Sin dato	Nominal	1
Consumo de cigarrillo	FUMA	Cuestionario	0: No, 1: Sí.	. : Sin dato	Nominal	2
Edad primera relación sexual	IRS	Cuestionario	#	. : Sin dato	Razón	2

Edad primera relación sexual	IRSCAT	Cuestionario	1:<16 años, 2:16-19 años, 3: >19 años	. : Sin dato	Nominal	2
Número de compañeros sexuales	CS	Cuestionario	1: 1, 2: 2-3, 3: Más de 3.	. : Sin dato	Razón	2
Método de planificación	PLANIF	Cuestionario	0: Sin método, 1: Barrera, 2: Hormonal, 3: Inyectables, 5: Quirúrgico.	. : Sin dato	Nominal	2
Número de partos	PARTOS	Cuestionario	0: Ninguno, 1: 1-2, 2: 3-4, 3: >4.	. : Sin dato	Nominal	2
Número de gestaciones	GESTA	Cuestionario	0: Ninguna, 1: 1-2, 2: 3-4, 3: >4.	. : Sin dato	Nominal	2
Número de Abortos	ABORTO	Cuestionario	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	2
Menopausia	MENOP	Cuestionario	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	2
Antecedente infección de transmisión sexual	ITS	Cuestionario	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	2
Resultado citología	CITO	Reporte de citología, de acuerdo al Sistema Bethesda: Negativa para lesiones o malignidad; ASC-US; ASC-H; LEI BG; HSIL; carcinoma de células escamosas, células glandulares atípicas; adenocarcinoma in situ.	0: Normal, 1: Anormal	. : Sin dato	Nominal	6
Resultado Colposcopia	COLPO	Reporte de colposcopia	0: Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad, 1: LEI BG, 2: LEI AG.	. : Sin dato	Ordinal	6
Lesión cervical	LESION	Reporte de colposcopia	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	6
Resultado VPH	VPH	Detección de ADN viral de al menos un tipo viral por RT-PCR.	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3
Infección VPH-16	VPH16	Detección de ADN de VPH-16 por RT-PCR	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3
Infección VPH-18	VPH18	Detección de ADN de VPH-18 por RT-PCR	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3

Infección VPH-31	VPH31	Detección de ADN de VPH-31 por RT-PCR	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3
Infección VPH-33	VPH33	Detección de ADN de VPH-33 por RT-PCR	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3
Infección VPH-45	VPH45	Detección de ADN de VPH-45 por RT-PCR	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3
Infección VPH-58	VPH58	Detección de ADN de VPH-58 por RT-PCR	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3
Coinfección	COINF	Detección por RT-PCR de 2 o más tipos virales.	0: No, 1: Si.	. : Sin dato	Nominal	3
Número de tipos virales identificados	NTIPOSCAT	Detección por RT-PCR	1: ≤ 3 tipos, 2: >3 tipos	. : Sin dato	Razón	3
Número de tipos virales identificados	NTIPOS	Detección por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	3
Número de copias de HMBS	HMBS	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	4
Carga viral absoluta de VPH-16	CV16A	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral normalizada de VPH-16	CV16N	(Número de copias virales VPH-16)/((Número de copias HMBS) ²)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral absoluta de VPH-18	CV18A	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral normalizada de VPH-18	CV18N	(Número de copias virales VPH-18)/((Número de copias HMBS) ²)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral absoluta de VPH-31	CV31A	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral normalizada de VPH-31	CV31N	(Número de copias virales VPH-31)/((Número de copias HMBS) ²)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral absoluta de VPH-33	CV33A	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	4-5

Carga viral normalizada de VPH-33	CV33N	(Número de copias virales VPH-33)/((Número de copias HMBS)2)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral absoluta de VPH-45	CV45A	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral normalizada de VPH-45	CV45N	(Número de copias virales VPH-45)/((Número de copias HMBS)2)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral absoluta de VPH-58	CV58A	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral normalizada de VPH-58	CV58N	(Número de copias virales VPH-58)/((Número de copias HMBS)2)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral absoluta total	CVA	(Suma de cargas absolutas de tipos detectados)/(Número de tipos virales detectados)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral normalizada total	CVN	(Suma de cargas normalizadas de tipos detectados)/(Número de tipos virales detectados)	#	. : Sin dato	Razón	4-5
Carga viral absoluta VPH-16 categorizada	CVA16CAT	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	0: negativa ≤ 0 , 1: baja $0 < CV \leq 5.86$ copias, 2: alta > 5.86 copias.	. : Sin dato	Nominal	5-6
Carga viral absoluta VPH-18 categorizada	CVA18CAT	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	0: negativa ≤ 0 , 1: baja $0 < CV \leq 5.95$ copias, 2: alta > 5.95 copias.	. : Sin dato	Nominal	5-6
Carga viral absoluta VPH-31 categorizada	CVA31CAT	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	0: negativa ≤ 0 , 1: baja $0 < CV \leq 5.14$ copias, 2: alta > 5.95 copias.	. : Sin dato	Nominal	5-6
Carga viral absoluta VPH-33 categorizada	CVA33CAT	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	0: negativa ≤ 0 , 1: baja $0 < CV \leq 4.60$ copias, 2: alta > 5.14 copias.	. : Sin dato	Nominal	5-6
Carga viral absoluta VPH-45 categorizada	CVA45CAT	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	0: negativa ≤ 0 , 1: baja $0 < CV \leq 5.98$ copias, 2: alta > 5.98 copias.	. : Sin dato	Nominal	5-6

Carga viral absoluta VPH-58 categorizada	CVA58CAT	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	0: negativa ≤ 0 , 1: baja $0 < CV \leq 5.97$ copias, 2: alta > 5.97 copias.	. : Sin dato	Nominal	5-6
Carga viral absoluta total categorizada	CVACAT	Número de copias cuantificadas por RT-PCR	0: negativa ≤ 0 , 1: baja $0 < CV \leq 5.94$ copias, 2: alta > 5.94 copias.	. : Sin dato	Nominal	5-6

Abreviaciones : SMMLV: salario mínimo mensual legal vigente; ASC-US: atypical squamous cells of undetermined significance (células escamosas atípicas de significado incierto); ASC-H: atypical squamous cells cannot exclude HSIL (células escamosas atípicas sugestivas de alto grado); LEI-BG: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; LEI-AG: lesión intraepitelial de alto grado; VPH: virus de papiloma humano; HMBS: hydroxymethylbilane synthase; RT-PCR: real time polymerase chain reaction; CV: carga viral.

ANEXO 2. CARTAS COMITÉS DE ÉTICA

Bogotá D.C., Abril 13 de 2007
CEHE - 009

Esther Hernández

Doctor
MAURICIO URQUIZA
Coordinador GF Virología
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
La Ciudad

HOSPITAL DE ENGATIVÁ II NIVEL
Para: PARTICULAR
R: 21589 24/04/2007-07:55
Folios: 0 Anexos: 0
NOTIFICACION -ENVIO

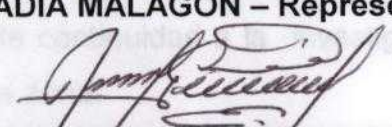
Respetada Doctor,

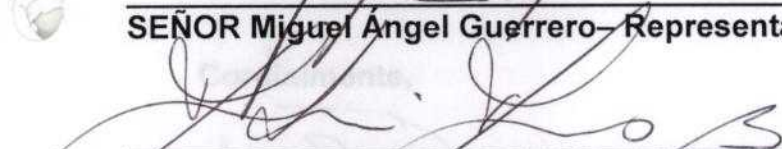
Reciba un cordial saludo:


Después de su amplia y clara exposición sobre los resultados del estudio anterior practicado a nivel del Hospital de Engativá y estrechamente relacionado con el estudio que solicita practicar actualmente el comité de ética hospitalaria del hospital de Engativá decide avalar la realización de dicha investigación.

Agradecemos la atención prestada. Cordialmente,


DRA. NADIA MALAGON – Representante por Medicina


SEÑOR Miguel Ángel Guerrero – Representante Asociación de Usuarios


SRA Adriana Moreno – Representante Asociación de Usuarios


Dr. Julián Carvajal – Representante de la gerencia



HOSPITAL FONTIBÓN
 Empresa Social del Estado
 Carrera 104 N° 20C - 21
 Teléfonos 5425232 – 4184447 – 2980443
 www.hospitalfontibon.gov.co
 Email:fontibon@esebogota.gov.co



**ALCALDIA MAYOR
 DE BOGOTA D. C.
 SECRETARIA DE
 SALUD DE BOGOTA**

Bogotá, Febrero 29 de 2008.
 SP IPS 317

Doctor
MAURICIO URQUIZA
 Coordinador GF Virología
Fundación Instituto De Inmunología de Colombia
 Bogotá D.C.

Cordial Saludo.

Después de evaluar la propuesta de participar en el proyecto **“COMPARACION DE LA PRUEBA SEROLOGICA DE ELISA DE ANTICUAERPOS ANTI-VPH CON LA CITOLOGIA Y CON LA DETECCION DEL ADN VIRAL, AL SER UTILIZADAS COMO PRUEBAS DE TAMIZACION PARA DETECCION DE INFECCION PERSISTETE POR EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO”**, propuesto por ustedes, el comité de ética hospitalaria del Hospital Fontibón decide avalar la realización de dicha investigación.

Atentamente,

Liliana Prieto

DRA. LILIANA PRIETO- Representante por Medicina

Ana Maria Jimenez

SEÑORA ANA MARIA JIMENEZ – Representante de enfermería

German Romero

SEÑOR GERMAN ROMERO – Representante Asociación de Usuarios

Jose Francisco Amaya

SEÑOR JOSE FRANCISCO AMAYA - Representante Comunidad

Aura Pilar Rincon

AURA PILAR RINCON - Representante Comunidad

Preparó: Francy Yaneth Medina Sanabria – Referente Programa de Detección Precoz de Cáncer Cervicouterino.

Revisó: María del Pilar Saenz – Referente Ámbito IPS.

Aprobó: Angela Lucia Velandia – Coordinadora de Salud Pública *angel*



GOBIERNO DE LA CIUDAD

**“TRABAJAMOS POR EL BIENESTAR DE
 NUESTROS USUARIOS”**


CONSIDERACIONES
 026-00 Bogotá, Colombia
 1-2 / 310 8920 Fax: (57-1)3244871 Ext. 135 - 134108
 A.A. 33086
 www.fcc.org.co

Hospital Bosa II Nivel E.S.E, Agosto 25 de 2008

COMITÉ DE ETICA

INTEGRANTES:

Dr. MEDARDO CUELLO. REPRESENTANTE DE PROFESIONALES
ING. IRMA BERMUDEZ. Coordinadora Oficina de AOUDI
Sra. INES PINEDA. Alianza de Usuario
SRA ISABEL TORO. Asociación Usuarios
SRA CLARA GOMEZ. Asociación de Usuarios
SRA ROSALBA PINZON. Representante de Copaco
LIC. ADRIANA PINILLA. Trabajadora Social
LIC. MARIA EUGENIA MURCIA. Secretaria


SRA. INES PINEDA
Verificación de Courum


SRA. ISABEL TORO
Asociación de Usuarios

- Lectura Acta Anterior

Aprobación convenio de investigación VIRUS PAPILOMA HUMANO en mujeres, en el cual se realiza colposcopia, con citología que presentan anormalidades se realiza prueba anticuerpos Anti-VPH por ELISA y la detección del DNA viral de alto riesgo, para prevención de cáncer de cuello uterino con su respectiva tipificación por medio de técnica PCR. En el cual se realizan tres exámenes total mente gratuitos (ELISA, PCR, COLPOSCOPIA), Los cuales orientan a un mejor diagnostico ginecológico. Para saber que factor de riesgo existe en cada una de nuestras pacientes.

- 
• PROPOSICIONES


LIC. MARIA EUGENIA MURCIA
Secretaria

- 
• VARIOS.

Se realiza la lectura y explicación del convenio con la Fundación Instituto De Inmunológica FIDIC.

En la cual todos los integrantes del comité se encuentran de acuerdo con el programa teniendo en cuenta que es una gran ayuda diagnóstica, para la prevención de patología cervical como lo es el cáncer de cuello uterino. En nuestras usuarias y la población mas vulnerable en nuestra localidad. Acogiéndonos a las dediciones y peticiones de la FUNDACION FIDIC.

ASISTENTES,

Doctora
SANDRA LEON GARCIA

Medardo Cuello

DR. MEDARDO CUELLO
Ginecólogo Colposcopista

Irma Bermudez
ING. IRMA BÉRMUDEZ
Coordinadora Oficina de OAUDI

REP: REMISION CONVENIO

Ines Pineda

SRA. INES PINEDA
Representante Alianza de Usuarios

Isabel Toro
SRA. ISABEL TORO
Asociación de Usuarios

Con un cordial saludo, para su conocimiento y fines pertinentes anexo original del Convenio de Cooperación para el Desarrollo del proyecto, el anterior se encuentra debidamente firmado por esta Gerencia.

Clara Ines Gomez

SRA. CLARA GOMEZ.
Asociación de usuarios

Rosalba Pinzon

SRA ROSALBA PINZON.
Representante de Copaco

JOSE GUILLERMO RAMIREZ QUINCHE

Adriana Pinilla

LIC. ADRIANA PINILLA.
Trabajadora Social

Maria Eugenia Murcia

LIC. MARIA EUGENIA MURCIA
- Secretaria

Re

"ENTRE TODOS POR LA SALUD DE TODOS"

SEDE HOSPITAL: CALLE 84 D SUR No. 79 C 00 CONM 77843394000 TELEFAX 7801500

E-MAIL: BOG@bogota.gov.co - BOG@bogota.gov.co

SEDE ADMINISTRATIVA: CALLE 80ª No. 5804A SUR CONM 7784100 BOGOTÁ-COLOMBIA


BOGOTÁ
GOBIERNO DE LA CIUDAD

Hospital Bosa II Nivel E.S.E, Agosto 25 de 2008

COMITÉ DE ETICA

INTEGRANTES:

Dr. MEDARDO CUELLO. REPRESENTANTE DE PROFESIONALES
ING. IRMA BERMUDEZ. Coordinadora Oficina de AOUDI
Sra. INES PINEDA. Alianza de Usuario
SRA ISABEL TORO. Asociación Usuarios
SRA CLARA GOMEZ. Asociación de Usuarios
SRA ROSALBA PINZON. Representante de Copaco
LIC. ADRIANA PINILLA. Trabajadora Social
LIC. MARIA EUGENIA MURCIA. Secretaria



SRA. INES PINEDA
Verificación de Courum


SRA. ISABEL TORO
Asociación de Usuarios

- Lectura Acta Anterior

Aprobación convenio de investigación VIRUS PAPILOMA HUMANO en mujeres, en el cual se realiza colposcopia, con citología que presentan anormalidades se realiza prueba anticuerpos Anti-VPH por ELISA y la detección del DNA viral de alto riesgo, para prevención de cáncer de cuello uterino con su respectiva tipificación por medio de técnica PCR. En el cual se realizan tres exámenes total mente gratuitos (ELISA, PCR, COLPOSCOPIA), Los cuales orientan a un mejor diagnostico ginecológico. Para saber que factor de riesgo existe en cada una de nuestras pacientes.

- 
• PROPOSICIONES


LIC. MARIA EUGENIA MURCIA
Secretaria

- 
• VARIOS.

Se realiza la lectura y explicación del convenio con la Fundación Instituto De Inmunológica FIDIC.

En la cual todos los integrantes del comité se encuentran de acuerdo con el programa teniendo en cuenta que es una gran ayuda diagnóstica, para la prevención de patología cervical como lo es el cáncer de cuello uterino. En nuestras usuarias y la población mas vulnerable en nuestra localidad. Acogiéndonos a las dediciones y peticiones de la FUNDACION FIDIC.

ASISTENTES,

Doctora
SANDRA LEON GARCIA

Medardo Cuello

DR. MEDARDO CUELLO
Ginecólogo Colposcopista

Irma Bermudez
ING. IRMA BÉRMUDEZ
Coordinadora Oficina de OAUDI

REP: REMISION CONVENIO

Ines Pineda

SRA. INES PINEDA
Representante Alianza de Usuarios

Isabel Toro
SRA. ISABEL TORO
Asociación de Usuarios

Con un cordial saludo, para su conocimiento y fines pertinentes anexo original del Convenio de Cooperación para el Desarrollo del proyecto, el anterior se encuentra debidamente firmado por esta Gerencia.

Clara Ines Gomez

SRA. CLARA GOMEZ.
Asociación de usuarios

Rosalba Pinzon

SRA ROSALBA PINZON.
Representante de Copaco

JOSE GUILLERMO RAMIREZ QUINCHE

Adriana Pinilla

LIC. ADRIANA PINILLA.
Trabajadora Social

Maria Eugenia Murcia

LIC. MARIA EUGENIA MURCIA
- Secretaria

Re

"ENTRE TODOS POR LA SALUD DE TODOS"

SEDE HOSPITAL: CALLE 60 D SUR No. 79 C 00 CONM 77843394000 TELEFAX 7801500

E-MAIL: BOG@bogota.gov.co - BOG@bogota.gov.co

SEDE ADMINISTRATIVA: CALLE 60ª No. 5804A SUR CONM 7784100 BOGOTÁ-COLOMBIA

BOGOTÁ
GOBIERNO DE LA CIUDAD



HOSPITAL FONTIBÓN
 Empresa Social del Estado
 Carrera 104 N° 20C - 21
 Teléfonos 5425232 – 4184447 – 2980443
 www.hospitalfontibon.gov.co
 Email:fontibon@esebogota.gov.co



**ALCALDIA MAYOR
 DE BOGOTÁ D. C.
 SECRETARÍA DE
 SALUD DE BOGOTÁ**

Bogotá, Febrero 29 de 2008.
 SP IPS 317

Doctor
MAURICIO URQUIZA
 Coordinador GF Virología
Fundación Instituto De Inmunología de Colombia
 Bogotá D.C.

Cordial Saludo.

Después de evaluar la propuesta de participar en el proyecto **“COMPARACION DE LA PRUEBA SEROLOGICA DE ELISA DE ANTICUAEERPOS ANTI-VPH CON LA CITOLOGIA Y CON LA DETECCION DEL ADN VIRAL, AL SER UTILIZADAS COMO PRUEBAS DE TAMIZACION PARA DETECCION DE INFECCION PERSISTETE POR EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO”**, propuesto por ustedes, el comité de ética hospitalaria del Hospital Fontibón decide avalar la realización de dicha investigación.

Atentamente,

Liliana Prieto

DRA. LILIANA PRIETO- Representante por Medicina

Ana Maria Jimenez

SEÑORA ANA MARIA JIMENEZ – Representante de enfermería

German Romero

SEÑOR GERMAN ROMERO – Representante Asociación de Usuarios

Jose Francisco Amaya

SEÑOR JOSE FRANCISCO AMAYA - Representante Comunidad

Aura Pilar Rincon

AURA PILAR RINCON - Representante Comunidad

Preparó: Francy Yaneth Medina Sanabria – Referente Programa de Detección Precoz de Cáncer Cervicouterino.

Revisó: María del Pilar Saenz – Referente Ámbito IPS.

Aprobó: Angela Lucia Velandia – Coordinadora de Salud Pública *angel*

**BOG+ BOGOTÁ
 POSITIVA**

GOBIERNO DE LA CIUDAD

**“TRABAJAMOS POR EL BIENESTAR DE
 NUESTROS USUARIOS”**

BOGOTÁ, COLOMBIA
 Carrera 104 N° 20C - 21 / 310 8920 Fax: (57-1)3244871 Ext. 135 - 134108
 A.A. 33086
 www.fundacioninstituto.org

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions

Luisa Del Río-Ospina^{1,2}, Sara Cecilia Soto-De León^{1,3}, Milena Camargo^{1,3}, Darwin Andrés Moreno-Pérez^{1,3}, Ricardo Sánchez^{1,4}, Antonio Pérez-Prados⁵, Manuel Elkin Patarroyo^{1,4} and Manuel Alfonso Patarroyo^{1,2*}

Abstract

Background: Analysing human papillomavirus (HPV) viral load is important in determining the risk of developing cervical cancer (CC); most knowledge to date regarding HPV viral load and cervical lesions has been related to HPV-16. This study evaluated the association between the viral load of the six most prevalent high-risk viral types in Colombia and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) frequency.

Methods: 114 women without CIN and 59 women having CIN confirmed by colposcopy, all of them positive by conventional PCR for HPV infection in the initial screening, were included in the study. Samples were tested for six high-risk HPV types to determine viral copy number by real-time PCR. Crude and adjusted odds ratios (OR_a) were estimated for evaluating the association between each viral type's DNA load and the risk of cervical lesions occurring.

Results: The highest viral loads were identified for HPV-33 in CIN patients and for HPV-31 in patients without lesions (9.33 HPV copies, 2.95 interquartile range (IQR); 9.41 HPV copies, 2.58 IQR). Lesions were more frequent in HPV-16 patients having a low viral load (3.53 OR_a, 1.16–10.74 95%CI) compared to those having high HPV-16 load (2.62 OR_a, 1.08–6.35 95%CI). High viral load in HPV-31 patients was associated with lower CIN frequency (0.34 OR_a, 0.15–0.78 95%CI).

Conclusions: An association between HPV DNA load and CIN frequency was seen to be type-specific and may have depended on the duration of infection. This analysis has provided information for understanding the effect of HPV DNA load on cervical lesion development.

Keywords: Cervical intraepithelial neoplasia, HR-HPV, HPV DNA load, RT-PCR

Background

The main factor for developing cervical cancer (CC) lies in persistent infection by at least one viral type of high-risk human papillomavirus (HR-HPV). Fifteen types of HR-HPV have been described, 99.7% being associated with cases of CC and/or cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [1-3]. However, some host and virus related factors modulate such association, i.e. HPV viral load [4,5].

Researchers have thus become interested in HPV viral load. Its association with infection duration has already been described [6,7]. Prior studies have determined the association between viral load and CC severity, progression and development, whilst others have found that the

amount of HPV DNA increases proportionally with lesion severity and can even be detected before cervical lesions develop [8-11]. However, other studies have found no such association [12-14].

As HPV-16 is the viral type most associated with cases of CC (50%–70%) [3,5], most knowledge concerning HPV viral load and CC has been based on HPV-16. Studies, which have included other HR-HPV types, have not led to comparable results regarding those obtained for HPV-16 [15,16].

