

**CARGA VIRAL DE VIRUS PAPILOMA HUMANO (TIPO 16 Y 18) EN  
MUJERES CON LESIÓN CERVICAL DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE**



**LERCY MARÍA ÁLVAREZ GARCÍA**

**Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Biología**

**Director:**

**MSc. ANAIS CASTELLAR MARTÍNEZ**

**Codirector**

**PhD. PEDRO JOSÉ BLANCO TUIRÁN**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS**

**Sincelejo**

**2017**

**Notas de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Firma de presidente del jurado**

---

**Firma del jurado 2**

---

**Firma del jurado 3**

**Sincelejo, 09 de Noviembre de 2017**

## **Dedicatoria**

Dedicada a Dios, a mi madre, mi esposo e hijo y a mis hermanos

## Agradecimientos

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi vida para poder seguir creciendo tanto personal como profesionalmente.

Al Dr. Pedro Blanco Tuirán que ha sido un excelente tutor académico, colocando su confianza en mí, impulsándome a ir más allá de mis límites.

A la Dra. Anais Castellar Martínez por su ayuda, tiempo y esfuerzo para llevar a cabo este trabajo, orientándome para encontrar la respuesta y el camino correcto.

A mis amigos y compañeros que convirtieron los buenos momentos en excelentes y los malos en aún mejores: Julia, Homer, Steven, Libardo, Jussep, Kelly, Margareth, Erwin, Alveiro, Dilieth, Elver, Natalia, Matilde, yina, yulenis y a las demás personas que pasaron por mi vida durante esta etapa.

A la doctora Melba Vertel por su colaboración en el análisis estadístico de los datos, por su ánimo constante y sus consejos.

A todo el equipo humano del Laboratorio Investigaciones Biomédicas, por la oportunidad de desarrollo profesional de calidad y amistad que siempre me han brindado.

Mi agradecimiento al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) por contribuir a la realización de este estudio.

A mi querida Universidad de Sucre en donde he recibido todos los conocimientos para cada día ser una mejor profesional y ser humano.

Y a todas aquellas personas que olvido nombrar pero que siguen siendo igual de importantes.

## CONTENIDO

### INTRODUCCIÓN

### OBJETIVOS

<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
1.1 Epidemiología.....	20
1.2 Factores de riesgo para el desarrollo del Cáncer Cervical.....	22
1.3 Fisiopatogénesis del Cáncer Cervical. ....	23
1.4 Prevención, diagnóstico y tratamiento del Cáncer Cervical. ..	24
1.5 Virus Papiloma Humano (VPH). ....	26
1.6 Estructura del virión.....	27
1.7 Clasificación de VPH.....	29
1.8 Replicación de VPH.....	30
1.9 Respuesta inmune.....	30
1.9.1 Respuesta inmune innata:.....	31
1.9.2 Citoquinas.....	32
1.9.3 Inmunidad celular.....	33
1.9.4 Inmunidad humoral .....	34
1.10 Vacunas.....	34
1.11 Métodos de identificación .....	35
1.12 Antecedentes.....	37
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
2.1 Tipo y área de estudio.....	40
2.2 Población de estudio y tamaño de la muestra.....	41
2.3 Criterios de inclusión y exclusión .....	41
2.3.1 Criterios de inclusión.....	41
2.3.2 Criterios de exclusión .....	42
2.4 Aspectos éticos.....	42
2.5 Muestras biológicas.....	42
2.6 Extracción de ADN viral.....	43
2.7 Valoración de la calidad del ADN.....	43
2.8 Amplificación por PCR del gen L1 de VPH .....	44

2.9	Cuantificación de la carga viral de VPH16 y VPH18 por PCR tiempo real.....	45
2.9.1	Elaboración de la Curva Estándar para cada VPH .....	45
2.9.2	Definiciones operativas .....	46
2.9.3	Categorización carga viral absoluta .....	46
2.10	Análisis estadístico.....	47
3.	RESULTADOS .....	48
3.1	Detección de Virus Papiloma Humano (VPH) en mujeres del departamento de Sucre .....	49
3.2	Distribución de VPH en los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos .....	50
3.3	Frecuencia de VPH obtenida según la lesión cervical .....	51
3.4	Evaluación de posibles factores de riesgo asociados a la infección por VPH. ....	51
3.5	Detección y cuantificación de VPH 16 y 18 mediante PCR tiempo real.....	53
3.6	Distribución de VPH de alto riesgo de acuerdo al municipio de estudio. ....	54
3.7	Frecuencia de VPH 16 y 18 según la lesión cervical. ....	55
3.8	Distribución de los tipos de VPH según la carga viral absoluta en lesiones cervicales .....	56
4.	DISCUSIÓN.....	59
5.	CONCLUSIONES .....	65
6.	PERSPECTIVAS .....	¡Error! Marcador no definido.
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	67

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1. Tasas de incidencia y mortalidad del Cáncer de Cérvix a nivel mundial, estandarizadas por edad /100.000 mujeres/año. 2012.</b>	
.....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Ilustración 2. Prevalencia de VPH por severidad de la lesión cervical y región. 2012.</b>	<b>21</b>
<b>Ilustración 3. Distribución de la prevalencia de VPH entre 1.810 mujeres colombianas de diferentes regiones geográficas.</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Ilustración 4. Mecanismo de respuesta inmune contra la infección por Virus Papiloma Humano (VPH).</b>	<b>33</b>
<b>Ilustración 5. Diagrama de flujo de la muestra estudiada.</b>	<b>48</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de casos positivos y negativos para VPH en el departamento de Sucre. ....	50
Gráfico 2. Porcentaje de VPH de alto riesgo detectados por PCR tiempo real.....	53
Gráfico 3. Frecuencia de genotipos VPH16 y VPH18.....	54
Gráfico 4. Distribución de VPH de alto riesgo (Tipo 16 y 18) según el municipio estudiado. ....	55
Gráfico 5. Distribución de genotipos VPH16 y VPH18 en LEIBG y ASCUS. ....	56
Gráfico 6. Distribución de la carga viral absoluta para VPH16 y VPH18.....	57
Gráfico 7. Distribución de la carga viral absoluta para VPH16 y VPH18 en LEIBG y ASCUS. ....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de la familia <i>Papillomaviridae</i> .....	27
Figura 2. Estructura del virión de VPH.....	28
Figura 3. Ubicación geográfica de los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos, departamento de Sucre- Colombia.....	40

## LISTA DE IMÁGENES

- Imagen 1. Exfoliación mecánica del cérvix utilizando un citocepillo.42**  
**Imagen 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para separar los  
productores de PCR amplificados con los cebadores MY09/11..... 49**

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de primers GH20/PC04 que flanquean una región de aproximadamente 260pb del gen $\beta$ -globina. ....	43
Tabla 2. Secuencias de primers MY09/11, que flanquean una región de 450pb de la región L1 de la proteína mayor de la cápside del virión de VPH. ....	44
Tabla 3. Secuencias de cebadores y sonda tipo Escorpión genotipo específico utilizados en la PCR en tiempo real. ....	46
Tabla 4. Porcentaje de infección por VPH según el municipio estudiado. ....	50
Tabla 5. Frecuencia de casos positivos para VPH en los diferentes tipos de lesión cervical. ....	51
Tabla 6. Análisis univariado de factores relacionados al riesgo de infección por VPH. ....	52
Tabla 7. Análisis de regresión logística de los factores asociados al riesgo de infección por Virus Papiloma Humano. ....	53
Tabla 8. Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada. ....	56

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1. Declaración de consentimiento informado.....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo 2. Encuesta Epidemiológica.....</b>	<b>79</b>