The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) has been widely used and described in detecting and typing HPV, as well as quantifying a broad range of viral copies and normalising viral load according to the amount of human DNA, having high reproducibility, sensitivity, specificity and yield [13,17]. It was thus considered that it would provide a suitable approach for

* Correspondence: mapatarr.fidic@gmail.com

¹Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Carrera 50#26-20, Bogotá, Colombia

²School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Carrera 24#63C-69, Bogotá, Colombia

Full list of author information is available at the end of the article

measuring HPV viral load, thereby facilitating investigating the role of HR-HPV viral load in developing CC [10,12,18].

The present study was thus aimed at using RT-PCR for determining the association between HPV viral load and the presence of CIN for six HR-HPV types, which have been previously reported as having the greatest prevalence in Colombia [19]. It was thus expected to contribute towards knowledge regarding the parameters leading to identifying HPV positive women having a higher risk of developing cervical lesions.

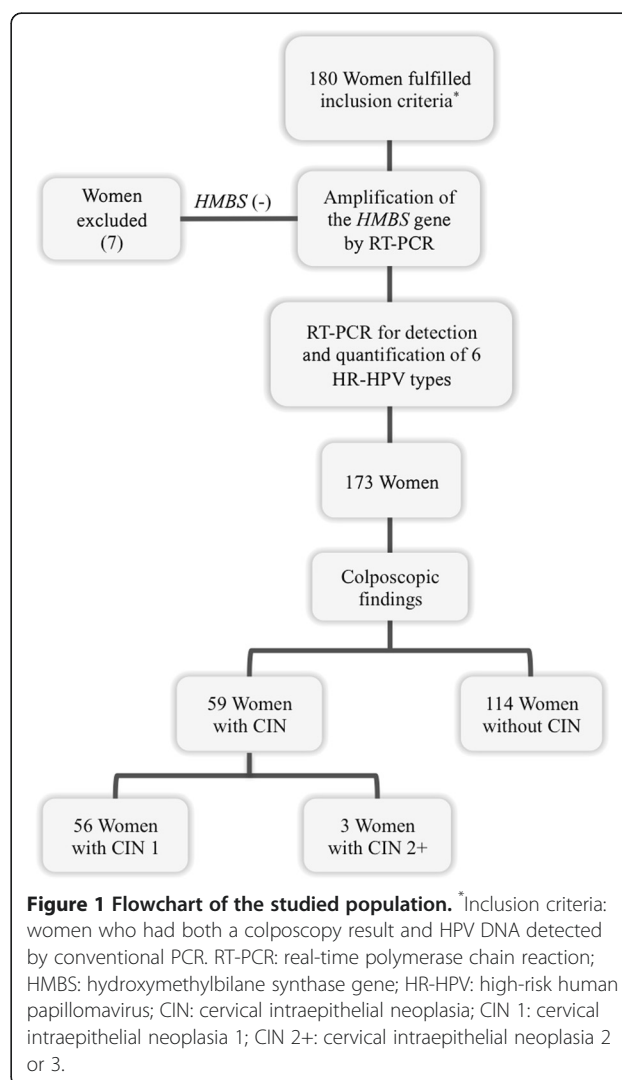
Methods

Study population and ethical considerations

Women eligible for the present study were voluntarily attending their cervical screening consultations between April 2007 and March 2010 in three Colombian regions (Girardot, Chaparral and Bogotá). Bogotá (the capital of Colombia) has the highest percentage of inhabitants, being mainly an urban population. Girardot is a city located in the Cundinamarca department which has focused its economy on the tourist sector due to its climate and infrastructure. The city of Chaparral (Tolima department) was included in the study as it is located in Colombia's coffee-growing region and is also known for ecotourism. Girardot and Chaparral were grouped together in the "other city" category to improve the quality of the present study's statistical analysis.

All the women signed a written informed consent form and completed a questionnaire regarding their sociodemographic characteristics, sexual behaviour and risk factor data before undergoing a gynaecological examination and providing a cervical smear. Samples were analysed using the Papanicolaou test and HPV DNA detection. Colposcopy and biopsy were performed in accordance with current Colombian screening programme guidelines, thereby establishing that women having normal, satisfactory cytology would continue following the 1-1-3 scheme, meaning that they should have a new control in a year's time and, if this continued being normal, in three year's time. However, colposcopy would be required when cytology was abnormal and, in case colposcopy was abnormal, samples would then be taken for pathology study, as in this study, for diagnosing CIN 1 and CIN 2+ [20]. Colposcopy and biopsy were also carried out for women having normal cytology but who were positive for HPV by conventional PCR, as previous studies have reported an increased risk of CIN 2+ development in women having normal cytology when they are HPV positive [21]. Due to biopsy not being taken from women having negative colposcopy, complete or satisfactory colposcopy (squamocolumnar junction completely visible), evaluation of the transformation area, having normal vascularisation and squamous, cylindrical epithelia without alterations were taken as criteria for guaranteeing the absence of lesions [22].

Colposcopy was chosen as the best method for defining the presence or absence of cervical lesions, as previous studies have found that colposcopy has a good correlation with histological results [23] and it remains the standard for detecting cervical lesions until new methods can be applied; in addition, cervical cytology has been reported worldwide as having variable sensitivity for detecting pre-neoplastic lesions and is considered a screening method which identifies women at risk of developing CC who must then be submitted to definitive diagnostic methods (colposcopy and biopsy) [20,24-26]. Women who had both a colposcopy result and HPV DNA detected by conventional PCR were thus included. Women were excluded in whom there was no amplification of the *Homo sapiens hydroxymethylbilane synthase* (HMBS) gene (Gene ID: 3145) by RT-PCR and those having an insufficient sample for analysis (Figure 1).



This study was supervised and approved by each institution's Ethics Committee as follows: Fundación Instituto de Inmunología de Colombia's Ethics Committee and the Ethics Committee of the Nuevo Hospital San Rafael E.S.E, Girardot, the Hospital San Juan Bautista de Chaparral E.S.E. Bioethics Committee and Hospital de Engativá (level II) Ethics Committee.

HPV DNA collection, processing and detection by conventional PCR

Genomic DNA from cervical samples (stored at 4°C, in 95% ethanol) taken from HR-HPV 16, 18, 31, 33, 45 and 58 patients, which had been previously confirmed by conventional PCR (proving positive for at least one of the following previously described primers: GP5+/6+, MY09/11 or pU1M/2R) [27], was extracted using a Quick Extract DNA Extraction Solution kit (Epicentre, Madison, WI), according to the manufacturer's recommendations. The samples were homogenised in 200 µL lysis buffer and incubated at 65°C for 6 minutes and then at 92°C for 2 minutes. The samples were then spun at 13,000 rpm for 10 minutes and the supernatant was stored at -20°C until use.

Viral load quantification by RT-PCR

The methodology used in this study has already been described in detail in a previous article by our group [28]. Briefly, specific primers for each viral type and for *HMBS* were synthesised according to a study published by Moberg et al. [13]. The probes for each viral type and *HMBS* were designed, taking into account the types included in each reaction. Four parallel duplex real-time PCRs per patient were carried out (Table 1).

The cervical samples processed and identified as being HPV-positive by conventional PCR were used as template in PCR reactions for each fragment. The amplicons so obtained were purified with a Wizard PCR preps kit

(Promega), once their quality has been evaluated on 3.25% agarose gel. A TOPO TA cloning kit was used for ligation, followed by transformation in TOP10 *E. coli* cells (Invitrogen). Several clones were incubated in LB broth and kept overnight (250 rpm at 37°C). Recombinant plasmids were purified using an UltraClean mini plasmid prep kit (MO BIO laboratories, California, USA) and sequenced using an automatic ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems, California, USA). Each insert's integrity was checked by aligning the products with the respective theoretical sequenced fragments from each gene using Clustal W software [29].

Real-time PCR

Standardised RT-PCR assays with 10-fold serial plasmid dilutions (10^{11} - 10^6 copies) (using known DNA concentration and copy number) gave a standard curve for each viral type and the *HMBS* gene. CFX96 Touch RT-PCR detection system was used for analysis. Samples were tested for HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-45 and HPV-58. The human *HMBS* gene was amplified in all samples to verify DNA integrity and determine viral copy number per cell. Four RT-PCR reactions were carried out per sample: HPV-16, HPV-18 and -31, HPV-33 and -45 and HPV-58 and *HMBS*. RT-PCR reaction conditions and protocols have been described previously [28].

Each run was performed in 96-well plates, including 6 standards for each viral type and *HMBS*, involving 10-fold plasmid dilutions (10^{11} - 10^6 copy dynamic detection range) and a no template control to rule out DNA contamination.

The viral load was normalised to cellular DNA input using a previously described formula (Equation 1) [15]. Absolute and normalised viral loads were both \log_{10} transformed.

Normalised viral load formula

$$\text{HPV DNA load (HPV copies/cell)} = \frac{\text{Number of HPV copies}}{\text{(Number of HMBS copies/2)}} \quad (1)$$

Table 1 The probes and quenchers used for real-time polymerase chain reaction

Test	Viral type	Size (bp)	Probe	Quencher
Reaction 1	HPV-16	78	FAM	ZEN/IBFQ
Reaction 2	HPV-18	80	Cy5	IBRQ
	HPV-31	78	HEX	ZEN/IBFQ
Reaction 3	HPV-33	78	FAM	ZEN/IBFQ
	HPV-45	76	Cy5	IBRQ
Reaction 4	HPV-58	109	HEX	ZEN/IBFQ
	<i>HMBS</i>	76	FAM	ZEN/IBFQ

Four parallel duplex real-time PCRs were performed per patient. Probe design for each viral type and *HMBS* was adjusted based on the types included in each reaction.

HPV: human papillomavirus; FAM: 6-carboxyfluorescein; Cy5: FluoroLink mono reactive dye Cy5; HEX: hexachlorofluorescein; *HMBS*: hydroxymethylbilane synthase; ZEN/IBFQ: ZEN and Iowa Black FQ; IBRQ: Iowa Black RQ.

Statistical analysis

Sample size was calculated using the difference of proportions test for high viral load between women having and without cervical lesions (0.42 and 0.052 respectively) [8,30]; 0.05 significance, 90% statistical power and a 1:2 ratio between both groups were established. This meant that at least 23 women with lesions and 46 women without them were required for the study. Based on the availability of women without CIN, two women without cervical lesions reported by colposcopy were matched to each woman with CIN by age (within 5 years) and date of enrolment. As only a limited amount of women had

CIN 2+ or high-grade squamous intraepithelial lesions (CIN 2+, according to The Bethesda System (TBS)), CIN category was established which included women having CIN 2+ and women with CIN 1 or low-grade squamous intraepithelial lesions (CIN 1, according to TBS) [31,32] to improve the quality of the present study's statistical analysis.

Analysis was based on type-specific HPV infection rather than on individual women, taking into account that multiple infection is common in the Colombian population [19].

Categorical variable differences between groups were assessed by Chi-squared test or Fisher's test, as appropriate, using a 0.05 significance level. Median and interquartile ranges (IQR) were used for quantitative variables, according to the data distribution.

HPV DNA load distribution between women according to colposcopy and biopsy results was analysed by the Mann-Whitney *U* test or Kruskal Wallis test, depending on the number of groups to be compared. Both absolute HPV DNA load and normalised HPV DNA load were analysed. Absolute viral load was categorised according to percentile distribution in both groups of patients as follows: negative ≤ 0 , low $0 < VL \leq 10^5$ HPV copies and high $> 10^5$ HPV copies (to ensure better quality analysis).

Considering that women with CIN were paired with women without CIN by age and date of entering the study, conditional logistic regression was used for assessing the association between the HPV DNA load for each viral type and cervical lesion frequency according to colposcopy results. This analysis was not done taking the presence of biopsy-defined cervical lesions as outcome, as histology results were not available for all patients included in the study. Crude odds ratio (OR) and adjusted OR with their 95% confidence intervals (CI) were estimated, taking control variables into account, such as origin, ethnicity, age on starting to have sexual relations and the number of infecting HPV types. Hypothesis testing involved a two-tailed test (0.05 significance); STATA 10 was used for all statistical analysis.

Results

180 patients fulfilled the inclusion criteria; 7 of them were excluded from statistical analysis, as their *HMBS* gene could not be amplified. This meant that 114 women were classified as negative for intraepithelial lesions (92.98% having normal cytology) and 59 women having CIN identified by colposcopy (56 women having CIN 1 and 3 having CIN 2+) were included in the analysis (Figure 1).

According to the diagnostic algorithm, a biopsy was taken from 59 women having colposcopy-defined cervical lesions; however, results were only obtained for 45 women as the samples taken for pathology regarding the

remaining 14 women were unsatisfactory or had been lost. 23.73% ($n = 14$) of the women had confirmation of CIN 1 by biopsy (only one woman with CIN 2+ was found). Two of the CIN 2+ women detected by colposcopy had CIN 1 by biopsy.

Regarding women with CIN, median age was 40 years old (14 years IQR) and 41.5 years old (13 years IQR) in women without CIN. Most women participating in the study came from the city of Girardot (60.69%; $n = 105$); 76.19% ($n = 80$) of these women were negative for lesions. 95.95% of the women in the study were mestizos ($n = 166$) and the remaining percentage (4.05%) was made up of indigenous, white and black women. The distribution of socio-demographic characteristics and risk factors associated with CC and the detection of HPV infection was compared between both groups (those with CIN and those without it), significant differences being found regarding origin ($p < 0.05$) (Table 2).

Overall, 91.91% ($n = 159$) of the sample proved positive for the detection of HPV by RT-PCR, i.e. 93.22% ($n = 55$) of women with CIN (92.86% positive from the group having CIN 1 and 100% positive from the group having CIN 2+) and 91.23% ($n = 104$) of women without lesions. 79.24% ($n = 126$) of all infected women were infected by more than one viral type; this was observed in 81.82% ($n = 45$) of women with CIN and 77.88% ($n = 81$) of women negative for lesions. Simultaneous infection was more frequent concerning 2 high-risk viral types in women without lesions ($n = 29$; 27.88%) and 3 types in women with cervical lesions ($n = 19$; 34.54%). The most frequently encountered viral types were HPV-18 and HPV-16 in multiple infections, in both groups.

The type-specific distribution revealed HPV-18 as being most frequent in both groups (69.49% in women having CIN and 66.66% in women without CIN), followed by HPV-16 (57.63%) and HPV-45 (38.98%) in women having lesions and HPV-16 (45.61%), HPV-31 (45.61%) and HPV-45 (38.60%) in women proving negative for lesions. HPV-33 had the lowest infection frequency in both groups.

Higher high viral load was recorded concerning HPV-18, HPV-16 and HPV-33 infection in women with CIN, whilst high viral load was most frequent in HPV-31, HPV-45 and HPV-58 infection in women without lesions (Table 3).

Figures 2 shows absolute (A) and normalised (B) viral load distribution for each HR-HPV type, comparing both groups of women. It is worth stating that HPV-31 (in women without CIN) and HPV-33 (in women having CIN) were the HR-HPV viral types having the highest absolute viral load (median = 9.41 (2.58 IQR) HPV copies for HPV-31 and median = 9.33 (2.94 IQR) HPV copies for HPV-33) whilst HPV-58 infection had the lowest absolute viral load in both groups of women. The

Table 2 The distribution of socio-demographic characteristics and risk factors

Characteristic	Categories	n	%	With CIN (n = 59)		Without CIN (n =114)		p
				n	%	n	%	
Age, years	<30	29	16.76	11	18.64	18	15.79	0.493
	30–40	54	31.21	21	35.59	33	28.95	
	>40	90	52.02	27	45.76	63	55.26	
Origin	Bogotá	65	37.57	32	54.24	33	28.95	0.001
	Other city	108	62.43	27	45.76	81	71.05	
Ethnicity	Other	7	4.05	3	5.08	4	3.51	0.691
	Mestizo	166	95.95	56	94.92	110	96.49	
Average monthly income*	≤ minimum	155	89.06	53	89.83	102	89.47	0.942
	>minimum	18	10.40	6	10.17	12	10.53	
Educational level	No schooling	1	0.58	1	1.69	0	0.00	0.094
	Primary	82	47.40	22	37.29	60	52.63	
	Secondary	74	42.77	28	47.46	46	40.35	
	Technical	10	5.78	6	10.17	4	3.51	
	Graduate	6	3.47	2	3.39	4	3.51	
Marital status	Single	17	9.83	4	6.78	13	11.40	0.673
	Married	20	11.56	7	11.86	13	11.40	
	Divorced	8	4.62	4	6.78	4	3.51	
	Living with partner	126	72.83	43	72.88	83	72.81	
	Widow	2	1.16	1	1.69	1	0.88	
Healthcare scheme affiliation	Subsidised- linked	159	91.91	52	88.14	107	93.86	0.191
	Contributory-private	14	8.09	7	11.86	7	6.14	
Smoker	No	146	84.39	49	83.05	97	85.09	0.726
	Yes	27	15.61	10	16.95	17	14.91	
Age at first intercourse, years	<16	41	23.70	10	16.95	31	27.19	0.133
	≥16	132	76.30	49	83.05	83	72.81	
Lifetime number of sexual partners	1	72	41.62	26	44.07	46	40.35	0.868
	2–3	84	48.55	27	45.76	57	50.00	
	>3	17	9.83	6	10.17	11	9.65	
Contraceptive method	None	65	37.57	19	32.20	46	40.35	0.697
	Surgery	52	30.06	15	25.42	22	19.30	
	Hormonal	19	10.98	18	30.51	34	29.82	
	Barrier	37	21.39	7	11.86	12	10.53	
Pregnancies	None	4	2.31	1	1.69	3	2.63	0.326
	1–2	76	43.93	28	47.46	48	42.11	
	3–4	74	42.77	27	45.76	47	41.23	
	>4	19	10.98	3	5.08	16	14.04	
Abortions	None	82	47.40	27	45.76	55	48.25	0.818
	1	68	39.31	25	42.37	43	37.72	
	≥2	23	13.29	7	11.86	16	14.04	
STD	No	137	79.19	47	79.66	90	78.95	0.913
	Yes	36	20.81	12	20.34	24	21.05	

Values in bold = $p < 0.05$.

*The minimum average monthly income (2014 rate) would be roughly US \$300.

p = p value; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; STD: sexually transmitted disease.

Table 3 Type-specific HR-HPV viral load distribution by category

HPV type	n	%	With CIN (n = 59)						Without CIN (n = 114)						p
			Negative		Low viral load		High viral load		Negative		Low viral load		High viral load		
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
HPV-16	86	49.71	25	42.37	12	20.34	22	37.29	62	54.39	13	11.40	39	34.21	0.186
HPV-18	117	67.63	18	30.51	10	16.95	31	52.54	38	33.33	18	15.79	58	50.88	0.928
HPV-31	71	41.04	40	67.80	1	1.69	18	30.51	62	54.39	3	2.63	49	42.98	0.257
HPV-33	14	8.09	54	91.53	0	0.00	5	8.47	105	92.11	1	0.88	8	7.02	0.846
HPV-45	67	38.73	36	61.02	9	15.25	14	23.73	70	61.40	10	8.77	34	29.82	0.366
HPV-58	56	32.37	42	71.19	7	11.86	10	16.95	75	65.79	16	14.04	23	20.18	0.772
HR-HPV*	159	91.91	4	6.78	8	13.56	47	79.66	10	8.77	12	10.53	92	80.70	0.777

HPV DNA load: categorised as ≤ 0 = negative, 0 < VL ≤ 10⁵ HPV copies = low viral load, >10⁵ HPV copies = high viral load.

*HR-HPV: high risk-human papillomavirus, infection by at least one high-risk viral type from the 6 analysed here.

HPV: human papillomavirus; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; p = p value.

range of values for normalised viral load was lower than for absolute (up to 10⁸ HPV copies). The highest absolute viral load was detected for HPV-31 in women with CIN (10²² HPV copies) and highest normalised viral load for HPV-33 in women without CIN. No statistically significant differences were observed regarding viral load distribution (absolute and normalised) for each HR-HPV type in either group of patients.

The three patients having CIN 2+ were positive for HR-HPV; HPV-18 and HPV-31 were detected in two of them, whilst the other one was positive for HPV-18, HPV-16 and HPV-45. Even though women having CIN 2+ had a higher viral load (normalised for HPV-18 and absolute for HPV-16) than women having CIN 1, the differences in viral load distribution were not statistically significant. However, normalised viral load for HPV-31 was greater in women negative for cervical lesion and having CIN 1 compared to women having CIN 2+ (marginal significance, i.e. p = 0.052).

The distribution of viral load was also analysed for each HR-HPV type, according to biopsy result. Similar results were found to those with colposcopy (i.e. higher absolute viral loads in women having a severer degree of lesion); and for some types (HPV-31, HPV-33 and HPV-58) higher normalised viral loads; however, the differences were not statistically significant due to the amount of women analysed (Table 4).

Crude and adjusted odds ratios (OR) were calculated for estimating the magnitude of absolute viral load association with CIN for each viral type. The conditional logistic regression model revealed that HPV-16 infection was significantly associated with greater frequency regarding cervical lesions. However, lesions occurred more frequently in the group of women having low viral load for HPV-16 (0 < VL ≤ 5.86 HPV copies) than in women having a high load (>5.86 HPV copies), (3.53 OR_a, 1.16–10.74 95%CI; 2.63 OR_a, 1.09–6.36 95%CI, respectively). It was also found that CIN frequency was lower in women having HPV-31 and

high viral load (>5.14 HPV copies; 0.34 OR_a, 0.15–0.78 95%CI). No significant associations were obtained for the other viral types with the presence of CIN (Table 5).

Discussion

This study involved using RT-PCR; this enabled type-specific evaluation of the viral load of the most frequently occurring oncogenic types in Colombia (HPV-16, -18, -31, -33, -45 and -58) [19] for determining each type's association with precursor lesions of CC. As the method has high sensitivity, specificity and has a broad dynamic range of viral detection (up to 10²² HPV copies) this provided the best approach for this study [12,13,16,18,33].

More HPV infections were found in women having CIN in our sample, amongst whom all women having CIN 2+ were HPV positive. The foregoing was consistent with the fact that almost 99.7% of CC cases are associated with HPV [1]. Previous studies have demonstrated that HPV prevalence in women having CIN is high, proportionally increasing as lesion severity increases [30,34,35]. The prevalence found here was greater than that reported in the literature (100% in CIN 2+, 92.86% in CIN 1 and 91.23% in women without CIN). Women were included in this study who had been previously identified as HPV positive using conventional PCR; this explained the high prevalence of HPV when using RT-PCR in women without lesions. However, variable infection prevalence in women without CIN has been found worldwide (mean = 12.6%) [35,36].