## Resumen

La carga viral de Virus Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo ha sido asociada con la prevalencia de neoplasia cervical y se sugiere que una alta carga viral en el epitelio citológicamente normal es un factor de riesgo para la progresión neoplásica, por lo que resulta importante su cuantificación. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue determinar la carga viral de Virus Papiloma Humano de alto riesgo (Tipo 16 y 18) y su relación con lesiones cervicales. De mayo de 2012 a mayo de 2013 fueron evaluadas 353 mujeres con edad entre 13-65 años que aceptaron participar voluntariamente en el estudio. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa de punto final para detectar la presencia de ADN de VPH; las muestras positivas fueron seleccionadas para los ensayos de detección y cuantificación de VPH16 y VPH18 mediante PCR tiempo real, en total se analizaron 148 muestras de mujeres con Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG) y 205 mujeres con Atipias Escamosas Indeterminada (ASCUS). Frecuencias y proporciones fueron empleadas para el análisis univariado de las variables categóricas. En el caso de las variables cuantitativas se utilizaron medias, medianas y rangos intercuartiles teniendo en cuenta una distribución normal de los datos. Se obtuvo 311 (81,8%) casos positivos para al menos algún tipo de VPH por el método de PCR de punto final, por otra parte, la frecuencia de infección según el municipio no mostró variación, sin embargo, el municipio de Tolú obtuvo el porcentaje más alto. La genotipificación mostró que 81,2% de mujeres con LEIBG y 65,7% de mujeres con ASCUS fueron positivas por PCR tiempo real (qPCR). El tipo de ADN de VPH más común encontrado fue el VPH18, con una prevalencia del 37,1%, seguido por el VPH16, con una prevalencia de 34,7%. No se encontraron diferencias entre las cargas virales y los tipos de lesión analizada; sin embargo, al comparar el tipo de virus de acuerdo a la carga viral si hubo diferencia estadística. Este trabajo contribuye al entendimiento del efecto de la carga viral en la historia natural del

Cáncer Cervical; sin embargo, estudios prospectivos son necesarios para confirmar estos resultados.

**Palabras Claves:** HPV, carga viral, reacción en cadena en tiempo real de la polimerasa, LEIBG, ASCUS, Sucre.

## ABSTRACT

Viral load of high risk human papillomavirus (HPV) has been associated with the prevalence of cervical neoplasia and suggests that a high viral load in the cytological normal epithelium is a risk factor for neoplastic progression, so it important its quantification. For this reason, the objective of this research was to determine the viral load of high risk Human Papilloma Virus (Type 16 and 18) and their relationship with cervical lesions. From May 2012 to May 2013 were evaluated 353 consenting women between aged 13-65 years who agreed to participate voluntarily in the study. An endpoint polymerase chain reaction was conducted for detected the presence of DNA HPV; the positive samples, were selected to detected and quantified, by real-time PCR, HPV16 and HPV18, in total 148 women were analyzed with low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and 205 women with atypical squamous cells of undetermined (ASCUS). Frequencies and proportions were used for univariate analysis of categorical variables. In the case of quantitative variables were used mean, medians and interquartile ranges taking into account a normal distribution of data. 311 (81.8%) positive cases for at least some type of HPV by PCR method endpoint was obtained, on the other hand, the frequency of infection by municipality showed not change, however, in the Tolu township was obtained the highest percentage. Genotyping showed that 81.2% of women with LSIL and 65.7% of women with ASCUS were positive by real-time PCR (qPCR). The DNA type HPV most commonly found was HPV18, with a prevalence of 37.1%, followed by HPV16, with a prevalence of 34.7%. No statistically significant differences in viral load between the types of injury analyzed were found; however, when comparing the type of virus according to the viral load if there were statistical significance. This work contributes to the understanding of the effect of the viral load in the natural history of Cervical Cancer; however, prospective studies are needed to confirm these results.

**Key words:** HPV, viral load, chain reaction in real time polymerase, cervical lesion, Sucre

## INTRODUCCIÓN

La asociación existente entre el Virus Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR) y el Cáncer de Cérvix (CC) ha sido claramente establecida, se ha definido la infección persistente por tipos virales de alto riesgo (VPH-AR) como el factor más importante (Munoz et al., 2003). Sin embargo, deben intervenir otros factores relacionados con el hospedero y con el virus que modulan esta asociación y uno de estos factores es la carga viral del VPH (Forman et al., 2012; Munoz et al., 2003). El efecto de los VPH de alto riesgo en el desarrollo de lesión intraepitelial cervical está altamente influenciado por el número de copias virales (Hernandez-Hernandez et al., 2003). En este contexto, la carga viral de VPH ha sido de interés en investigaciones científicas, con la finalidad 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 (Ylitalo et al., 2000).

Con el propósito de disminuir el impacto que ha generado el CC, se han desarrollado estrategias, encaminadas a la prevención, control y reducción de la morbimortalidad de ésta neoplasia (Murillo, 2008). Actualmente el método de tamizaje aceptado mundialmente, es la citología, con la cual se identifican mujeres con lesión y Cáncer Cervical. Sin embargo, ésta técnica tiene una sensibilidad limitada para la detección de lesiones precancerosas (41-73%) (Niedergang, Didierlaurent, Kraehenbuhl, & Sirard, 2004). Además, aunque en Colombia se ha registrado una cobertura de la citología de 76,3%, cercana a la de países desarrollados (Estados Unidos, de 83%), todavía persisten dificultades para la reducción del impacto del CC, al igual que en la mayoría de países en vías de desarrollo (Viikki, Pukkala, & Hakama, 2000).

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de biología molecular para la detección de ADN de VPH que buscan superar las limitaciones

de la citología en el diagnóstico precoz de lesiones preneoplásicas. Además, se ha demostrado la asociación entre la persistencia de las infecciones por VPH-AR y el desarrollo de CC, y por tanto la detección molecular facilita la identificación de mujeres en riesgo de desarrollar esta enfermedad, aun cuando los cambios morfológicos no hayan ocurrido (Coutlee, Rouleau, Ferenczy, & Franco, 2005). En tal sentido basadas en PCR, proporcionan mayor sensibilidad y especificidad, y mientras que la qPCR, además de lo anterior permitir la identificación del genotipo del virus y cuantifica el número de copias virales presente en la muestra (Moberg, Gustavsson, & Gyllensten, 2003).

La cuantificación de la carga del virus de VPH es un factor que ha sido considerado importante desde el punto de vista clínico, 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 (Moberg et al., 2003; Wang & Hildesheim, 2003; Ylitalo et al., 2000). La determinación del número de copias virales presentes en muestras cervicales de mujeres del departamento de Sucre, y su relación con la presencia de lesiones cervicales. Estos resultados contribuyeron en la generación de información para la implementación de nuevas estrategias de prevención

En Colombia, estudios previos, encontraron que la carga viral es el principal determinante para la persistencia de la infección por el VPH; la infección con VPH-16 es la que mayor riesgo presenta en el desarrollo de lesiones de alto grado (Munoz et al., 2009). Sumado a esto, se ha demostrado la importancia de la tipificación de los genotipos virales, puesto que los de alto riesgo constituyen un factor adicional. Pese a lo anterior, aunque en el departamento de sucre se diagnosticaron 29 muertes por cáncer cervical entre el 2002 y 2008, de los cuales son casos en los que se desconocía el genotipo y cargas virales infectantes, lo que denota un vacío en el conocimiento que motivó el interés por conocer de

la carga viral mediante qPCR, de los dos genotipos virales de AR más frecuentes en nuestro país, (VPH 16 y 18), esto con el fin de generar la información necesaria para diseñar, evaluar e implementar estrategias para el control de CC, como la vacunación y pruebas de tamización.

De ésta manera se aportan datos significativos para la caracterización del comportamiento del VPH, la prevalencia, la distribución tipo-específica y la relación con factores asociados. 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.

La mayor mortalidad de mujeres por CC se presenta en lugares como las riveras de los ríos, zonas de puerto marítimo y fluvial, así mismo, en áreas donde los patrones de salud sexual y reproductiva incrementan la probabilidad de adquirir la infección y desarrollar la enfermedad; la presente investigación se desarrolló en los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos - Sucre, por cumplir las siguientes condiciones: áreas turísticas, con puerto marítimo y fluvial, con patrones de salud sexual y reproductiva propicias para adquirir la infección por VPH y con deficiencias en los servicios de salud que limitan el diagnóstico y tratamiento oportuno de lesiones cervicales.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Determinar la carga viral de Virus Papiloma Humano de alto riesgo (genotipo 16 y 18) y su relación con lesiones LEIBG y ASCUS en el departamento de Sucre.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar la prevalencia de infección por Virus Papiloma Humano en mujeres con lesión cervical LEIBG y ASCUS en los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos.
- Comparar la distribución de la carga viral absoluta de VPH16 y VPH18 en mujeres con LEIBG y ASCUS.
- Evaluar factores epidemiológicos relacionados con la infección por VPH en la población afectada.