Multiple infection frequency has been variable (16.3%–55%) in previous reports concerning women having lesions [35]; up to 3.4% infection by multiple types of HR-HPV has been described in women without lesions [37]. The present study revealed more multiple infections (in both the general population and women having CIN and those without them) regarding previous reports worldwide, but similar to that previously reported in Colombia [27,38]. However, RT-PCR was used which has high

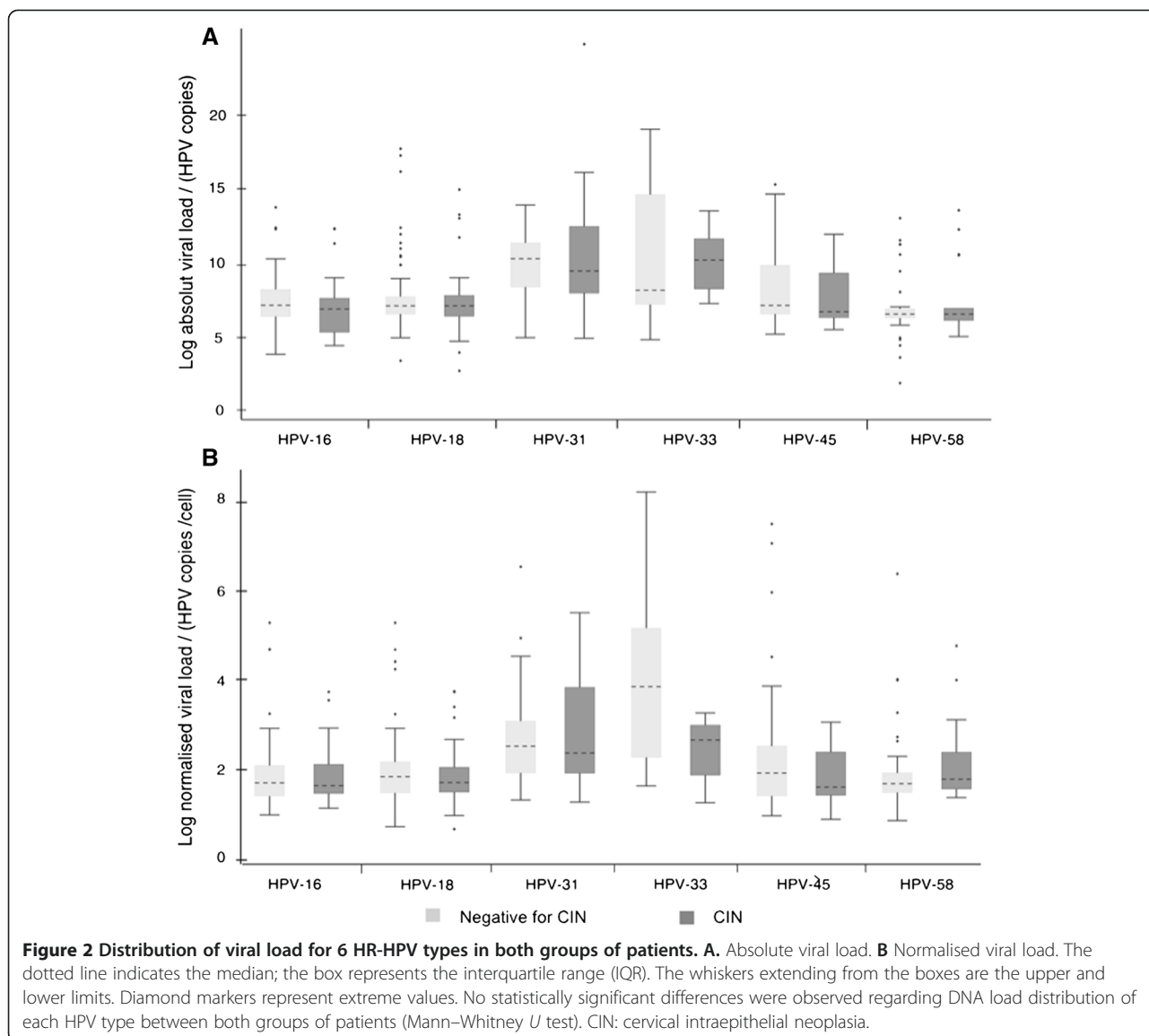


Table 4 Distribution of 6 HR-HPV types' viral load regarding biopsy results

Viral type	Negative (n = 28)			CIN 1 (n = 16)			CIN 2+ (n = 1)		
	% (n)	Viral load, median (IQR)		% (n)	Viral load, median (IQR)		% (n)	Viral load, median (IQR)	
		Absolute	Normalised*		Absolute	Normalised*		Absolute	Normalised*
HPV-16	66.67 (22)	6.42 (1.69)	1.79 (0.54)	57.89 (11)	6.77 (3.04)	1.69 (0.64)	0	n/a	n/a
HPV-18	66.67 (22)	6.29 (1.34)	1.84 (0.51)	68.42 (13)	6.61 (2.28)	1.67 (1.79)	100 (1)	7.02 (n/a)	2.07 (n/a)
HPV-31	30.30 (10)	8.51 (1.90)	2.39 (0.38)	31.58 (6)	9.69 (6.00)	3.50 (2.17)	0	n/a	n/a
HPV-33	3.03 (1)	6.75 (n/a)	1.98 (n/a)	10.53 (2)	8.48 (1.70)	2.37 (2.06)	100 (1)	10.57 (n/a)	3.13 (n/a)
HPV-45	51.52 (17)	6.13 (2.95)	1.79 (1.00)	42.11 (8)	6.24 (1.17)	1.61 (0.80)	0	n/a	n/a
HPV-58	21.21 (7)	5.93 (3.89)	2.14 (2.35)	36.84 (7)	6.12 (0.34)	1.75 (0.28)	0	n/a	n/a
HR-HPV**	94.34 (31)	6.37 (1.20)	2.06 (0.63)	94.74 (18)	6.77 (2.97)	2.12 (1.37)	100 (1)	8.80 (n/a)	2.60 (n/a)

Absolute and normalised viral loads were both log₁₀ transformed.

*HPV copies/cell = number of HPV copies/(number of HMBS copies/2).

**HR-HPV: high risk-human papillomavirus, infection by at least one high-risk viral type from the 6 analysed here.

HPV: human papillomavirus; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; CIN 1: cervical intraepithelial neoplasia 1; CIN 2+: cervical intraepithelial neoplasia 2 or 3; n/a: not applicable.

Table 5 Conditional logistic regression model

HPV type	Viral load	With CIN / without CIN	Crude OR (95%CI)	Adjusted OR ^a	95%CI
HPV-16	Negative	25/62	Reference		
	0 < VL ≤ 5.86	12/13	2.19 (0.88–5.43)	3.53	1.16–10.74
	5.86 < VL	22/39	1.27 (0.64–2.50)	2.63	1.09–6.36
HPV-18	Negative	18/38	Reference		
	0 < VL ≤ 5.95	10/18	1.14 (0.45–2.89)	1.72	0.52–5.69
	5.95 < VL	31/58	1.06 (0.52–2.17)	1.77	0.68–4.63
HPV-31	Negative	40/62	Reference		
	0 < VL ≤ 5.14	1/3	0.52 (0.04–6.29)	0.15	0.01–2.26
	5.14 < VL	18/49	0.60 (0.32–1.14)	0.34	0.15–0.78
HPV-33	Negative	54/105	Reference		
	0 < VL ≤ 4.60	0/1	0.00 (0 - .)	0	0 - .
	4.60 < VL	5/8	1.43 (0.45–4.50)	1.67	0.44–6.28
HPV-45	Negative	36/70	Reference		
	0 < VL ≤ 5.98	9/10	1.53 (0.60–3.92)	2.94	0.92–9.44
	5.98 < VL	14/34	0.79 (0.38–1.67)	1.13	0.43–2.96
HPV-58	Negative	42/75	Reference		
	0 < VL ≤ 5.97	7/16	0.83 (0.32–2.11)	0.73	0.23–2.31
	5.97 < VL	10/23	0.83 (0.37–1.83)	0.86	0.35–2.12
HR-HPV**	Negative	4/10	Reference		
	0 < VL ≤ 5.94	8/12	1.73 (0.40–7.47)	1.01	0.23–4.50
	5.94 < VL	47/92	1.18 (0.35–4.00)	1.39	0.25–7.81

Values in bold = $p < 0.05$.

^aAdjusted for origin, ethnicity, age at first intercourse and number of viral types.

**HR-HPV: high-risk-human papillomavirus, infection by at least one high-risk viral type from the 6 analysed here (viral load = sum of viral loads of HPV types detected/ number of HPV types detected).

HPV: human papillomavirus; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; VL: viral load; OR: odds ratio.

sensitivity and allows small amounts of viral DNA to be detected, compared to other methods [13,18]. This has been previously demonstrated by studies carried out involving RT-PCR which have reported high multiple infection frequency [39,40]. Such differences regarding co-infection prevalence reported in various studies might have been due to their design, sample size, the HPV detection methods used and the population being studied (geographic, demographic and clinical factors) [37].

HPV-18 and HPV-16 occurred most frequently in the present study, followed by HPV-45 and HPV-58. Differences concerning type-specific prevalence have been reported according to geographic and demographic factors [3,35]. It is worth noting that the two most common types found here are responsible for the 70% of cases of CC [41] and that the HPV genotypes evaluated in this study have been reported amongst the 8 HR-HPV types most frequently occurring around the world, in both women without lesions and women with CC [2,3,35].

Absolute viral load was highest in women having CIN compared to women without lesions determined by both colposcopy and biopsy; an increase in the viral load was observed for HPV-18 and HPV-33 proportional to the

degree of injury. The foregoing was consistent with previous studies which have revealed the effect of viral load on developing CC. Most HPV-16 studies have found that viral load has increased in relation to the degree of cervical lesion severity [8-11,15,16,42].

An association between viral load and cervical lesion frequency (as assessed by colposcopy) was observed in this study just for HPV-16 and HPV-31. The present study's results highlighted the fact that women having low HPV-16 load (<5.86 HPV copies) had higher cervical lesion frequency. Such results agreed with those from a study by Manawapat, Stubenrauch *et al.*, [43] which showed that women having persistent HPV-16 infection had lower viral load than those who had a transient infection (4.72 copies/cell *cf* 20 copies/cell; $p = 0.0003$). It has been found recently that low viral load was characteristic of intermittently detected persistent infection [44]. Reduced viral load has been described in women having CIN; this has been explained by HPV genome integration associated with down-regulation of viral DNA synthesis, thereby affecting immune system activation and thus reducing the probability of infection being eliminated [43,45-47]. Accordingly, a long period of

latency accompanied by low viral load would probably be observed, representing a greater risk for infection persistence and lesion progression [48].

Contrary to our findings regarding HPV-16 viral load, the present study found that a high HPV-31 load (>5.14 HPV copies) was associated with lower cervical lesion frequency. As mentioned previously regarding HPV-16 results, it has been shown that viral load has been greater in transitory infections regarding patients having persistent infection [43]. This agreed with the finding that clearance of HPV-16 infection has been preceded by a transient viral load peak or a plateau phase [33]; such high load was probably necessary for the immunological system to become induced, thereby favouring HPV elimination. According to the above, HPV-31 infections are probably transitory and such association is mediated by an immune system response to high viral load which can eliminate the infection and thus CC precursor lesions do not progress or such lesions regress spontaneously [47].

Regarding the other viral types (HPV-18, -33, -45 and -58), no association was found between viral load and cervical lesion frequency; such result was supported by data from other authors [14-16,42,49,50]. However, a study by Moberg, Gustavsson *et al.*, found that high HPV-16, HPV-31 and HPV-18/45 viral load increased the risk of developing carcinoma *in situ* (CIS) [51].

The pertinent literature gives different cut-off points when categorising viral load, depending on the quantification technique used (RT-PCR, Hybrid Capture II (HCII)) [8] and distribution in a particular population being evaluated [9,51]. A study which evaluated the clinical significance of HPV-16 and -18 viral loads determined that HPV-16 viral load was related to cervical lesion severity, having a 3.0×10^6 copies/million cells threshold, this being highly specific for grade 2 diagnosis [15]. Taking the foregoing into account, viral load was categorised in the present study according to percentile distribution, leaving 10^6 copies as cut-off point for ensuring analysis quality.

It is worth stressing that this technique managed to detect a broad range of viral load, even after stratifying by colposcopy result and viral type. However, this hampered establishing viral load cut-off points to enable identifying women at greater risk of developing cervical lesions; previous studies have also experienced such difficulty [12,16,33].

This work's value lies in it being a study where a reproducible, sensitive and specific technique (i.e. RT-PCR) was used for detecting and quantifying viral load (absolute and normalised) not just for one viral type but for the 6 most frequently occurring high-risk HPV types described to date in Colombia. Besides, this is the first study carried out in Colombia which has included

women from regions having high HPV infection prevalence and which was aimed at evaluating the association between HPV viral load and cervical lesion frequency.

This study's results were obtained from a single evaluation of HPV viral load; this means that predicting the risk of lesion progression and developing CC later on cannot be ascertained from this. However, it can be stated that our results were consistent with some findings reported in longitudinal studies [33,43,44,48]. The infection duration time of the women included in this study was also unknown; HPV-16 might thus have been greater in women having CIN and lower in HPV-31 women. Another limitation of this study was the low number of women having CIN 2+ which hindered generalising the results to all CC precursor lesions. An analysis of HPV viral load dynamics could thus be more reliable and provide more information for estimating whether HPV infection will worsen or clear and predicting the development of CC or cervical lesions. Prospective studies on women having HPV infection which would include type-specific determination (according to local prevalence) of viral load and women having cervical lesions with different degrees of severity are thus needed for confirming our results.

Conclusions

A significant association was found in this study, low HPV-16 and high HPV-31 viral loads were associated with higher CIN frequency; this might have been related to infection duration and immune system response. HPV infection's effect on developing CC is influenced by viral load, meaning that measuring load could improve the predictive value of HPV detection; however, the scope of quantification depends on the viral type being detected. These findings support the idea of quantifying viral load (as a type-specific marker of CC), coupled to cytology, for improving and strengthening CC screening programmes. This would lead to identifying HPV positive women at greater risk of developing cervical lesions, as well as identifying women as yet lacking cervical anomalies for predicting the beginnings of neoplasia.

Abbreviations

HPV: Human papillomavirus; HR-HPV: High-risk human papillomavirus; CC: Cervical cancer; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; CIN 1: Cervical intraepithelial neoplasia 1; CIN 2+: Cervical intraepithelial neoplasia 2 or 3; HMBS: Hydroxymethylbilane synthase; PCR: Polymerase chain reaction; RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction; DNA: Deoxyribonucleic acid; VL: Viral load; STD: Sexually-transmitted diseases; HC II: Hybrid capture II; FAM: 6-carboxyfluorescein; Cy5: FluoroLink mono reactive dye Cy5; HEX: hexachlorofluorescein; ZEN/IBFQ: ZEN and Iowa Black FQ; IBRQ: Iowa Black RQ; SD: Standard deviation; CI: Confidence interval; IQR: Interquartile range; n/a: Not applicable; OR: Odds ratio.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All the authors were involved in developing the study and preparing the ensuing article. LDRO and SCSDL provided the concept and designed the study, as well as acquiring, analysing and interpreting the data and writing the article. MC helped draft the manuscript and assisted with data analysis. DAMP developed the methodology and was involved in drafting the manuscript. RS provided statistical analysis, interpreted data and helped in writing the manuscript. The study was supervised by APP, MEP and MAP who revised the document and lent their expertise regarding the discussion of results. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

This project was supported by the Basque Development Cooperation Agency, the Spanish International Development Cooperation Agency (AECID) (Project 10-CAP1-0197) and the Colombian Science, Technology and Innovation Department (COLCIENCIAS) (contract # 0709-2013). The sponsors played no role in study design, data collection and/or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We would like to express our thanks to Jason Garry for translating and revising this manuscript.

Author details

¹Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Carrera 50#26-20, Bogotá, Colombia.

²School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Carrera 24#63C-69, Bogotá, Colombia. ³Faculty of Natural and Mathematical Sciences, Universidad del Rosario, Carrera 24#63C-69, Bogotá, Colombia. ⁴School of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 45#26-85, Bogotá, Colombia. ⁵Mathematics Department, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain.

Received: 18 December 2014 Accepted: 24 February 2015

Published online: 05 March 2015

References

- Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;2006 (Suppl):1–5.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:518–27.
- Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011;128:927–35.
- de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, Do Amaral CM. Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecol Oncol*. 2012;126:304–11.
- Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*. 2002;89:183–90.
- Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez F, Molano M, Posso H, Moreno V, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*. 2009;100:1184–90.
- Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlee F, et al. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis*. 2010;10:326.
- Hernández-Hernández DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol*. 2003;90:310–7.
- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qvarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *Lancet*. 2000;355:2189–93.
- Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer*. 2005;92:891–4.
- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *Lancet*. 2000;355:2194–8.
- Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer*. 2005;92:2195–200.
- Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3221–8.
- Sherman ME, Schiffman M, Cox JT, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study G. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:102–7.
- Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boublil L, Olive D, et al. Significance of HPV 16 and 18 viral load quantitation in women referred for colposcopy. *J Med Virol*. 2012;84:306–13.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1030–4.
- Jenkins A, Allum AG, Strand L, Aakre RK. Simultaneous detection, typing and quantitation of oncogenic human papillomavirus by multiplex consensus real-time PCR. *J Virol Methods*. 2013;187:345–51.
- Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Pawlita M, et al. Viral load of high-risk human papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22:406–14.
- Camargo M, Soto-De Leon SC, Sanchez R, Perez-Prados A, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia. *Ann Epidemiol*. 2011;21:204–13.
- Ramírez VG, Bustamante MA, Sarmiento CA. Norma Técnica para la Detección Temprana del Cáncer de Cuello Uterino y Guía de Atención de Lesiones Preneoplásicas de Cuello Uterino. Colombia: Ministerio de Salud, Dirección General de Promoción y Prevención; 2000. p. 1–26.
- Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Rozendaal L, Heideman DA, et al. HPV DNA testing in population-based cervical screening (VUSA-Screen study): results and implications. *Br J Cancer*. 2012;106:975–81.
- Sellors J, Sankaranarayanan R. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes. Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2003. p. 140.
- Boicea A, Patrascu A, Surlin V, Iliescu D, Schenker M, Chiutu L. Correlations between colposcopy and histologic results from colposcopically directed biopsy in cervical precancerous lesions. *Rom J Leg Med*. 2012;53:735–41.
- Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/63–70.
- Cronje HS, Cooreman BF, Beyer E, Bam RH, Middlecote BD, Divall PD. Screening for cervical neoplasia in a developing country utilizing cytology, cervicography and the acetic acid test. *Int J Gynecol Obstet*. 2001;72:151–7.
- Cronje HS, Parham GP, Cooreman BF, de Beer A, Divall P, Bam RH. A comparison of four screening methods for cervical neoplasia in a developing country. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188:395–400.
- Soto-De Leon S, Camargo M, Sanchez R, Munoz M, Perez-Prados A, Purroy A, et al. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. *PLoS One*. 2011;6:e14705.
- Soto-De Leon SC, Del Río-Ospina L, Camargo M, Sanchez R, Moreno-Perez DA, Perez-Prados A, et al. Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:395.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673–80.
- Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, Zhang Y, He Y. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol*. 2006;35:264–9.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2001;2002(287):2114–9.

32. Broutet N, Dangou JM, Fadhil I, Lazdane G, Luciani S, Mathur A, et al. WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention. South Africa: World Health Organization; 2013. p. 1–60.
33. Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mougou C, Pretet JL. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol*. 2006;35:270–7.
34. Moore RA, Ogilvie G, Fornika D, Moravan V, Brisson M, Amirabbasi-Beik M, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in 5,000 British Columbia women—implications for vaccination. *Cancer Causes Control*. 2009;20:1387–96.
35. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*. 2012;131:2349–59.
36. Poljak M, Seme K, Maver PJ, Kocjan BJ, Cuschieri KS, Rogovskaya SI, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Central and Eastern Europe. *Vaccine*. 2013;31 Suppl 7:H59–70.
37. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*. 2004;57:68–72.
38. Garcia DA, Cid-Arregui A, Schmitt M, Castillo M, Briceno I, Aristizabal FA. Highly sensitive detection and genotyping of HPV by PCR multiplex and luminex technology in a cohort of colombian women with abnormal cytology. *Open Virol J*. 2011;5:70–9.
39. Xi LF, Hughes JP, Edelstein ZR, Kiviat NB, Koutsky LA, Mao C, et al. Human Papillomavirus (HPV) type 16 and type 18 DNA Loads at Baseline and Persistence of Type-Specific Infection during a 2-year follow-up. *J Infect Dis*. 2009;200:1789–97.
40. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, et al. Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1458–64.
41. Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther*. 2011;11:295–306.
42. Zerbini M, Venturoli S, Cricca M, Gallinella G, De Simone P, Costa S, et al. Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *J Clin Pathol*. 2001;54:377–80.
43. Manawapat A, Stubenrauch F, Russ R, Munk C, Kjaer SK, Iftner T. Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *Am J Cancer Res*. 2012;2:192–203.
44. Winer RL, Xi LF, Shen Z, Stern JE, Newman L, Feng Q, et al. Viral load and short-term natural history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult women. *Int J Cancer*. 2014;134:1889–98.
45. Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*. 2006;59:513–7.
46. Nakagawa M, Stites DP, Patel S, Farhat S, Scott M, Hills NK, et al. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis*. 2000;182:595–8.
47. Brenna SM, Syrjanen KJ. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Sao Paulo Med J*. 2003;121:128–32.
48. van Duin M, Srijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer*. 2002;98:590–5.
49. Chan PK, Cheung JL, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu SS, et al. Profile of viral load, integration, and E2 gene disruption of HPV58 in normal cervix and cervical neoplasia. *J Infect Dis*. 2007;196:868–75.
50. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, et al. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*. 2007;121:2787–93.
51. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma *in situ*. *Int J Cancer*. 2004;112:854–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





UNIVERSIDAD DEL ROSARIO



UNIVERSIDAD CES
Un Compromiso con la Excelencia

CARGA VIRAL DE SEIS TIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO Y SU ASOCIACIÓN CON LESIONES CERVICALES

**TRABAJO DE GRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN EPIDEMIOLOGÍA**

LUISA FERNANDA DEL RÍO OSPINA, M.D.