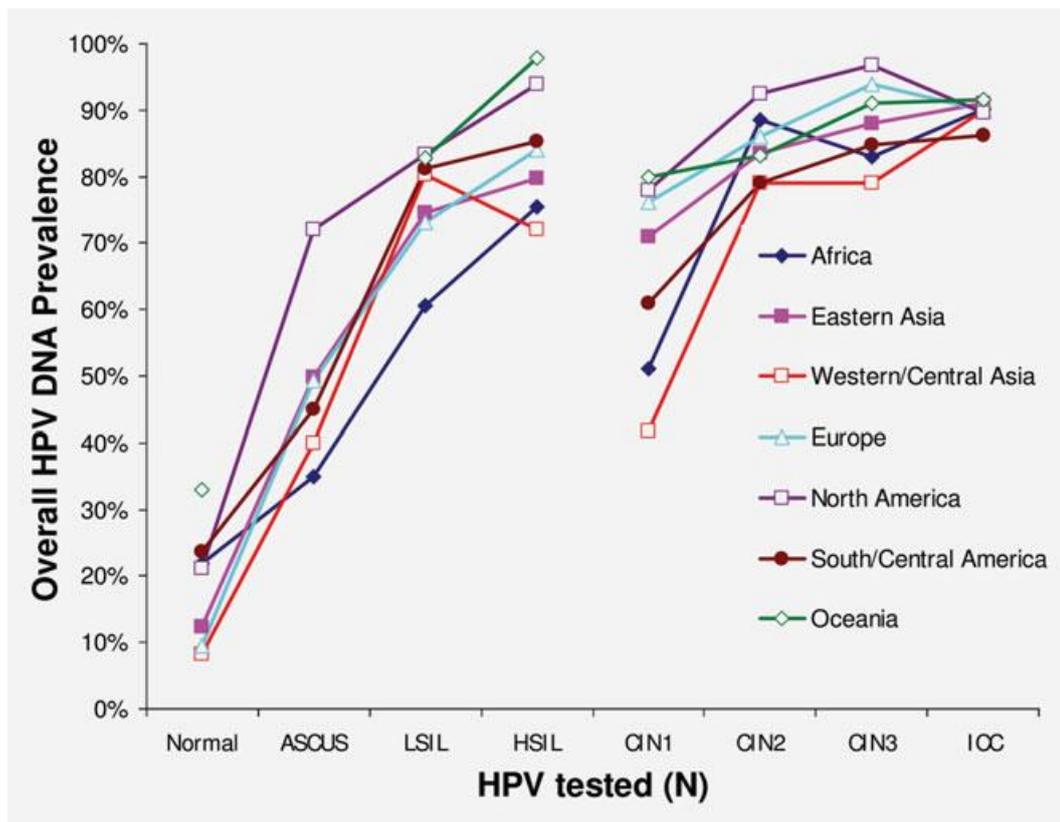
## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Epidemiología.

El Cáncer Cervical es el tercer cáncer más común entre las mujeres, en el ámbito mundial, su incidencia solo es superada por el cáncer de seno y el cáncer colorrectal. Según la international agency for research on cancer (IARC), se estimaron mundialmente 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%, ocurre en países en vías de desarrollo, principalmente de África, sur y centro de Asia y Suramérica. (Ferlay et al., 2013).

En Colombia, el CC es el segundo cáncer con mayor frecuencia entre las mujeres después del cáncer de seno, y la primera causa de muerte relacionada con la salud sexual y reproductiva. La tasa de incidencia anual es de 21.5 casos nuevos por 100.000 mujeres, a su vez la tasa, ajustada por edad, de mortalidad está en 10 muertes por 100.000 mujeres (Murillo, 2008; Wiesner-Ceballos et al., 2009). En el departamento de Sucre según el DANE, este tipo de cáncer es la primera causa de mortalidad, registró un promedio de 29 muertes por año entre 2002 y 2008

De acuerdo al grado de severidad de las lesiones cervicales, la prevalencia 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 grados de severidad de las lesiones, se encuentran diferencias en las prevalencias de VPH por región (Ilustración 2) (Guan et al., 2012).



**Ilustración 1.** Prevalencia de VPH por severidad de la lesión cervical y área estudiada región. 2012.

VPH: Virus Papiloma Humano; ASCUS: Atipias en células escamosas de significado incierto; LEI-BG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; LEI-AG: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CIN: Neoplasia intraepitelial cervical; ICC: Cáncer Cervical Invasivo.