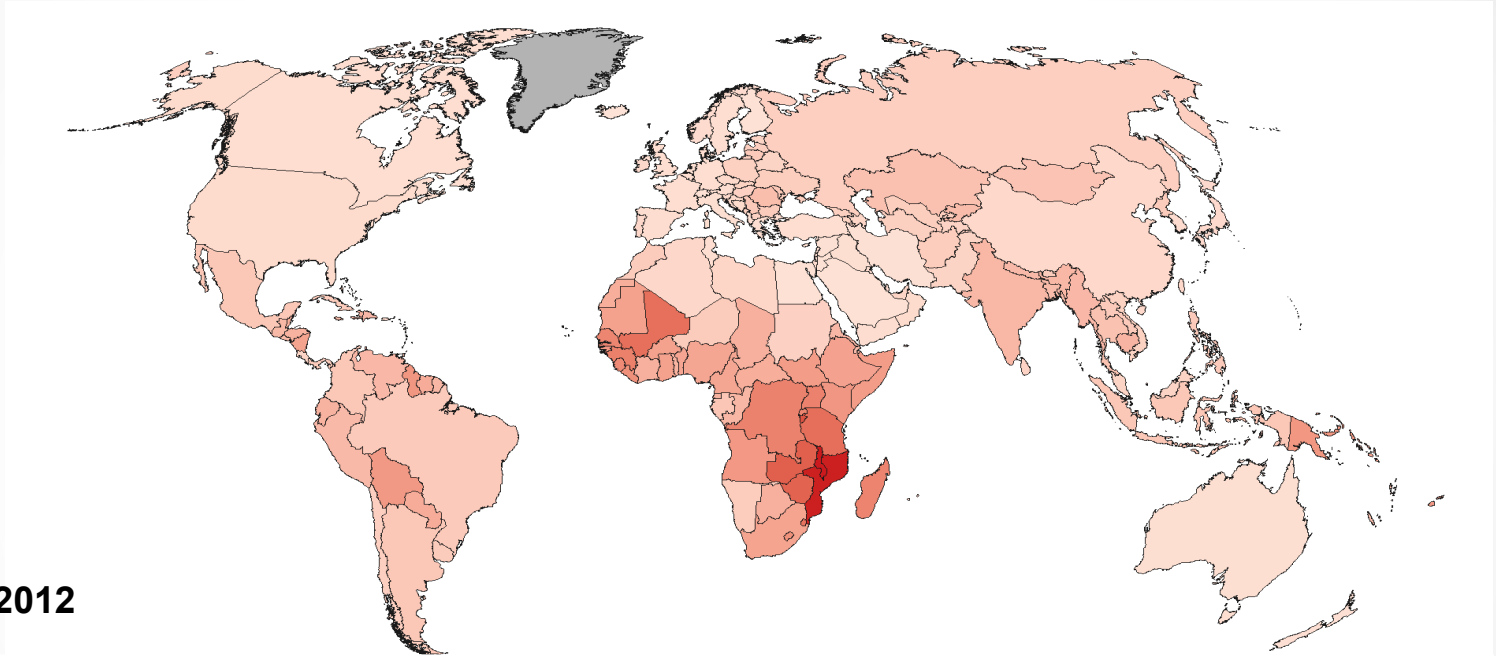
Directora
SARA CECILIA SOTO DE LEÓN, B.Sc. D.Sc



Contenido



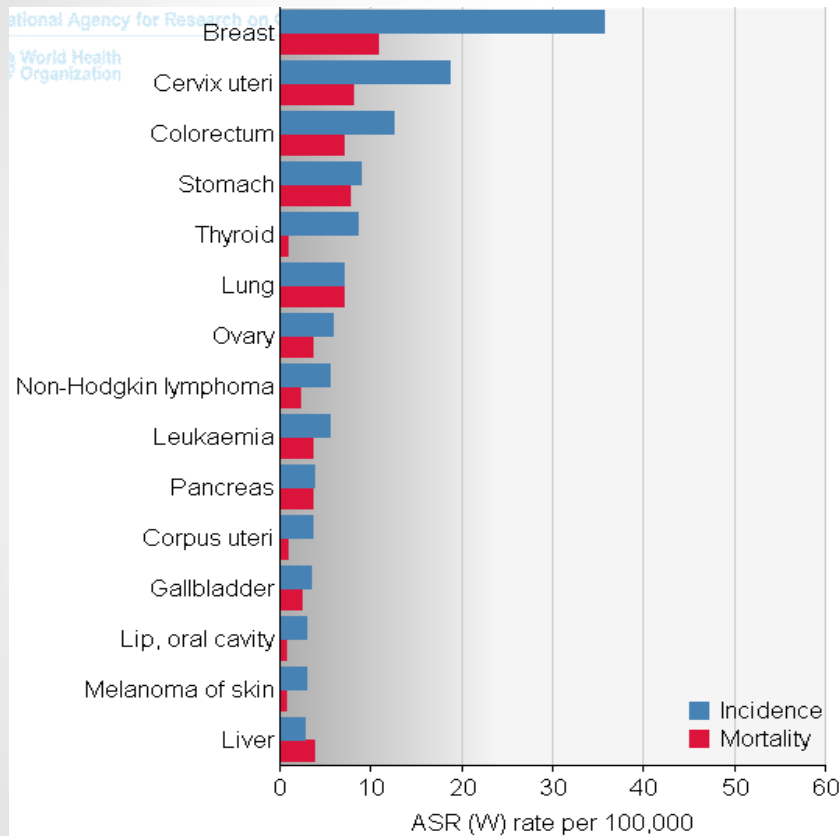
Cáncer cervical



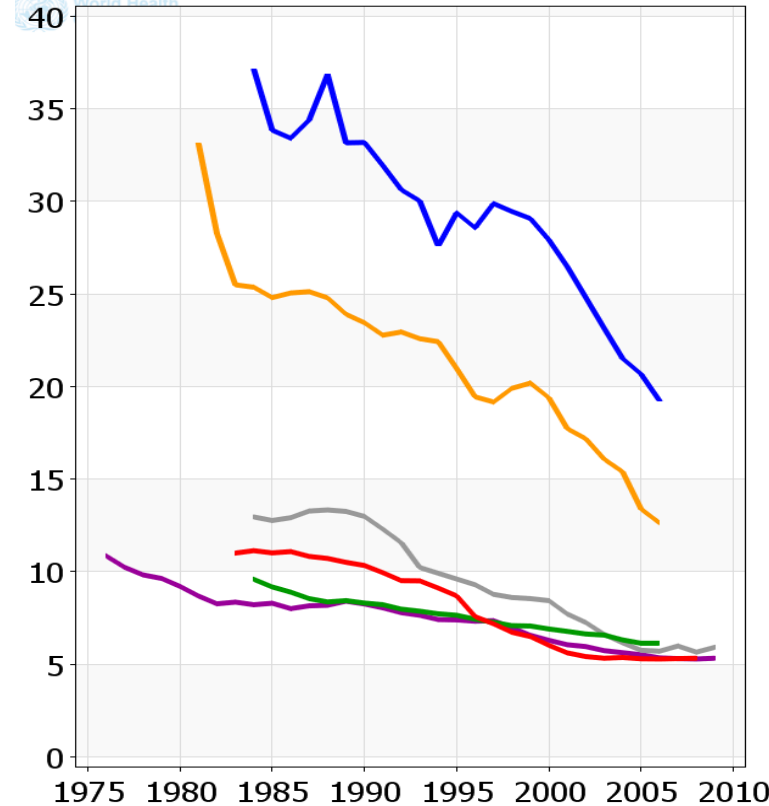
GLOBOCAN 2012

Números Estimados (miles)	Casos	Muertes	Prevalencia (5 años)
Mundo	528	266	1547
Regiones más desarrolladas	83	35	289
Regiones menos desarrolladas	445	230	1258
WHO Americas (PAHO)	83	36	279

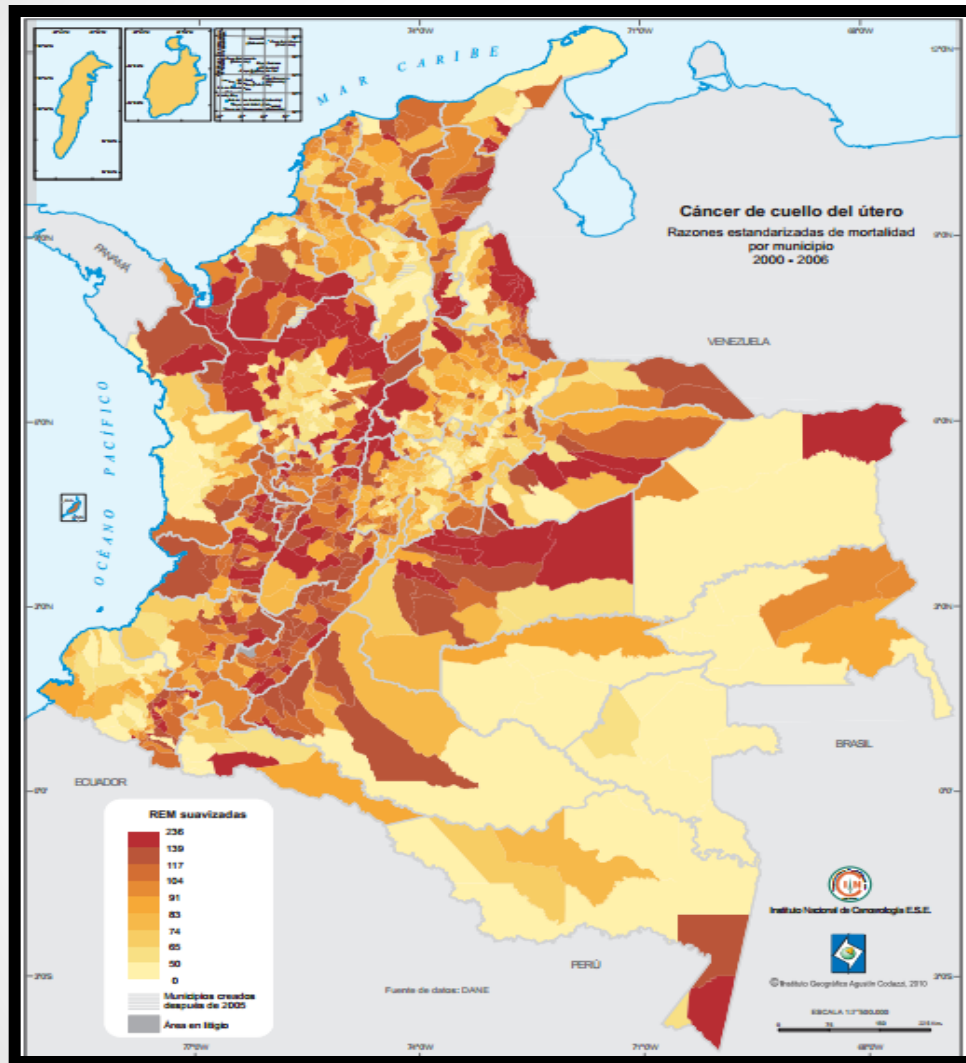
Colombia



International Agency for Research on Cancer



Colombia



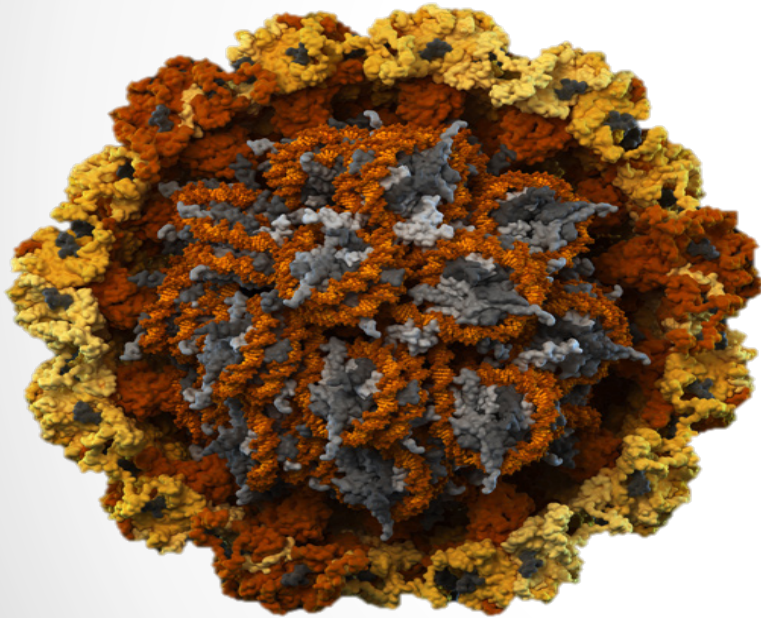
Incidencia
18.7 /100.0000

Mortalidad
8/100.0000

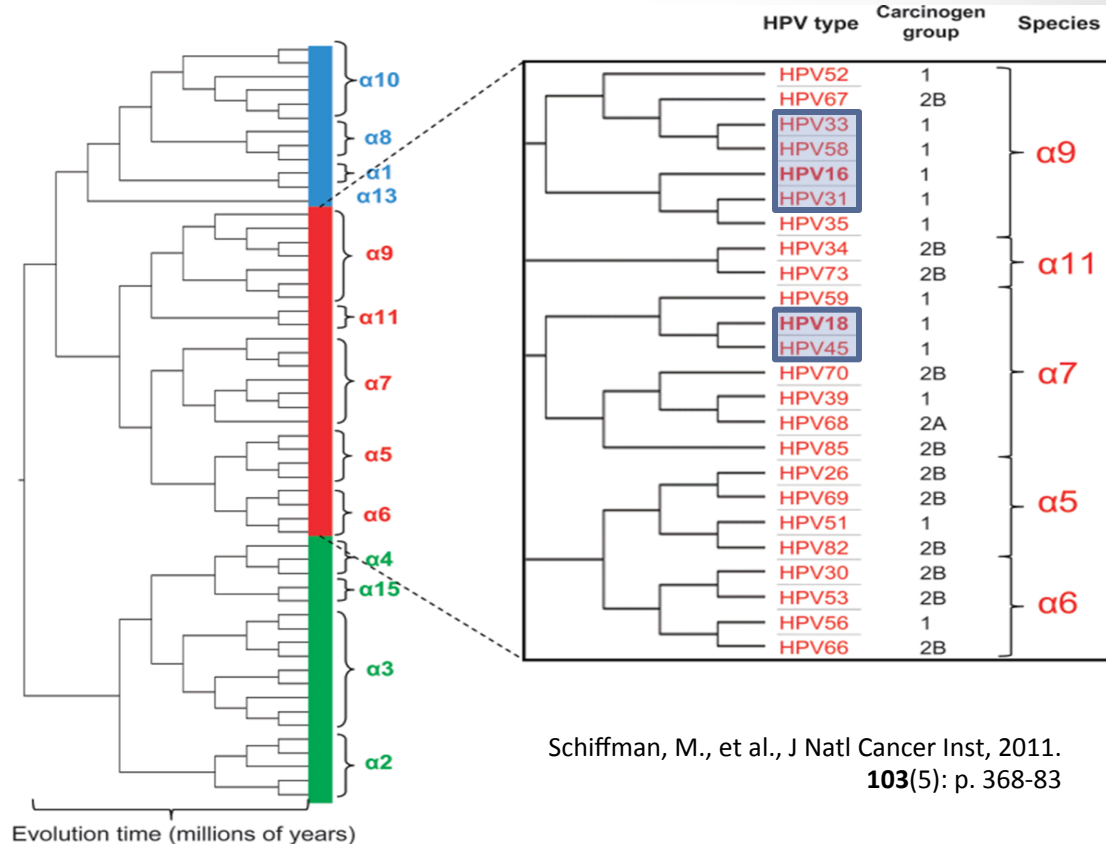
Virus del Papiloma Humano (VPH)

International Agency for Research on Cancer (IARC)

Principal factor de Riesgo

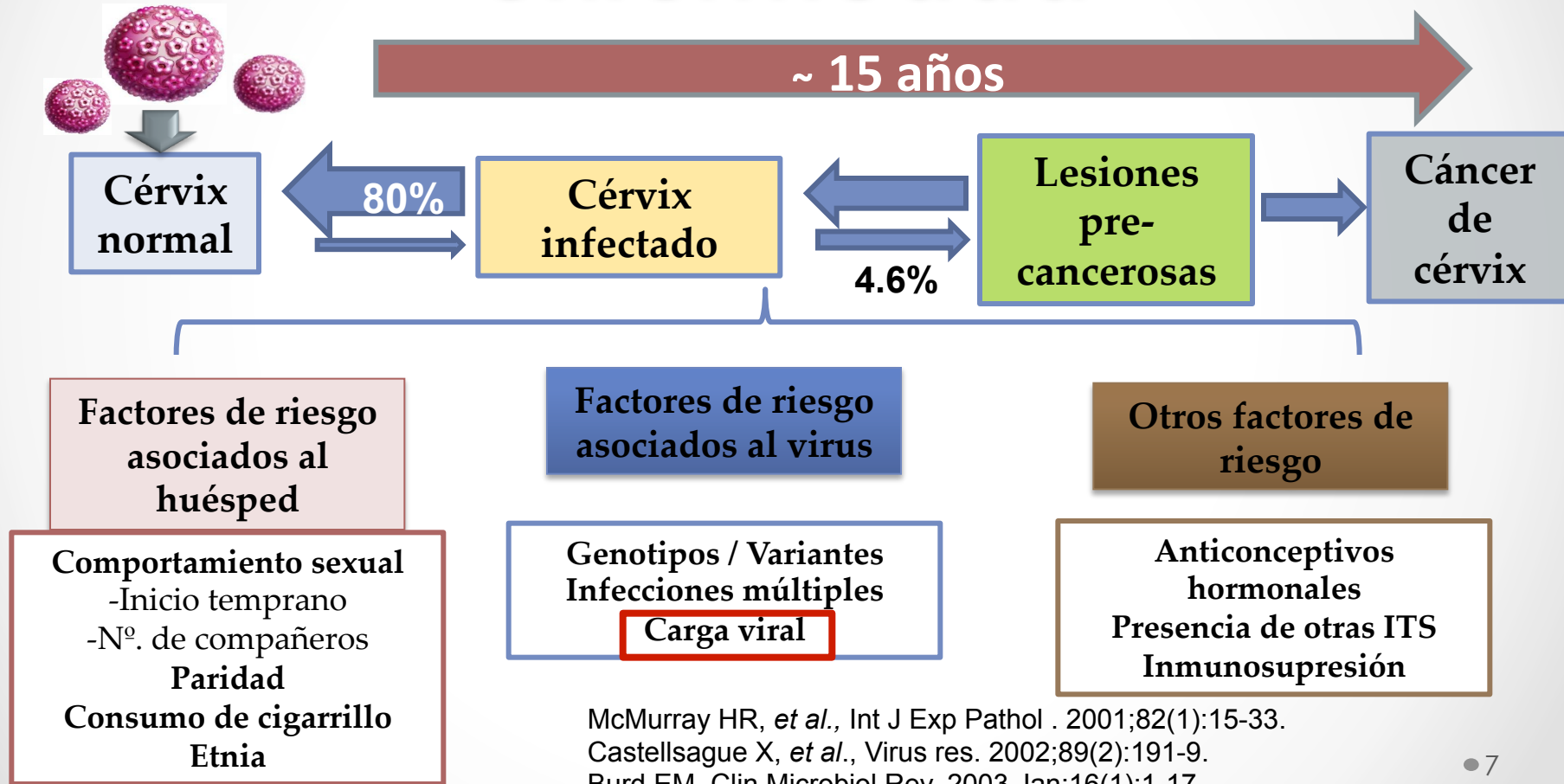


<http://visualscience.ru/en/projects/human-papillomavirus/3d-model/>



Schiffman, M., et al., J Natl Cancer Inst, 2011. 103(5): p. 368-83

Historia natural de la enfermedad



Pruebas de identificación de CC

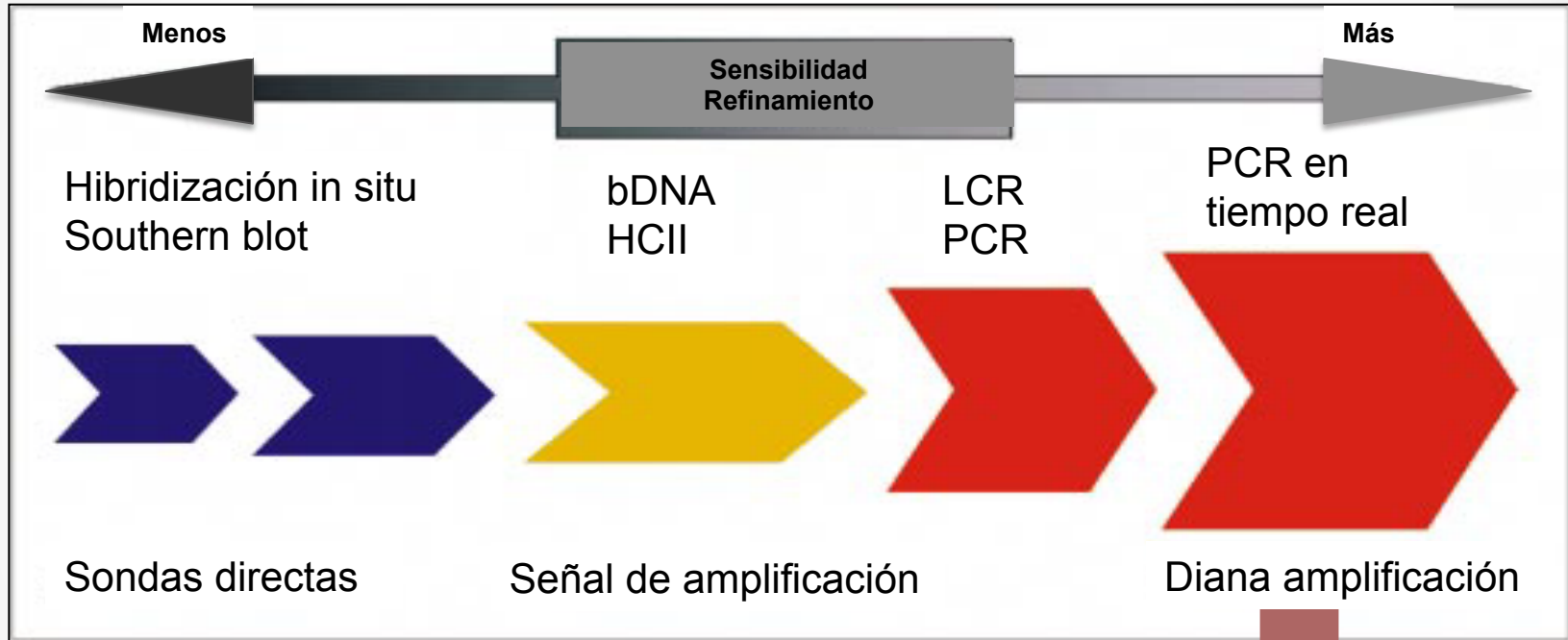
CITOLOGÍA CERVICAL

- Prueba de tamización anormalidad
 - Bajo costo
- Especificidad (95 - 98%)
- Sensibilidad baja y variable (41 - 73%)
- Falsos negativos

DETECCIÓN DE VPH

- Cualquier momento
- Mujeres en riesgo previo a la aparición de lesiones
- Alta sensibilidad y especificidad

Identificación VPH



Antecedentes PCR tiempo real Introducción

Journal of Virological Methods 187 (2013) 345–351

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet



Simultaneous detection, typing and quantitation of oncogenic human papillomavirus by multiplex consensus real-time PCR

Andrew Jenkins^{*,2}, Anne-Gry Allum^{1,2}, Linda Strand¹, Randi Kersten Aakre¹

Unilabs Teletab AS, Skien, Norway

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2003, p. 3221–3228
0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.7.3221-3228.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 41, No. 7

Real-Time PCR-Based System for Simultaneous Quantification of Human Papillomavirus Types Associated with High Risk of Cervical Cancer

Martin Moberg, Inger Gustavsson, and Ulf Gyllensten*

Department of Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala University, SE-751 85 Uppsala, Sweden

British Journal of Cancer (2005) 92, 2195–2200
© 2005 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/05 \$30.00
www.bjcancer.com

Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN)

S Andersson^{*,1}, H Safari², M Mints¹, I Lewensohn-Fuchs², U Gyllensten³ and B Johansson²

¹Institute for Clinical Science, Division of Obstetrics and Gynaecology, Karolinska University Hospital, Huddinge, Karolinska Institute, 141 86 Stockholm, Sweden; ²Division of Clinical Virology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska University Hospital at Huddinge, Karolinska Institute, 141 86 Stockholm, Sweden; ³Department of Genetics and Pathology, Section of Medical Genetics, Rudbeck Laboratory, University of Uppsala, 751 85 Uppsala, Sweden

British Journal of Cancer (2005) 92, 891–894
© 2005 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/05 \$30.00
www.bjcancer.com



Short Communication

High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma

M Moberg¹, I Gustavsson¹, E Wilander¹ and U Gyllensten^{*,1}

¹Department of Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala University, Uppsala 751 85, Sweden

Antecedentes PCR tiempo real-CC



Journal of Clinical Virology 35 (2006) 264–269



www.elsevier.com/locate/jcv

Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China

Yuping Wu^{a,*}, Yulong Chen^a, Longyu Li^b, Guifang Yu^c, Yanling Zhang^b, Ying He^a

^a State Key Laboratory of Biocontrol, Key Laboratory of Genetic Engineering of MOE, Department of Biochemistry, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, PR China

^b Department of Oncology, Maternal and Child Health Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, PR China

^c Department of Gynecology, People Hospital of Zhuhai, Guangdong Province, PR China

Received 7 April 2005; received in revised form 15 July 2005; accepted 30 July 2005

Fuerte
asociación carga
viral alta con
CIS

Carga viral podría
predecir un riesgo
futuro de
desarrollo de CC-

Uso marcadores
adicionales para
identificar
mujeres en riesgo

Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women

Dulce M. Hernández-Hernández,^{a,*} Laura Ornelas-Bernal,^a Miriam Guido-Jiménez,^{b,c}
Teresa Apresa-García,^a Isabel Alvarado-Cabrero,^a Mauricio Salcedo-Vargas,^a
Alejandro Mohar-Betancourt,^{b,c} and Alejandro García-Carranca^{b,c}

^a Medical Research Unit in Oncology Diseases, Pathology Department, Oncology Hospital, Centro Médico Siglo XXI,
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

^b Division of Research, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Mexico City, Mexico

^c Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Received 18 September 2002

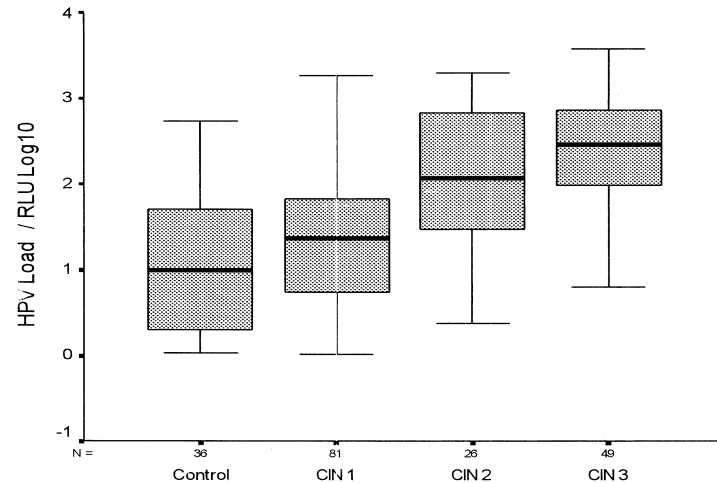


Fig. 3. Human papilloma virus DNA load in CIN lesion degree. Median viral load shows significant differences between them (Kruskal-Wallis test X²).

Incremento de la carga viral
proporcional a estadios más
avanzados de las lesiones,
NIC 2-3

Mayor riesgo incidencia
CC, por infecciones
persistentes con alta
carga viral

Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study

Nathalie Ylitalo, Per Sørensen, Agnetha M Josefsson, Patrik K E Magnusson, Per Kragh Andersen, Jan Pontén, Hans-Olov Adami, Ulf B Gyllensten, Mads Melbye

Mujeres con alta carga viral tienen 30 veces más riesgo de CC

CIS se asocia a infecciones por VPH-16 con carga viral alta persistente

Mujeres en riesgo se pueden identificar con PCR adicional a la citología.

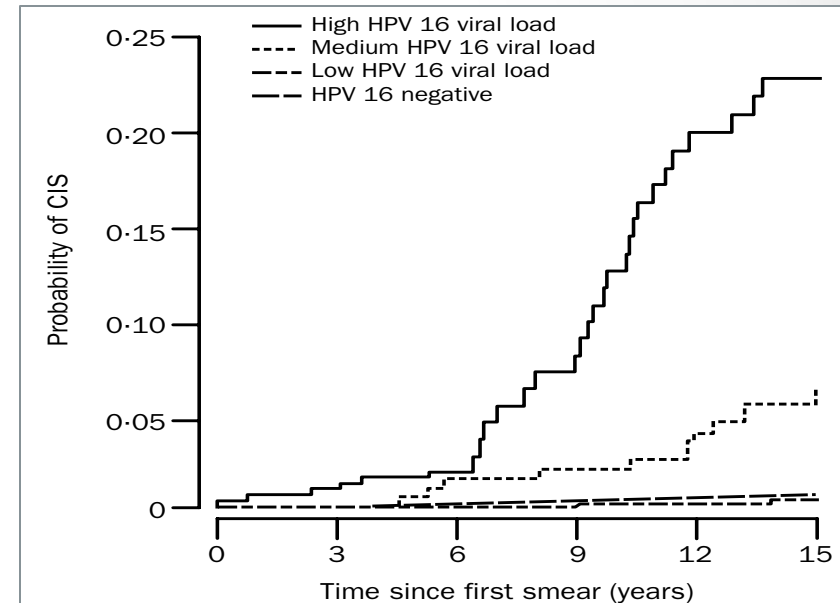
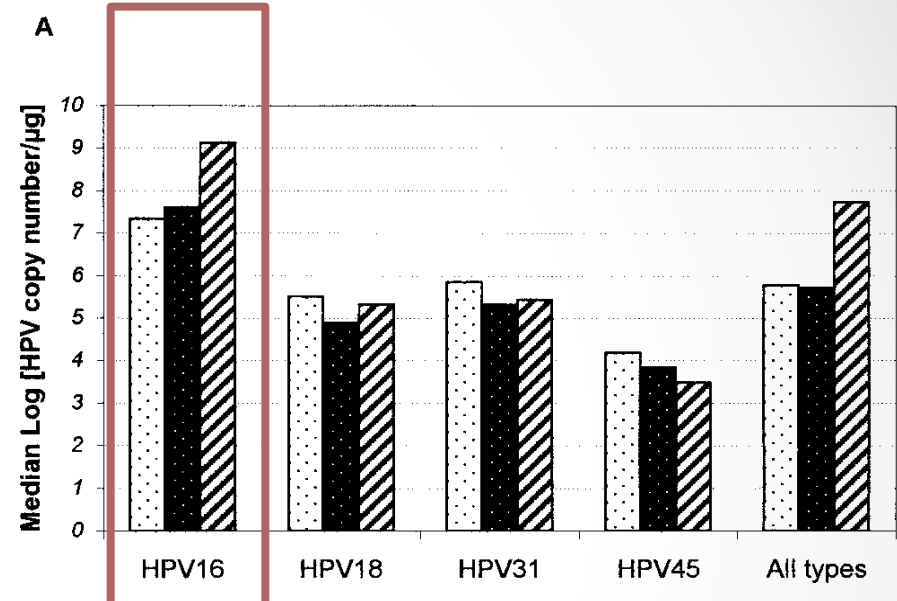
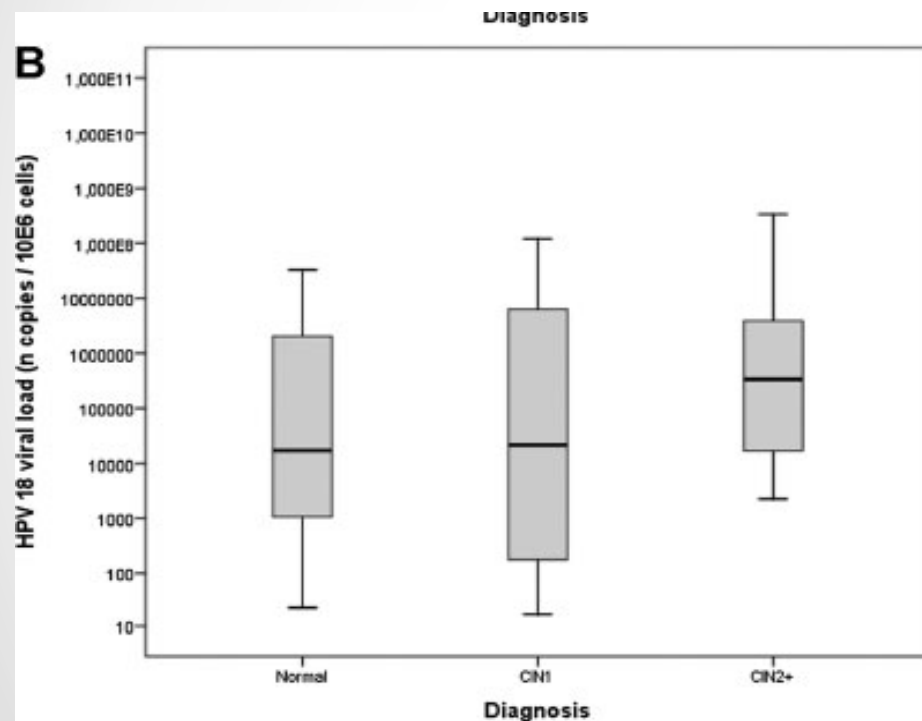


Figure 2: **Probability of developing cervical carcinoma in situ in relation to HPV 16 viral load of first smear among women younger than 25 years at time of first smear**

CIS=cervical carcinoma in situ.

Representación de la media de la carga viral de VPH-18.



Carga viral de VPH-AR estratificada por tipo y muestra histológica.

p 0.03

Incidence, Duration, and Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Colombian Women with Normal Cytological Results

Nubia Muñoz,¹ Fabián Méndez,² Héctor Posso,¹ Mónica Molano,¹ Adrian J. C. van den Brule,^{3*} Margarita Ronderos,¹ Chris Meijer,³ and Álvaro Muñoz,⁴ for the Instituto Nacional de Cancerología HPV study group[†]

[†]Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, and ²Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, Cali, Colombia; ³Department of Pathology, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; ⁴Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland

JID 2004;190 (15 December)

Determinants of Clearance of Human Papillomavirus Infections in Colombian Women with Normal Cytology: A Population-based, 5-Year Follow-up Study

Am J Epidemiol 2003;158:486-494

Monica Molano^{1,2}, Adriaan van den Brule¹, Martyn Plummer³, Elisabete Weiderpass³, Hector Posso², Annie Arslan³, Chris J. L. M. Meijer¹, Nubia Muñoz³, Silvia Franceschi³, and the HPV Study Group

¹ Department of Pathology, Vrije Universiteit Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands.

² Division de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia.

³ International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study

THE LANCET • Vol 359 • March 30, 2002 • www.thelancet.com

Nubia Muñoz, Silvia Franceschi, Cristina Bosetti, Victor Moreno, Rolando Herrero, Jennifer S Smith, Keerti V Shah, Chris J L M Meijer, F Xavier Bosch, for the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group*

Infección VPH: 6,2/100 mujeres

- 5,0: VPH-AR
- Restante: VPH-BR

Prevalencia de VPH /edad

- mujeres < 20 años: 26,1%
- mujeres entre 45-54 años: 3%
- mujeres = o > 55 años: 13,2%

Bogotá: 20-30% de mujeres coinfección

Cauca: 36% infección por VPH

Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women

N Muñoz¹, G Hernandez-Suarez^{*1}, F Méndez^{1,2}, M Molano¹, H Posso¹, V Moreno³, R Murillo¹, M Ronderos¹, C Meijer⁴ and Á Muñoz⁵ for the INC HPV Study Group

¹Subdirección de Investigaciones y Salud Pública, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia; ²Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, Cali, Colombia; ³Cancer Epidemiology Service, Instituto Catalán de Oncología, Barcelona, Spain; ⁴Department of Pathology, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; ⁵Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, USA

Carga viral:
Principal
determinante de
persistencia

Persistencia de un tipo
como VPH-16, mayor
riesgo en el desarrollo
de lesiones de alto
grado



British Journal of Cancer (2009) 100, 1184–1190


© 2009 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/09 \$32.00

Cargas virales otros
tipos de VPH-AR?

Pregunta de investigación

¿Existe asociación entre la carga viral de seis tipos de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo y la presencia de lesiones escamosas intraepiteliales en mujeres Colombianas?

Justificación



CC 528.000 casos nuevos y 266.000 muertes (2012)
Incidencia 18,7 - mortalidad 8 / 100,000 mujeres/ año
(Colombia)



Cuantificación VPH clínicamente importante



Persistencia de infección y carga viral aumenta
progresión de lesiones cervicales



Información actual no consistente, solo datos para
VPH-16, técnicas cualitativas



Estudio previo en Colombia no incluye tipos virales
más prevalentes

Justificación

- Caracterización del comportamiento del VPH, la prevalencia, la distribución tipo-específica y la relación con factores de riesgo.
- Ampliar conocimiento y contribución en el mejoramiento de los programas de promoción y prevención que contemplen la detección y tipificación de VPH, la cuantificación de la carga viral, entre otros.
- Identificación temprana de mujeres en riesgo de desarrollar CC.
- Contribuir en la reducción de la incidencia y mortalidad debida al CC.

Objetivo General

Identificar la asociación entre la carga viral de seis tipos de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR) y la frecuencia de lesiones escamosas intraepiteliales en mujeres colombianas.

Objetivos Específicos

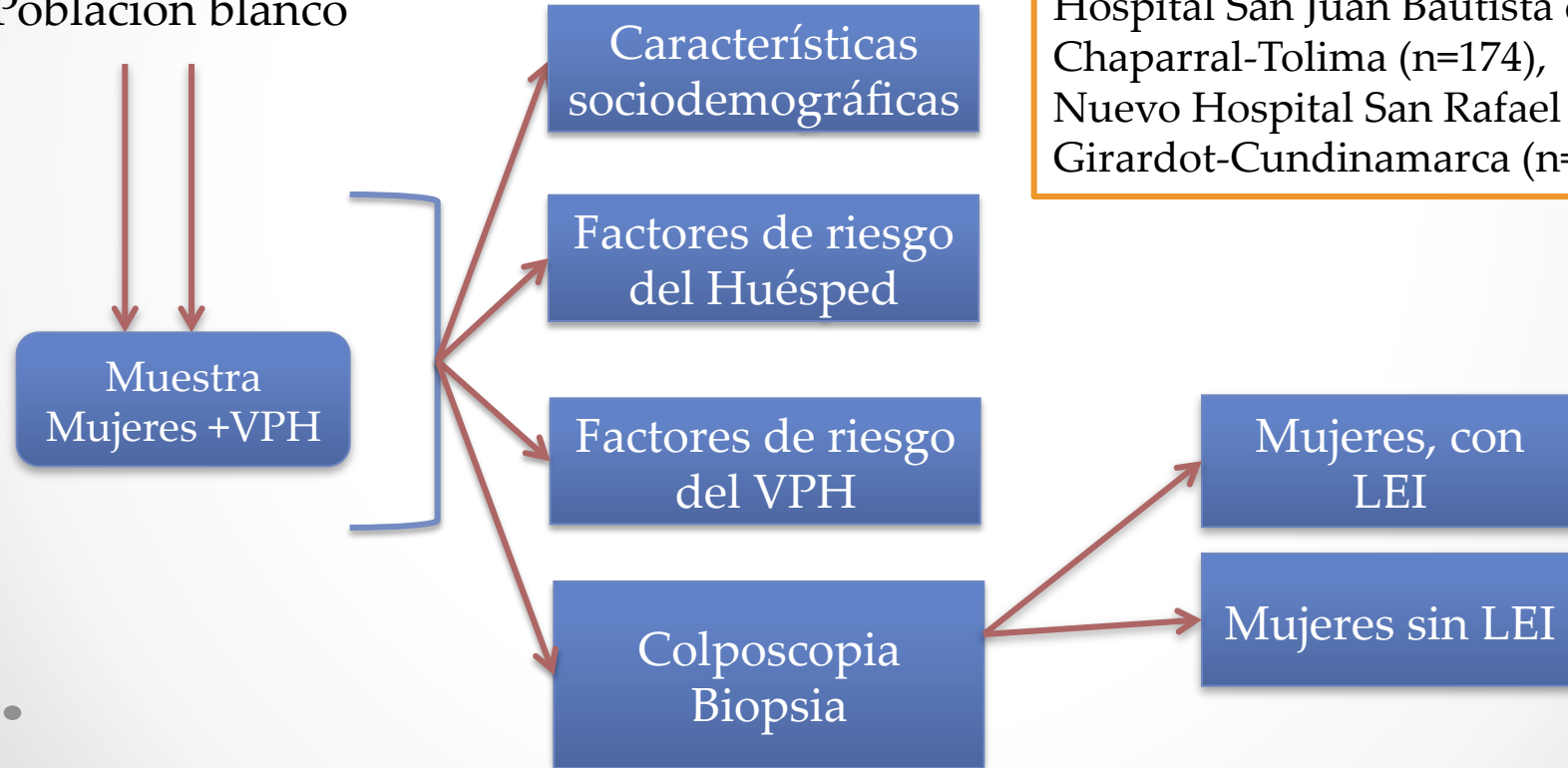
1. Describir las características sociodemográficas de las mujeres participantes en el estudio.
2. Identificar los factores de riesgo presentes en dos grupos de mujeres (con y sin lesiones cervicales) y determinar si existen diferencias entre éstos.
3. Determinar las prevalencias tipo-específicas para seis tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) en mujeres provenientes de diferentes regiones del país.

Objetivos Específicos

4. Cuantificar el ADN genómico y el número de copias virales presentes en muestras cervicales de las mujeres incluidas en el estudio.
5. Establecer las diferencias existentes en la distribución de la carga viral de seis tipos de VPH entre mujeres con y sin lesiones cervicales.

Metodología

Población blanco



266 mujeres estudio longitudinal multicéntrico, Abril 2007- Marzo del 2010

Hospital de Engativá de Bogotá (n=921),

Hospital San Juan Bautista de Chaparral-Tolima (n=174),

Nuevo Hospital San Rafael de Girardot-Cundinamarca (n=334)

Tamaño de muestra

Diferencia de proporciones
Alta carga viral mujeres con y
sin LEI
0.42 - 0.052
Significancia 0.05
Poder estadístico 90%
Razón entre los dos grupos 1:2

Al menos 23 mujeres con LEI y
46 mujeres sin LEI
60 mujeres con LEI y 120
mujeres sin LEI
Emparejadas por edad (+/- 5
años) y fecha de ingreso al
estudio multicéntrico.

Criterios de inclusión/ exclusión

- Mujeres entre 18 y 62 años+ consentimiento informado
 - Información completa.
 - Resultado de colposcopia verificable
- Positivas para infección por VPH por PCR convencional
 - Muestra suficiente

Excluidas aquellas sin amplificación del gen *HMBS* mediante PCR en tiempo real.