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. *Revista internacional del cáncer*. 2012 Nov 15;131(10):2349-59.

Los estudios muestran un amplio rango de prevalencia de VPH que depende de la población de estudio, las técnicas de muestreo, los métodos de estudio y la sensibilidad de los instrumentos, así como de los métodos de detección y las diferencias en la expresión viral, pueden explicar las diferencias existentes en la prevalencia (Kataja et al., 1993). Los genotipos del VPH más frecuentes son el 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58, dentro de éstos el genotipo VPH 16 y 18, son los dos tipos más prevalentes, son responsables del 70% de casos de cáncer de cuello uterino, en conjunto con los genotipos 45, 31, 33, 52, 58 y 35 son

responsables del 89% de los casos de Cáncer cervical (Li, Franceschi, Howell-Jones, Snijders, & Clifford, 2011).

En Colombia, se han encontrado tasas de prevalencia de infección con VPH que varían entre el 14,9% y el 76,1%, y de 60,9% a 99,7% para VPH 16 y 18. Dentro 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, existen variaciones en las prevalencias encontradas que dependen de la población y la región estudiada (D. A. Garcia et al., 2011; Murillo, Molano, Martinez, Mejia, & Gamboa, 2009). El 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. 18 (Ilustración 3) (Camargo et al., 2011).

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 como herramienta de diagnóstico, no han tenido el impacto esperado en la reducción de la tasa de incidencia y mortalidad del CC. Las posibles causas que se han planteado para explicar el bajo impacto de los programas de tamización en los países en vías de desarrollo, incluyen problemas dentro de la organización de los sistemas de salud que disminuyen la cobertura de mujeres en riesgo, inapropiados programas de seguimiento para el diagnóstico temprano, tratamientos adecuados, creencias personales y culturales que interfieren con la adherencia a los programas (Martínez et al., 2001).

## **1.2 Factores de riesgo para el desarrollo del Cáncer Cervical**

Actualmente se considera que el desarrollo de esta enfermedad es multifactorial, se ha determinado que el factor central es la infección persistente por tipos de alto riesgo de VPH. Sin embargo, se requieren

otros factores tanto del virus como del huésped, que facilitan la infección y/o persistencia del VPH, la regresión o progresión de las lesiones (Ibeanu, 2011).

Respecto al virus, se considera como factor de riesgo, la infección persistente por uno de los 15 tipos oncogénicos, o 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. (Canfell et al., 2011). Además de esto, mientras más alta es la carga viral, existe un mayor riesgo de desarrollar lesiones de alto grado, aun 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. (Munoz et al., 2009; Payan et al., 2007).

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, con el número de partos; con el estado inmune y la exposición a mutágenos y factores hormonales. Por otro lado se han descrito factores de riesgo sociales como estrato socioeconómico y bajo nivel educativo y cultural, sin lograr establecer con claridad si implica mayor exposición al virus o dificultades para acceder a los servicios (Ault, 2006).

### **1.3 Fisiopatogénesis del Cáncer Cervical**

VPH infecta a las células de la capa basal del epitelio. Existen diversas moléculas involucradas como receptores de acuerdo al genotipo de VPH. En el caso de VPH-6, la integrina  $\alpha 6$  ha sido propuesta como su receptor en las células epiteliales, mientras que VPH-16 y VPH-33 tienen como receptor al heparán sulfato. En las células de la capa basal del epitelio, la replicación viral es considerada poco productiva y es en el proceso de diferenciación de los queratinocitos en los cuales se activa la replicación

viral, aquí se efectúa la síntesis de las proteínas de la cápside y el ensamblaje viral.

Cuando el ADN de VPH se encuentra integrado al genoma del hospedero en todos los casos de cáncer cervical (Bosch et al., 1995), las células que presentan esta característica, se ha encontrado correlación con un pronóstico negativo y con el desarrollo de resistencia al tratamiento (Unger et al., 1995; Vernon, Unger, Miller, Lee, & Reeves, 1997). El ADN de VPH integrado, se linealiza entre los genes E2 y L1. Normalmente el producto del gen E2 se une al ADN viral permite la transcripción del gen E1 y regulando la transcripción de los genes E6 y E7. Al integrarse el ADN de VPH al ADN del hospedero se pierden las regiones de lectura abierta del gen E2, lo que provoca la pérdida del producto de E2 (Yoshida, Sano, Oyama, Kanuma, & Fukuda, 2009) , con lo que los genes de las proteínas E6 y E7 son expresados con mayor intensidad (el Awady, Kaplan, O'Brien, & Burk, 1987).