Comités de ética

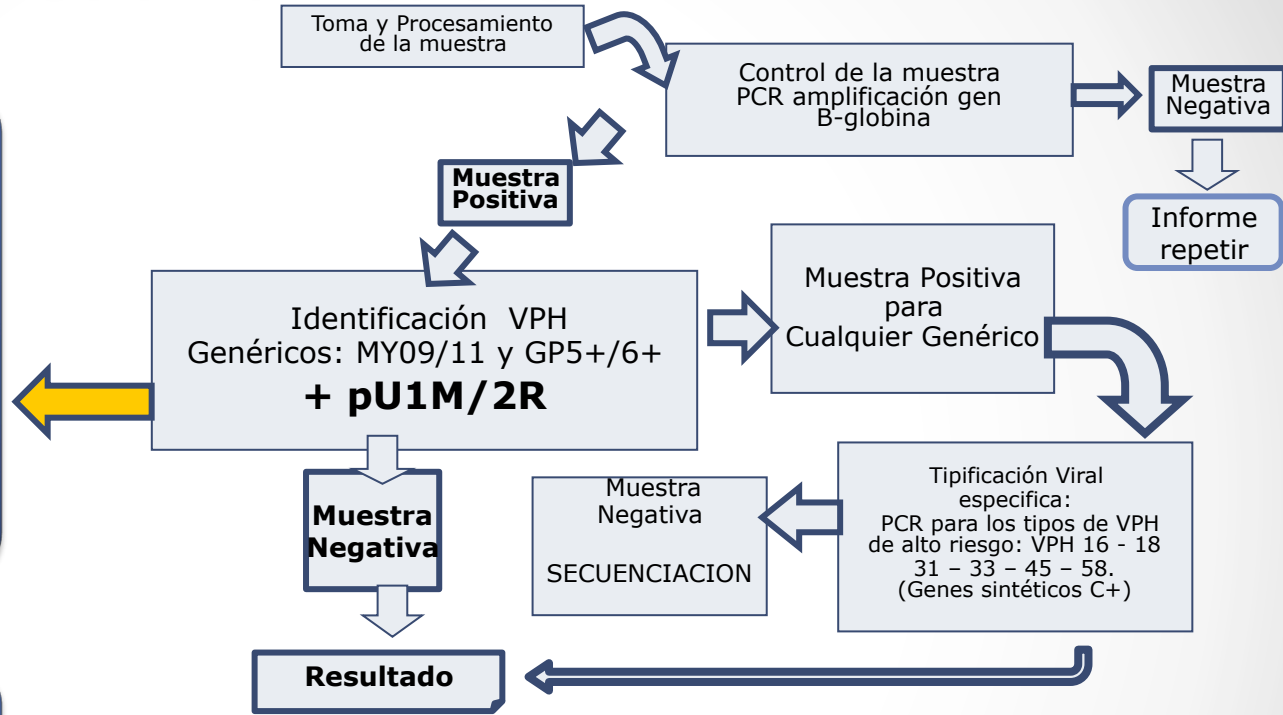
- Aprobación comités de ética:
 - Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
 - Nuevo Hospital San Rafael E.S.E, Girardot
 - Hospital San Juan Bautista de Chaparral E.S.E.
 - Hospital de Engativá (level II)

Tipificación y cuantificación VPH

Muestras VPH + identificadas por metodología anterior

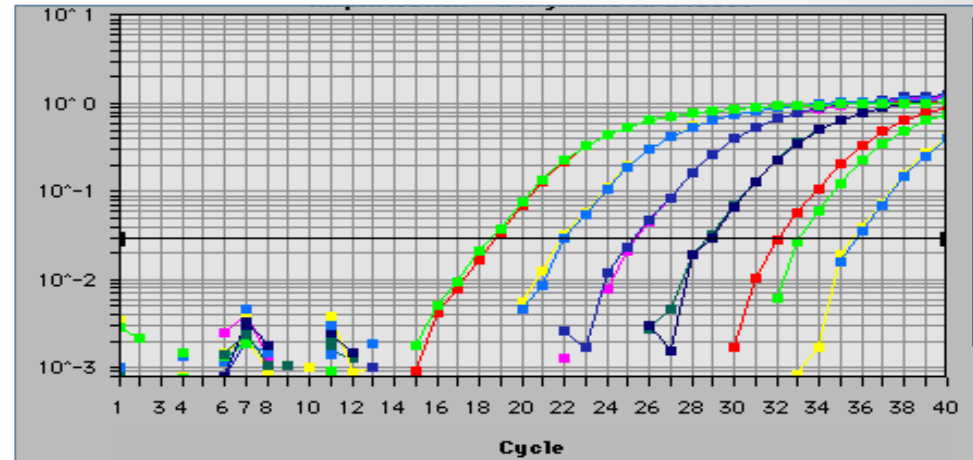
Criterios de inclusión

Cuantificación (PCR-tiempo real)



Construcción curvas de calibración (diluciones seriadas 1:10)

Optimización PCR-Tiempo real



Coeficiente de correlación: 0.926 - 0.995

Eficiencia: 0.90 - 1.10

Precisión: desviación estándar entre los triplicados máximo 0.5

Rango dinámico: 6 puntos de diluciones seriadas 1:10

4 Reacciones PCR-tiempo real por muestra

- FAM – VPH 16 E7

Reacción 1



- Cy5 - VPH 18 E1
- HEX - VPH 31 E6

Reacción 2



- FAM - VPH 33 E7
- Cy5 - VPH 45 E1

Reacción 3



- HEX - VPH 58 E7
- FAM - *HMBS*

Reacción 4




$$\text{Carga viral normalizada de VPH} = \frac{\text{Número de copias virales}}{\text{Número de copias } HMBS/2}$$

Análisis estadístico

“Software Validación de registros para el estudio del VPH” (Siscomputo Ltda. – FIDIC)



Datos detección y cuantificación 6 tipos de VPH (carga viral absoluta y normalizada)



Base de datos (+ carga viral en log₁₀)

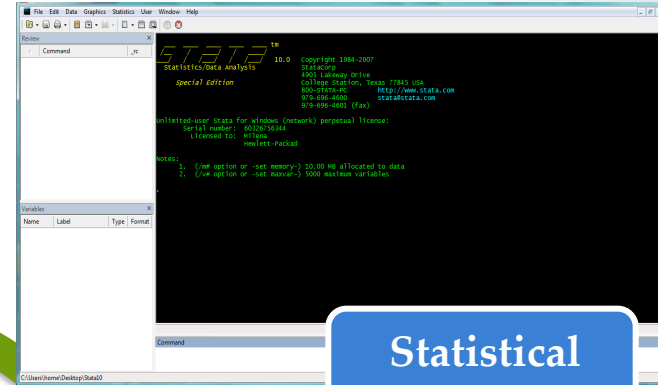
Análisis estadístico

LEI (LEI-AG
+ LEI-BG) –
sin LEI

Cargas
virales-
Factores de
riesgo

Frecuencias y
proporciones, χ^2 o
Fisher: categóricas.

Medianas y rangos
intercuártiles, Mann-
Whitney U o Kruskal
Wallis: Continuas



Statistical
analysis
STATA 10[®]

Carga viral absoluta:
negativa: ≤ 0 copias
baja : $0 < VL \leq 10^5$ copias
alta: $> 10^5$ copias virales

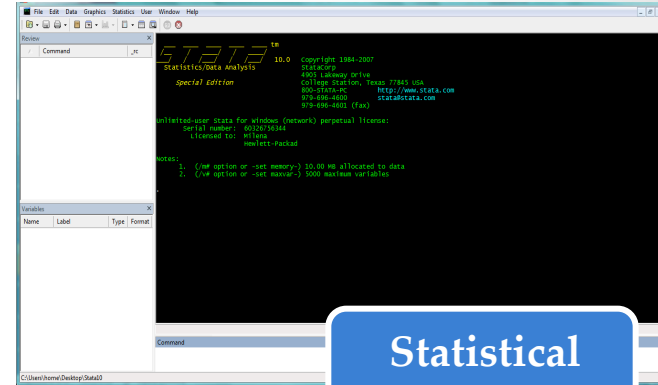
Análisis estadístico

Carga viral de
cada tipo y la
frecuencia de las
lesiones
cervicales

Regresión
logística
condicional

Significancia
0.05.

OR crudos y
ajustados (origen,
raza, edad inicio de
relaciones sexuales
y número de tipos
virales detectados)-
IC 95%

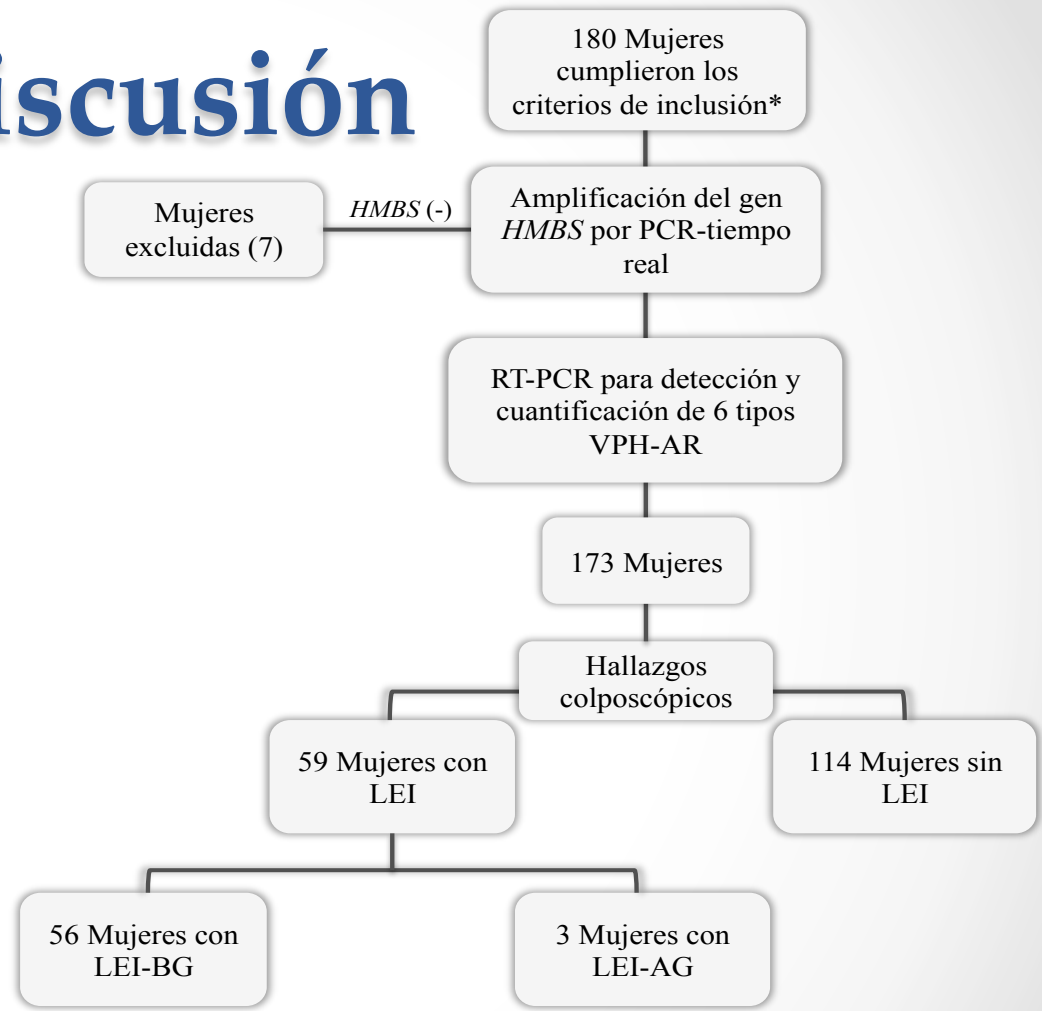


Statistical
analysis
STATA 10®

Los resultados se presentan discriminando de acuerdo a cada objetivo específico y a continuación la discusión correspondiente.

Resultados-Discusión

Diagrama de flujo de la muestra estudiada



PCR- tiempo real: polymerase chain reaction; HMBS: hydroxymethylbilane synthase; VPH-AR: virus del papilloma humano de alto riesgo; LEI: lesión escamosa intraepitelial; LEI-BG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEI-AG: lesión escamosa intraepitelial de alto grado

Objetivos Específicos

1. Describir las características sociodemográficas de las mujeres participantes en el estudio.
2. Identificar los factores de riesgo presentes en dos grupos de mujeres (con y sin lesiones cervicales) y determinar si existen diferencias entre éstos.
3. Determinar las prevalencias tipo-específicas para seis tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) en mujeres provenientes de diferentes regiones del país.

Distribución de características sociodemográficas y factores de riesgo.

Mediana de edad con LEI 40 años (RIC 14 años)
sin LEI fue de 41.5 años (RIC 13 años)

Característica	Categorías	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)		Mujeres sin LEI (n =114)		p
				n	%	n	%	
Edad, años	<30	29	16.76	11	18.64	18	15.79	0.493
	30-40	54	31.21	21	35.59	33	28.95	
	> 40	90	52.02	27	45.76	63	55.26	
Origen	Bogotá	65	37.57	32	54.24	33	28.95	0.001*
	Chaparral	3	1.73	2	3.39	1	0.88	
	Girardot	105	60.69	25	42.37	80	70.18	
Ingreso mensual	≤ SMMLV	155	89.60	53	89.83	102	89.47	0.942
	> SMMLV	18	10.40	6	10.17	12	10.53	
Escolaridad	Analfabeta	1	0.58	1	1.69	0	0.00	0.094
	Primaria	82	47.40	22	37.29	60	52.63	
	Secundaria	74	42.77	28	47.46	46	40.35	
	Universitaria	10	5.78	6	10.17	4	3.51	
	Técnica	6	3.47	2	3.39	4	3.51	
Etnia	Indígena	2	1.16	0	0.00	2	1.75	0.321
	Blanca	4	2.31	2	3.39	2	1.75	
	Mestiza	166	95.95	56	94.92	110	96.49	
	Negra	1	0.58	1	1.69	0	0.00	
Estado civil	Soltera	17	9.83	4	6.78	13	11.40	0.673
	Casada	20	11.56	7	11.86	13	11.40	
	Divorciada	8	4.62	4	6.78	4	3.51	
	Unión libre	126	72.83	43	72.88	83	72.81	
	Viuda	2	1.16	1	1.69	1	0.88	
Régimen de afiliación a salud	Vinculado-Subsidiado	159	91.91	52	88.14	107	93.86	0.191
	Contributivo-Particular	14	8.09	7	11.86	7	6.14	

Distribución de características sociodemográficas y factores de riesgo.

Característica	Categorías	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)		Mujeres sin LEI (n =114)		p
				n	%	n	%	
Consumo de cigarrillo	No	146	84,39	49	83,05	97	85,09	0,726
	Si	27	15,61	10	16,95	17	14,91	
Edad primera relación sexual, años	< 16	41	23,70	10	16,95	31	27,19	0,202
	16-19	82	47,40	33	55,93	49	42,98	
	> 19	50	28,90	16	27,12	34	29,82	
No. Compañeros sexuales	1	72	41,62	26	44,07	46	40,35	0,868
	2-3	84	48,55	27	45,76	57	50,00	
	> 3	17	9,83	6	10,17	11	9,65	
Método de planificación	Ninguno	65	37,57	19	32,20	46	40,35	0,697
	Quirúrgico	52	30,06	15	25,42	22	19,30	
	Hormonal	19	10,98	18	30,51	34	29,82	
	De barrera	37	21,39	7	11,86	12	10,53	
Gestaciones	0	4	2,31	1	1,69	3	2,63	0,326
	1-2	76	43,93	28	47,46	48	42,11	
	3-4	74	42,77	27	45,76	47	41,23	
	> 4	19	10,98	3	5,08	16	14,04	
Partos	0	7	4,05	2	3,39	5	4,39	0,852
	1-2	95	54,91	35	59,32	60	52,63	
	3-4	66	38,15	21	35,59	45	39,47	
	> 4	5	2,89	1	1,69	4	3,51	
Abortos	No	82	47,40	27	45,76	55	48,25	0,757
	Si	91	52,60	32	54,24	59	51,75	
Menopausia	No	148	85,55	53	89,83	95	83,33	0,249
	Si	25	14,45	6	10,17	19	16,67	
ITS c	No	137	79,19	47	79,66	90	78,95	0,913
	Si	36	20,81	12	20,34	24	21,05	
Resultado de citología	Normal	161	93,06	55	93,22	106	92,98	0,612
	Anormal	12	6,94	4	6,78	8	7,02	

Prevalencias tipo-específicas de VPH



Rta inmune del huésped
Aspectos genéticos de cada población
Características específicas del medio ambiente

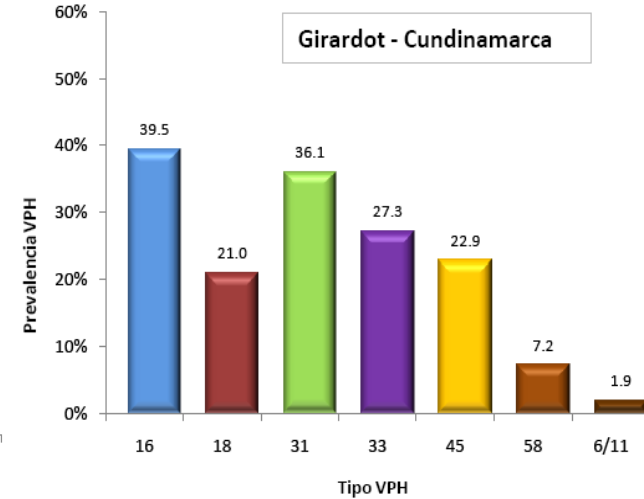
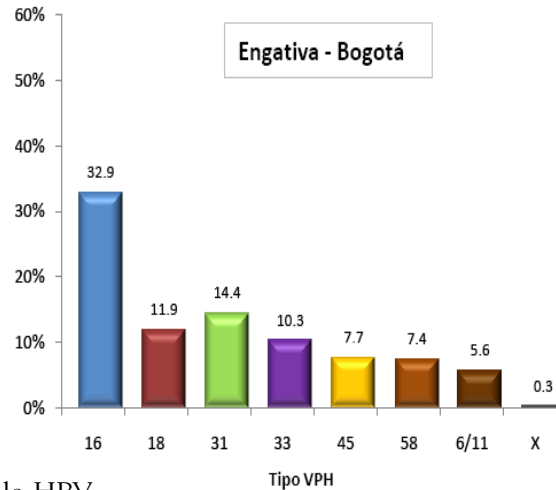
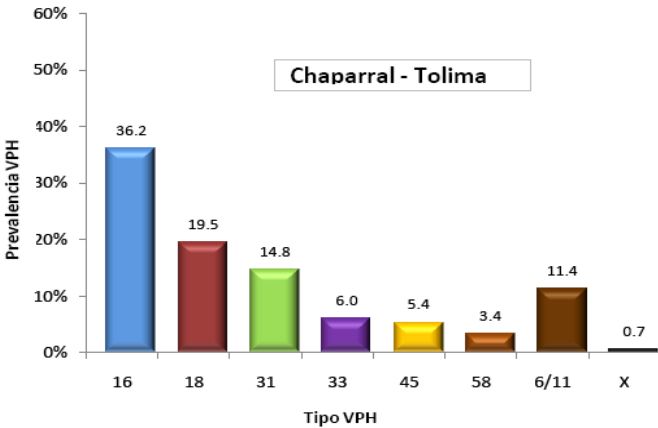


TABLE 2. Relative frequency of single and multiple HPV infections with the types evaluated in this study, according to the different regions

Region	Without infection n (%)*	Single infection n (%)*	Multiple infections n (%)*	Total
Leticia-Amazonas	54 (38.9)	19 (13.7)	66 (47.4)	139
Chaparral-Tolima	68 (45.6)	31 (20.9)	50 (33.5)	149
Engativá-Bogotá	429 (53.8)	153 (19.3)	214 (26.9)	796
Girardot-Cundinamarca	155 (48.4)	19 (6.0)	146 (45.6)	320
Tumaco-Nariño	207 (51.0)	94 (23.2)	105 (25.8)	406
Total	913 (50.4)	316 (20.2)	581 (29.4)	1,810

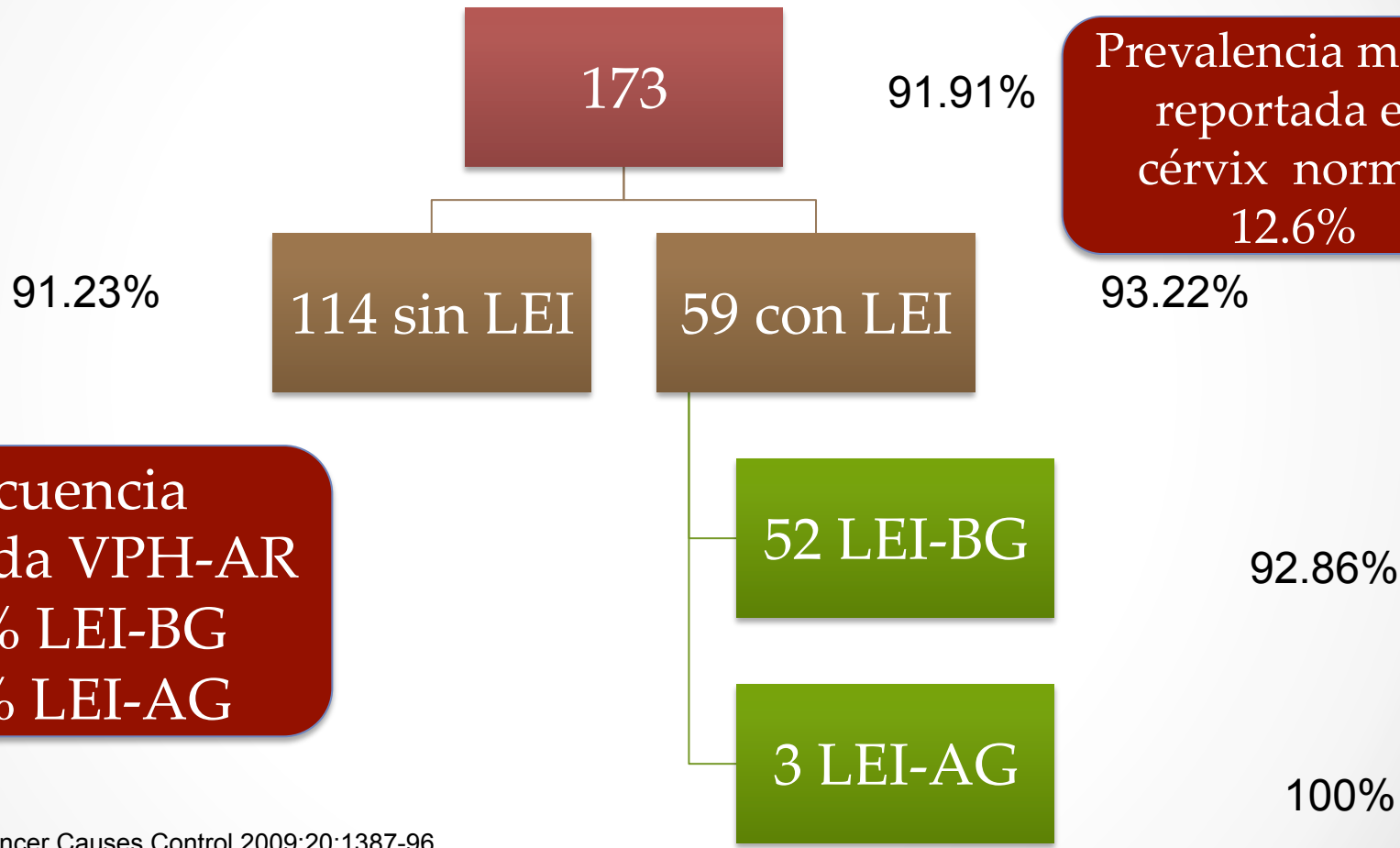
*Percentages are calculated by rows.