#### **1.4 Prevención, diagnóstico y tratamiento del Cáncer Cervical**

La detección temprana y el tratamiento oportuno de mujeres en riesgo de infección por VPH, pueden prevenir la progresión a cáncer cervical. El test de Papanicolaou o citología es la prueba más aceptada para el diagnóstico temprano de cancer cervical (Lynge & Rebolj, 2009). Valora la calidad de la muestra, la presencia de infecciones y de anomalías de células epiteliales, permite clasificar los hallazgos en: lesión precancerosa leve (células escamosas atípicas de significado incierto; células escamosas atípicas sugestivas de alto grado; lesión intraepitelial escamosa de bajo grado lesión precancerosa de alto grado y carcinoma de células escamosas, células glandulares atípicas o adenocarcinoma in situ (Bergeron, 2003; Nayar & Wilbur, 2015; Solomon et al., 2002).

En Colombia las normas vigentes, establecen que la toma de la citología debe ser entre los 25 y 69 años de edad y sigue el esquema 1-1-3. Además se plantea la necesidad de contar con estrategias de tamizaje 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 tres 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) (Cuzick et al., 2008).

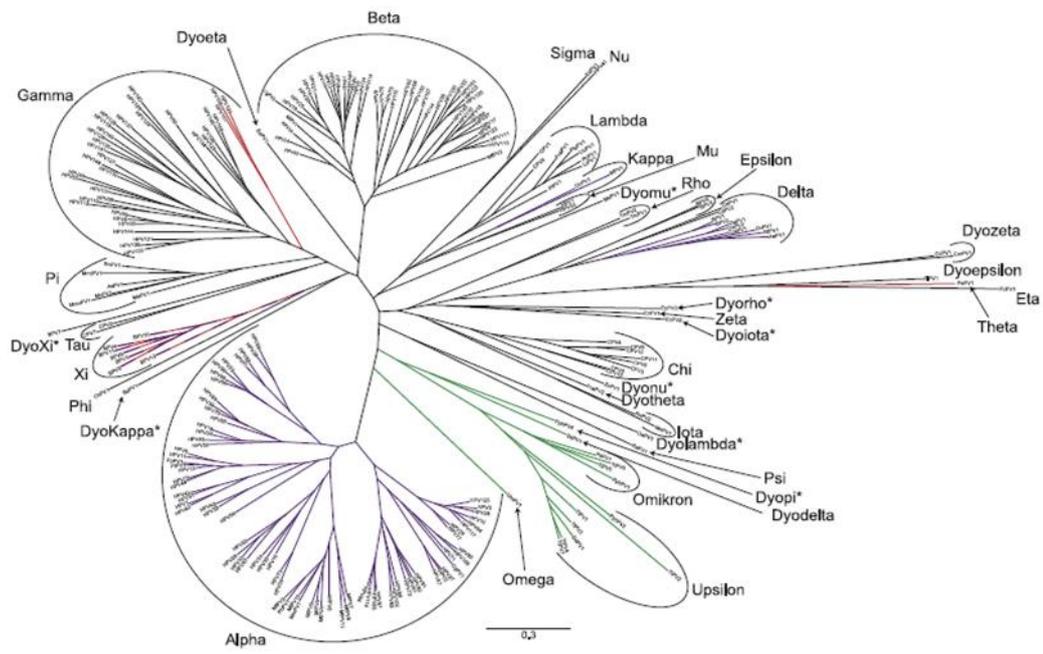
Por otro lado, se cuenta con vacunas contra VPH (tetavalente que protege contra el genotipo 6,11 16 y 18 y versiones bivalente que inmunizan contra el genotipo 16 y 18), las cuales están disponibles desde el año 2007, para el uso en una mujer de nueve a veintiséis años, con una efectividad de cerca del 90% en la prevención de infecciones persistentes con un 95% de efectividad para 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 antes del inicio de las relaciones sexuales. La OMS recomienda que la vacunación rutinaria contra el VPH deba ser incluida en los programas de inmunización de cada nación, con la población entre 9 y 13 años como objetivo. Estudios recientes sugieren que las diferencias biológicas y funcionales entre las llamadas variantes virales, pueden tener impacto en la etiología del cáncer, también, la distribución geográfica y el potencial oncogénico de estas, pueden proporcionar datos que ayuden a un diseño más eficiente de vacunas y protocolos de vacunación (Stanley, Gissmann, & Nardelli-Haefliger, 2008).