IM > en Girardot, tiempo para clearance < en Girardot (especie A9) y distribución tipo específica.

Objetivos Específicos

1. Describir las características sociodemográficas de las mujeres participantes en el estudio.
2. Identificar los factores de riesgo presentes en dos grupos de mujeres (con y sin lesiones cervicales) y determinar si existen diferencias entre éstos.
3. Determinar las prevalencias tipo-específicas para seis tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) en mujeres provenientes de diferentes regiones del país.

Infección por VPH



Prevalencia media reportada en cérvix normal 12.6%

Frecuencia reportada VPH-AR
52.3% LEI-BG
79.4% LEI-AG

Moore RA, et al. Cancer Causes Control 2009;20:1387-96
Poljak M, et al. Vaccine 2013;31 Suppl 7:H59-70..

99.7% de casos de CC, están asociados a la infección con VPH

Prevalencias de VPH mayores a las reportadas en la literatura

- Criterio inclusión
- Alta prevalencia de VPH con PCR en tiempo real en mujeres sin LEI

Prevalencia de VPH en mujeres con anomalías cervicales, aumenta proporcionalmente a la severidad de las lesiones

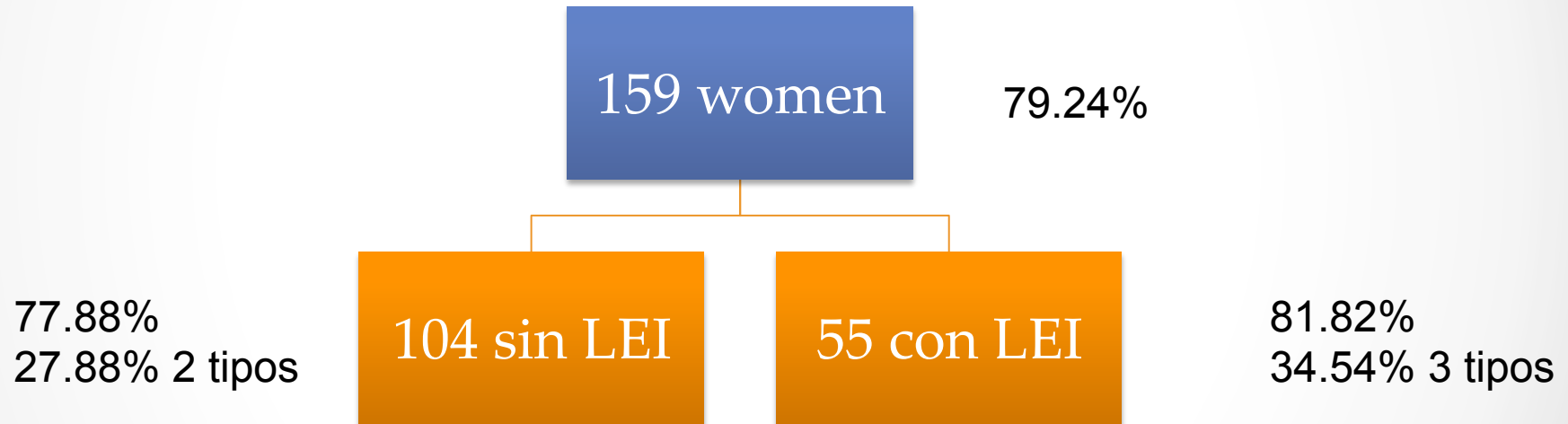
Table 2
Prevalence of high-risk HPV infection in cervical lesions in China

Categories	No. of cases tested (n)	Number positive (n)	Positive rate (%)	HPV DNA viral load (X ± S.D.)
Healthy controls	68	17	25.0	161.9 ± 856.3
Cervicitis	139	46	33.1	155.2 ± 556.7
CIN1	48	33	68.8	214.8 ± 447.4
CIN2	122	98	80.3	352.7 ± 611.6
CIN3	92	83	90.2	285.7 ± 478.2
CIS	66	60	90.9	303.7 ± 512.3
CC	475	427	89.9	434.9 ± 673.8

CIN, cervical intraepithelial neoplasia; CIS, cervical cancer in situ; CC, invasive cervical cancer.

Infección Múltiple

VPH-18 y VPH-16 +frecuentes



España y China, mujeres con lesiones cervicales, son variables (16.3% – 55%)

A nivel mundial hasta un 3.4% mujeres sin lesiones.

COLOMBIA (estudios previos)
 78.0% en mujeres sin lesiones,
 71.4% - 85.7%, en mujeres con lesiones,
 con una menor frecuencia a mayor
 grado de severidad de las lesiones
 65.2% (CI95%: 62%–68.3%)

Diferencias en el diseño de los estudios, tamaños de muestra, los métodos de detección de VPH empleados y la población en estudio (Factores geográficos, demográficos y clínicos).
 Consistencia con estudios previos que han usado PCR en tiempo real.

Selva L, et al. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009;64(4):416-21.

Zhang R, et al. Cancer epidemiology. 2013;37(6):939-45.

Garcia DA, Open Virol J. 2011;5:70-9.

Soto-De Leon S, et al. PLoS One. 2011;6(2):e14705.

Distribución tipo-específica

Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada.

Tipo VPH	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)						Mujeres sin LEI (n=114)						p
			Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
VPH-16	86	49,71	25	42,37	12	20,34	22	37,29	62	54,39	13	11,40	39	34,21	0,186
VPH-18	117	67,63	18	30,51	10	16,95	31	52,54	38	33,33	18	15,79	58	50,88	0,928
VPH-31	71	41,04	40	67,80	1	1,69	18	30,51	62	54,39	5	2,63	49	42,98	0,257
VPH-33	14	8,09	54	91,53	0	0,00	5	8,47	105	92,11	1	0,88	8	7,02	0,846
VPH-45	67	38,73	36	61,02	9	15,25	14	23,73	70	61,40	10	8,77	34	29,82	0,366
VPH-58	56	32,37	42	71,19	7	11,86	10	16,95	75	65,79	16	14,04	23	20,18	0,772
VPH-AR	159	91,91	4	6,78	8	13,56	47	79,66	10	8,77	12	10,53	92	80,70	0,777

69.49% en mujeres con LEI y 66.66% en mujeres sin LEI

Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados; LEI: lesión escamosa intraepitelial. *Carga viral VPH: categorizada como ' ≤ 0 copias virales = negativa, $0 < VL \leq 10^5$ copias virales = baja carga viral, $> 10^5$ copias virales = alta carga viral.

Distribución tipo-específica

Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada.

Tipo VPH	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)						Mujeres sin LEI (n=114)						p
			Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
VPH-16	86	49,71	25	42,37	12	20,34	22	37,29	62	54,39	13	11,40	39	34,21	0,186
VPH-18	117	67,63	18	30,51	10	16,95	31	52,54	38	33,33	18	15,79	58	50,88	0,928
VPH-31	71	41,04	40	67,80	1	1,69	18	30,51	62	54,39	3	2,63	49	42,98	0,257
VPH-33	14	8,09	54	91,53	0	0,00	5	8,47	105	92,11	1	0,88	8	7,02	0,846
VPH-45	67	38,73	36	61,02	9	15,25	14	23,73	70	61,40	10	8,77	34	29,82	0,366
VPH-58	56	32,37	42	71,19	7	11,86	10	16,95	75	65,79	16	14,04	23	20,18	0,772
VPH-AR	159	91,91	4	6,78	8	13,56	47	79,66	10	8,77	12	10,53	92	80,70	0,777

VPH-16 (57.63%) y VPH-45 (38.98%)

Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados; LEI: lesión escamosa intraepitelial. *Carga viral VPH: categorizada como ' ≤ 0 copias virales = negativa, $0 < VL \leq 10^5$ copias virales = baja carga viral, $> 10^5$ copias virales = alta carga viral.

Distribución tipo-específica

Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada.

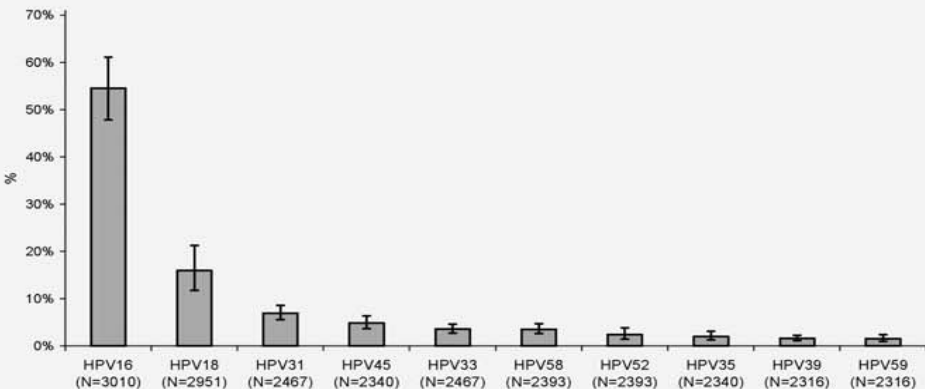
Tipo VPH	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)						Mujeres sin LEI (n=114)						p
			Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
VPH-16	86	49,71	25	42,37	12	20,34	22	37,29	62	54,39	13	11,40	39	34,21	0,186
VPH-18	117	67,63	18	30,51	10	16,95	31	52,54	38	33,33	18	15,79	58	50,88	0,928
VPH-31	71	41,04	40	67,80	1	1,69	18	30,51	62	54,39	3	2,63	49	42,98	0,257
VPH-33	14	8,09	54	91,53	0	0,00	5	8,47	105	92,11	1	0,88	8	7,02	0,846
VPH-45	67	38,73	36	61,02	9	15,25	14	23,73	70	61,40	10	8,77	34	29,82	0,366
VPH-58	56	32,37	42	71,19	7	11,86	10	16,95	75	65,79	16	14,04	23	20,18	0,772
VPH-AR	159	91,91	4	6,78	8	13,56	47	79,66	10	8,77	12	10,53	92	80,70	0,777

VPH-16 (45.61%), VPH-31 (45.61%) y VPH-45 (38.60%)

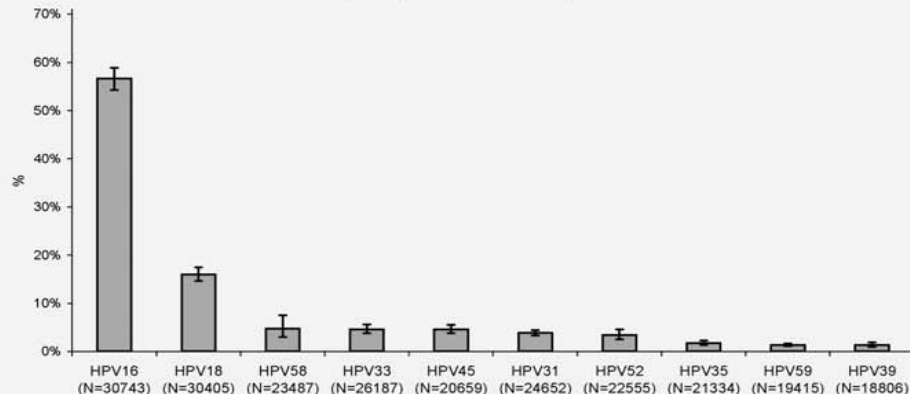
Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados; LEI: lesión escamosa intraepitelial. *Carga viral VPH: categorizada como ' ≤ 0 copias virales = negativa, $0 < VL \leq 10^5$ copias virales = baja carga viral, $> 10^5$ copias virales = alta carga viral.

**VPH-16 y VPH-18
responsables del 70% de los casos de CC**

**South/Central America
(HPV prevalence 91.1%)**

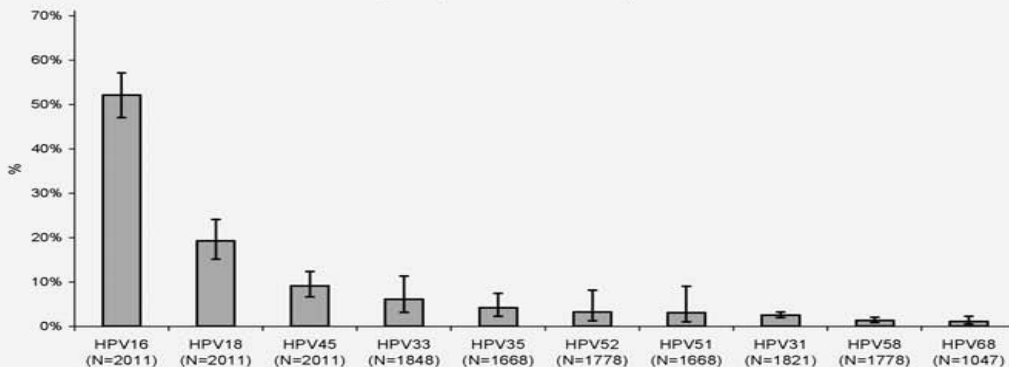


**All ICC cases
(HPV prevalence 89.9%)**



Distribución
tipo-específica
varía alrededor
del mundo

**Africa
(HPV prevalence 94.2%)**



Objetivos Específicos

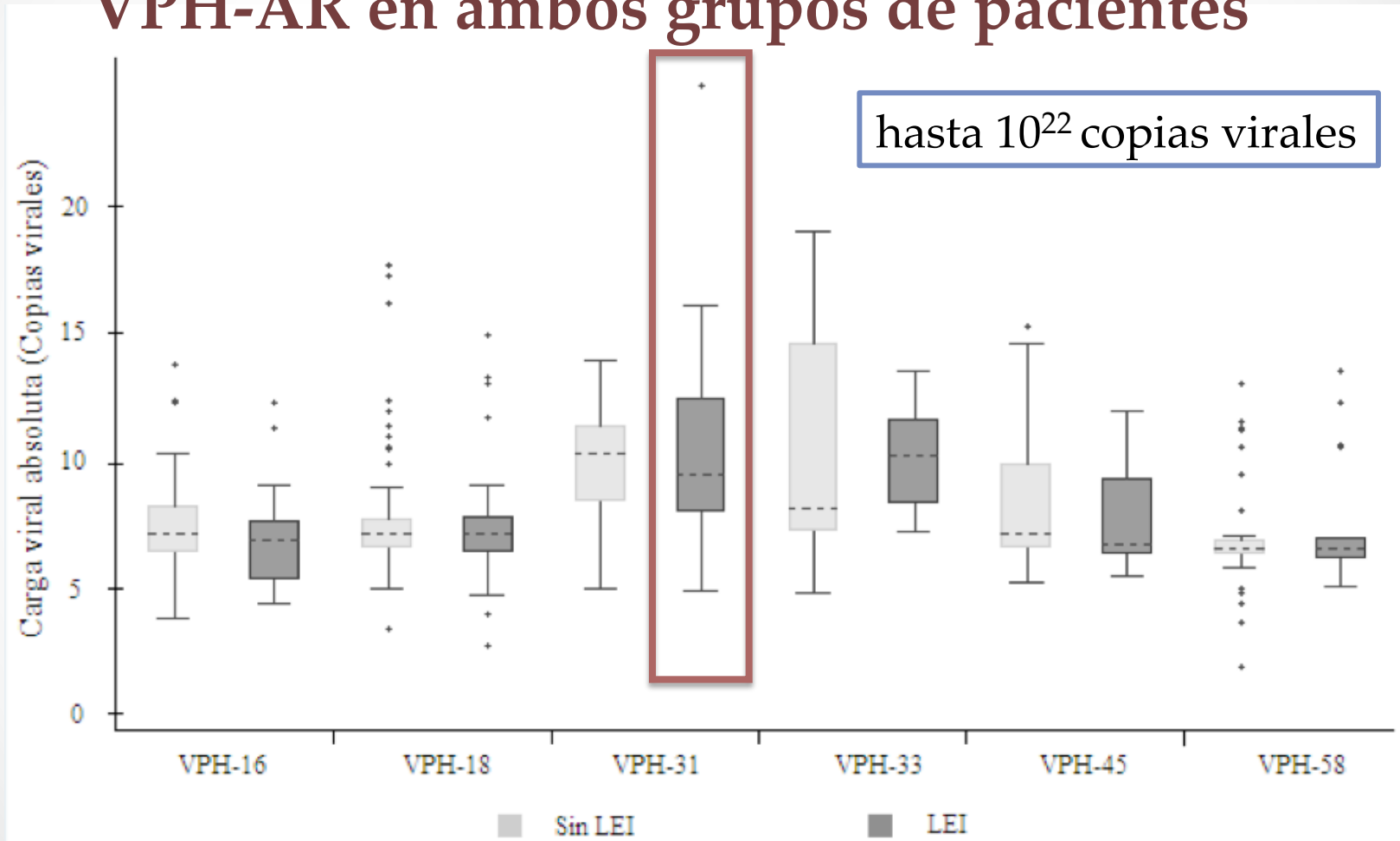
4. Cuantificar el ADN genómico y el número de copias virales presentes en muestras cervicales de las mujeres incluidas en el estudio.
5. Establecer las diferencias existentes en la distribución de la carga viral de seis tipos de VPH entre mujeres con y sin lesiones cervicales determinadas por colposcopia y biopsia.

Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada

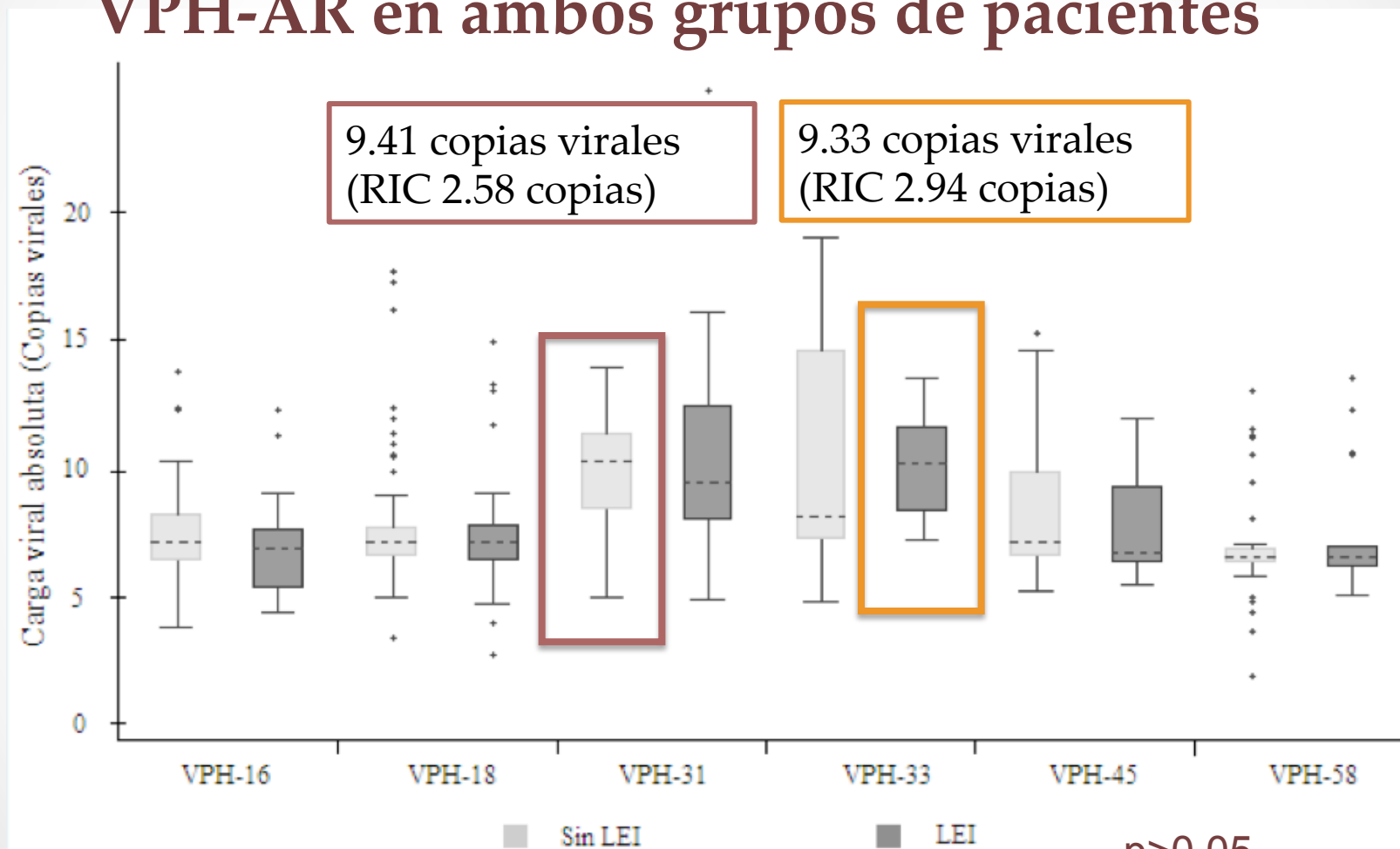
Tipo VPH	n	%	Mujeres con LEI (n= 59)						Mujeres sin LEI (n=114)						p
			Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		Negativa		Baja carga viral		Alta carga viral		
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
VPH-16	86	49,71	25	42,37	12	20,34	22	37,29	62	54,39	13	11,40	39	34,21	0,186
VPH-18	117	67,63	18	30,51	10	16,95	31	52,54	38	33,33	18	15,79	58	50,88	0,928
VPH-31	71	41,04	40	67,80	1	1,69	18	30,51	62	54,39	3	2,63	49	42,98	0,257
VPH-33	14	8,09	54	91,53	0	0,00	5	8,47	105	92,11	1	0,88	8	7,02	0,846
VPH-45	67	38,73	36	61,02	9	15,25	14	23,73	70	61,40	10	8,77	34	29,82	0,366
VPH-58	56	32,37	42	71,19	7	11,86	10	16,95	75	65,79	16	14,04	23	20,18	0,772
VPH-AR	159	91,91	4	6,78	8	13,56	47	79,66	10	8,77	12	10,53	92	80,70	0,777

Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados; LEI: lesión escamosa intraepitelial. *Carga viral VPH: categorizada como ≤ 0 copias virales = negativa, $0 < VL \leq 10^5$ copias virales = baja carga viral, $> 10^5$ copias virales = alta carga viral.

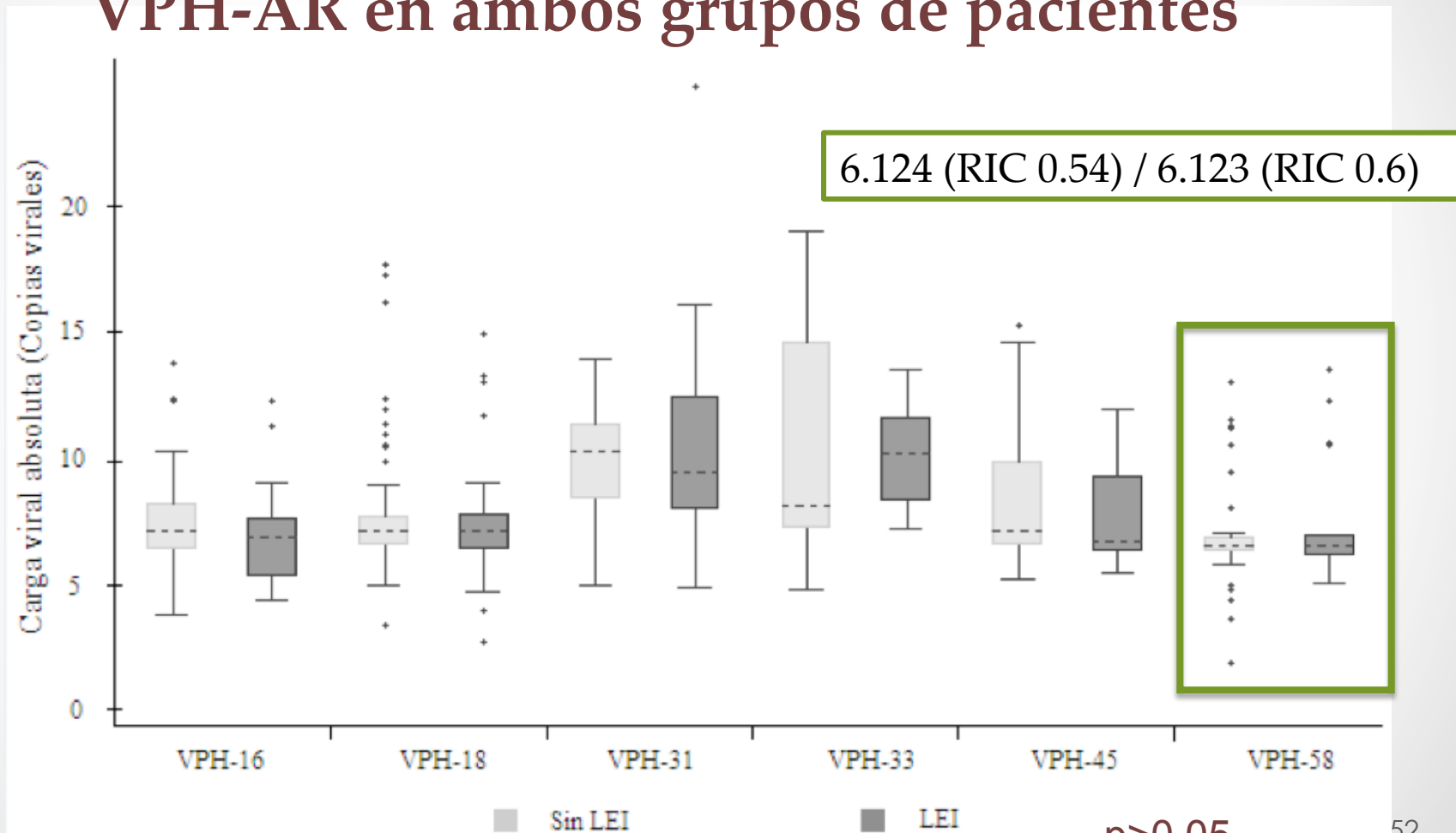
Distribución de la carga viral absoluta para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes



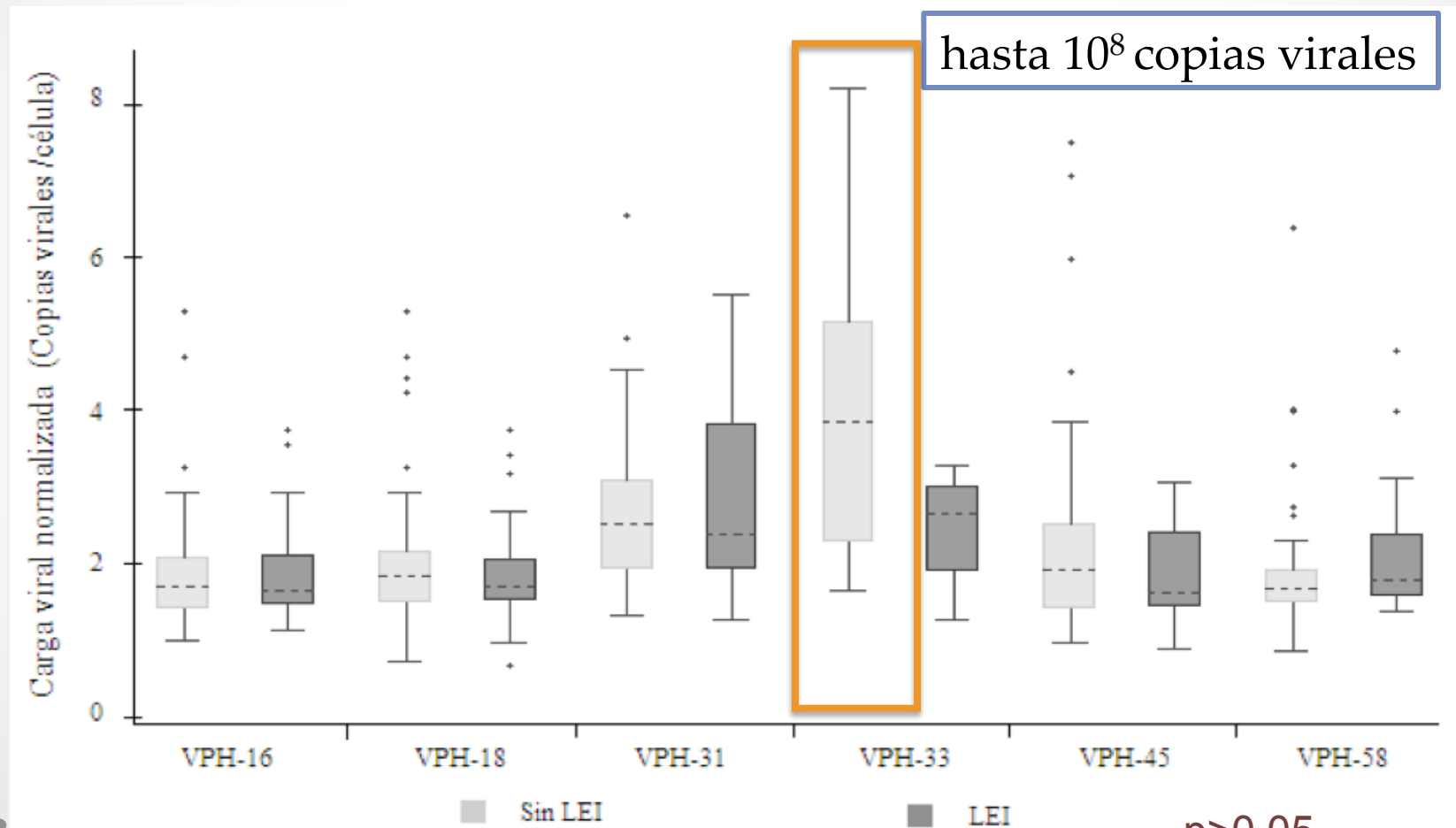
Distribución de la carga viral absoluta para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes



Distribución de la carga viral absoluta para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes



Distribución de la carga viral normalizada para 6 tipos VPH-AR en ambos grupos de pacientes



No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la carga viral (absoluta y normalizada) para cada tipo de VPH-AR evaluado, entre los dos grupos de pacientes

Carga viral normalizada de VPH-31 mayor en mujeres sin LEI y con LEI-BG, en comparación a mujeres con LEI-AG, (p=0.052)

Distribución de la carga viral de 6 tipos VPH-AR de acuerdo a los resultados de biopsia

Tipo VPH	Negativa (n=33)			LEI-BG (n=19)			LEI-AG (n=1)		
	% (n)	Carga Viral, mediana (RIQ)		% (n)	Carga Viral, mediana (RIQ)		% (n)	Carga Viral, mediana (RIQ)	
		Absoluta	Normalizada		Absoluta	Normalizada		Absoluta	Normalizada
VPH-16	66.67 (22)	6.42 (1.69)	1.79 (0.54)	57.89 (11)	6.77 (3.04)	1.69 (0.64)	0	n/a	n/a
VPH-18	66.67 (22)	6.29 (1.34)	1.84 (0.51)	68.42 (13)	6.61 (2.28)	1.67 (1.79)	100 (1)	7.02 (n/a)	2.07 (n/a)
VPH-31	30.30 (10)	8.51 (1.90)	2.39 (0.38)	31.58 (6)	9.69 (6.00)	3.50 (2.17)	0	n/a	n/a
VPH-33	3.03 (1)	6.75 (n/a)	1.98 (n/a)	10.53 (2)	8.48 (1.70)	2.37 (2.06)	100 (1)	10.57 (n/a)	3.13 (n/a)
VPH-45	51.52 (17)	6.13 (2.95)	1.79 (1.00)	42.11 (8)	6.24 (1.17)	1.61 (0.80)	0	n/a	n/a
VPH-58	21.21 (7)	5.93 (3.89)	2.14 (2.35)	36.84 (7)	6.12 (0.34)	1.75 (0.28)	0	n/a	n/a
VPH-AR	94.34 (31)	6.37 (1.20)	2.06 (0.63)	94.74 (18)	6.77 (2.97)	2.12 (1.37)	100 (1)	8.80 (n/a)	2.60 (n/a)

Las cargas virales fueron transformadas en logaritmo en base 10. Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; LEI: lesión escamosa intraepitelial; RIC: rango intercuartil; n/a: No aplicable. *Copias VPH/célula= Número de copias de VPH/ (Número de copias *HMBS*/2).

**VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados.

Las cargas virales más altas en mujeres con LEI
 Aumento carga viral VPH-18 y VPH-33 proporcional al grado de lesión cervical.
 Mayoría de los estudios previos para VPH-16, han encontrado que la carga viral aumenta en relación al grado de severidad de las lesiones cervicales

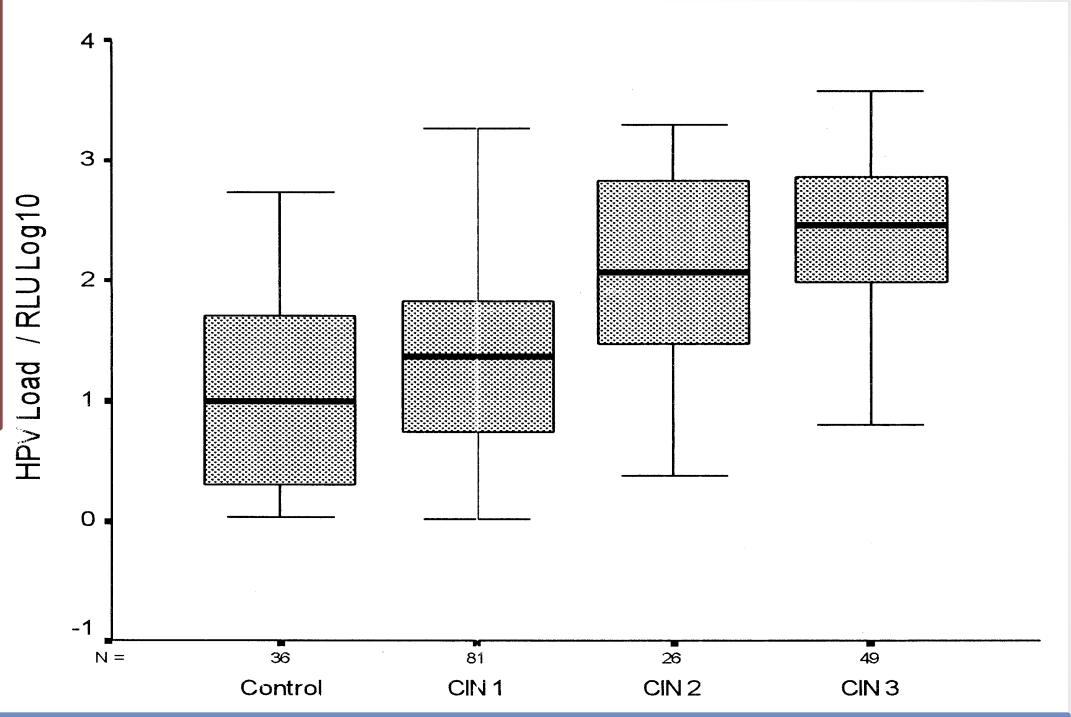


Fig. 3. Human papilloma virus DNA load in CIN lesion degree. Median viral load shows significant differences between them (Kruskal–Wallis test X²).

Modelo de regresión logística condicional

Tipo VPH	Carga viral	Mujeres con LEI / Sin LEI	OR crudo (95%CI)	OR*	IC 95%
VPH-16	Negativa	25/62	<i>Referencia</i>		
	$0 < CV \leq 5.86$	12/13	2.19 (0.88 – 5.43)	3.53	1.16 – 10.74
	$5.86 < CV$	22/39	1.27 (0.64 – 2.50)	2.63	1.09 – 6.36
VPH-18	Negativa	18/38	<i>Referencia</i>		
	$0 < CV \leq 5.95$	10/18	1.14 (0.45 – 2.89)	1.72	0.52 – 5.69
	$5.95 < CV$	31/58	1.06 (0.52 – 2.17)	1.77	0.68 – 4.63
VPH-31	Negativa	40/62	<i>Referencia</i>		
	$0 < CV \leq 5.14$	1/3	0.52 (0.04 – 6.29)	0.15	0.01 – 2.26
	$5.14 < CV$	18/49	0.60 (0.32 – 1.14)	0.34	0.15 – 0.78
VPH-33	Negativa	54/105	<i>Referencia</i>		
	$0 < CV \leq 4.60$	0/1	0.00 (0 - ,)	0.00	0.00 - ,
	$4.60 < CV$	5/8	1.43 (0.45 – 4.50)	1.67	0.44 – 6.28
VPH-45	Negativa	36/70	<i>Referencia</i>		
	$0 < CV \leq 5.98$	9/10	1.53 (0.60 – 3.92)	2.94	0.92 – 9.44
	$5.98 < CV$	14/34	0.79 (0.38 – 1.67)	1.13	0.43 – 2.96
VPH-58	Negativa	42/75	<i>Referencia</i>		
	$0 < CV \leq 5.97$	7/16	0.83 (0.32 – 2.11)	0.73	0.23 – 2.31
	$5.97 < CV$	10/23	0.83 (0.37 – 1.83)	0.86	0.35 – 2.12
VPH-AR**	Negativa	4/10	<i>Referencia</i>		
	$0 < CV \leq 5.94$	8/12	1.73 (0.40 – 7.47)	1.01	0.23 – 4.50
	$5.94 < CV$	47/92	1.18 (0.35 – 4.00)	1.39	0.25 – 7.81

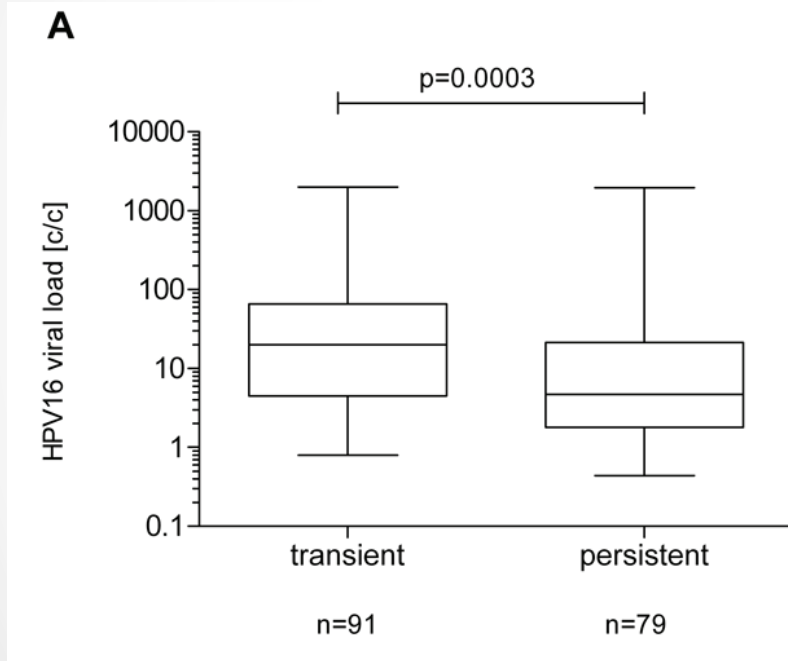
Abreviaciones: VPH: virus del papiloma humano; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo, infección con al menos un tipo viral de los 6 tipos analizados; CV: carga viral; LEI: lesión escamosa intraepitelial; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza. *Ajustado por origen, etnia, edad de primera relación sexual y número de tipos virales. ** Carga viral total= sumatoria carga viral de los tipos detectados/ número de tipos virales detectados.

Valores en negrita, $p < 0.05$

Original Article

Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study

Anna Manawapat¹, Frank Stubenrauch¹, Rainer Russ⁴, Christian Munk², Susanne Krüger Kjær^{2,3}, Thomas Iftner^{1,5}



Infecciones persistentes VPH-16 carga viral más baja que aquellas que eliminaron la infección (4.72 copias/célula vs 20 copias/célula p=0.0003)

Figure 2. HPV16 viral load in persistent versus transient infections.

Disminución de la carga viral en LEI

Integración del genoma del VPH

VPH-16

Regula a la baja de la síntesis del AND viral

Afecta la activación del sistema inmune

Periodo de latencia prolongado con carga viral baja

Mayor riesgo de persistencia y progresión de las lesiones

Disminuye la probabilidad de eliminar la infección

Kulmala SM, et al. Journal of clinical pathology. 2006;59(5):513-7.

● Nakagawa M, et al. The Journal of infectious diseases. 2000;182(2):595-8.

Brenna SM, et al. Sao Paulo Med J. 2003;121(3):128-32.

VPH-31

Pico transitorio de carga viral de VPH-31 o fase de meseta



Inducción del sistema inmune



Depuración de la infección

Estudios longitudinales: infecciones transitorias con mayor carga viral en pacientes con infecciones persistentes

Conclusiones

- Los tipos más prevalentes en la población de este estudio, fueron VPH-18, VPH-16 en mujeres con lesiones, y en mujeres sin lesiones, además de éstos dos, VPH-31.
- Aunque la distribución de la carga viral de los seis tipos de VPH evaluados, no fue diferente entre los dos grupos de mujeres, al analizar entre mujeres sin anomalía, con LEI-BG y LEI-AG, la carga de VPH-31 fue menor en mujeres con lesiones de alto grado.
- Se observó un aumento en la carga viral de VPH-18 y VPH-33 proporcional al grado de lesión cervical, determinadas tanto por colposcopia como por biopsia.

Conclusiones

- Se identificó una asociación tipo-específica entre la carga viral del VPH, con la presencia de lesiones cervicales.
- Mayor asociación entre la presencia de lesiones cervicales y cargas virales bajas de VPH-16, y cargas altas de VPH-31.
- Esta asociación podría relacionarse con el tiempo de duración de la infección y con la respuesta del sistema inmune ante cargas virales altas o bajas.
- Cuantificar la carga viral podría mejorar el valor predictivo de la detección de VPH, aunque, el alcance de la cuantificación dependerá del tipo viral detectado.

Importancia

- Técnica reproducible, sensible y específica (PCR en tiempo real) para los 6 tipos de VPH de alto riesgo más frecuentes en Colombia.
- Primer estudio que evalúa la asociación entre la carga viral de VPH con la frecuencia de lesiones cervicales en regiones con alta prevalencia de VPH en Colombia.
- Implementación de la cuantificación de la carga viral (como marcador de riesgo, tipo- específico para CC) para mejorar y fortalecer los programas de tamización de CC.
- Identificar mujeres VPH positivas con mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras, y mujeres aún sin anomalías cervicales, para predecir el inicio de un proceso neoplásico.

Publicación científica

Del Río-Ospina *et al.* *BMC Cancer* (2015) 15:100
DOI 10.1186/s12885-015-1126-z



RESEARCH ARTICLE

Open Access

The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions

Luisa Del Río-Ospina^{1,2}, Sara Cecilia Soto-De León^{1,3}, Milena Camargo^{1,3}, Darwin Andrés Moreno-Pérez^{1,3}, Ricardo Sánchez^{1,4}, Antonio Pérez-Prados⁵, Manuel Elkin Patarroyo^{1,4} and Manuel Alfonso Patarroyo^{1,2*}

Limitaciones

Estudio de
corte
transversal

No predicción del riesgo de progresión de las lesiones.

Se desconoce la duración de la infección de las mujeres.

Pocas mujeres con lesiones de alto grado

No puntos de corte para la carga viral

Estudios prospectivos en mujeres con infección por VPH que incluyan la determinación tipo-específica (de acuerdo a la prevalencia local) de la carga viral y mujeres con lesiones precursoras en diferentes grados de severidad, son necesarios para confirmar los resultados del presente estudio.

Perspectivas

- Predominio de ciertas agrupaciones de tipos virales en IM+ factores sociodemográficos, o factores de riesgo, se asociados.
- Análisis de la dinámica de la carga viral del VPH en el tiempo, relación con desarrollo, presencia y regresión de lesiones precursoras y CC.
- Utilidad de la cuantificación de la carga viral del VPH, para predecir el desarrollo de CC o de lesiones precursoras.
- Susceptibilidad genética??- HLA



GRACIAS