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 escisión electro quirúrgica 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 que se tenga de preservar la fertilidad, la estadificación del cáncer según la clasificación de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) y el compromiso local o sistémico del CC (Ibeanu, 2011; Waggoner, 2003).

### **1.5 Virus Papiloma Humano (VPH)**

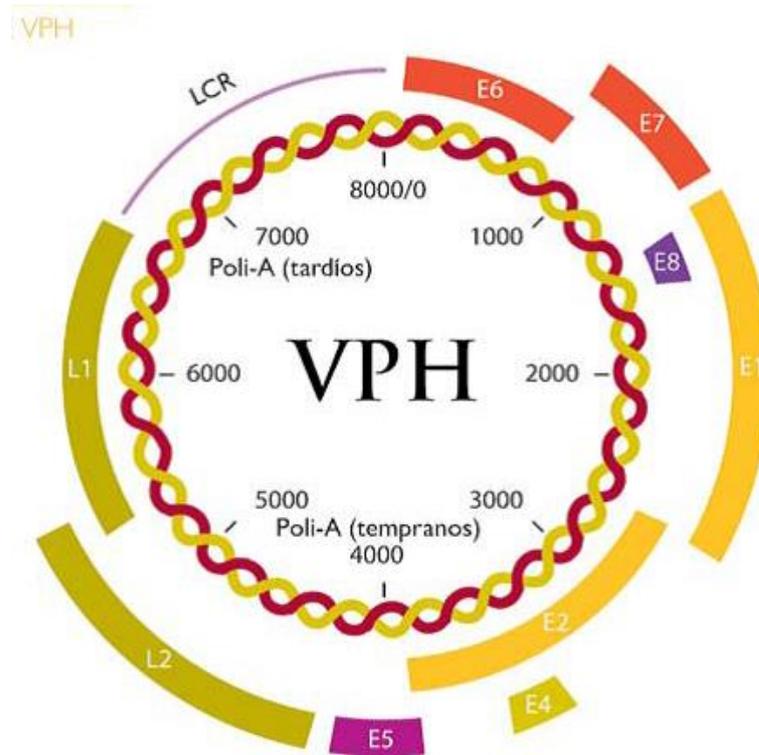
El Virus Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, y está ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en mamíferos (Van Doorslaer, 2013; zur Hausen, 1976). Los dos géneros más importantes de esta familia son los *Alphapapiloma* y los *Betapapilomas* (Figura 1) (Van Doorslaer, 2013). Según estudios 60 genotipos pertenecientes al género *Alphapapiloma* 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) (Castellsague, 2008).



**Figura 1.** Árbol filogenético de la familia *Papillomaviridae*. Muestra los diferentes géneros pertenecientes a esta familia, donde se observa el género *Alfapapilomaviru* que agrupa los tipos de virus que afectan el área anogenital humana. Fuente: Vandoorslaer Koenraad *et al.* Evolution of the *Papillomaviridae*\_Virology 2013. 445 p:11–20.

## 1.6 Estructura del virión

El virión de VPH posee una cápside icosaédrica sin envoltura, en la que se puede encontrar su ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pb, dividida en tres regiones: la región larga de control (LCR), que no contiene marco de lectura alguno; la región que codifica para las proteínas de la cápside denominadas tardías L1 y L2 y ocho proteínas tempranas: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8 (de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004; Kawai & Akira, 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura del virión de VPH.

Se observa ADN doble cadena de aproximadamente 8000 pb, proteínas mayor de la cápside L1, proteína menor de la cápside L2 y las proteínas E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8.

Fuente: De Villiers, E, et al. Classification of papillomaviruses. *En: Virology*. 2004. Vol. 324, p. 17–27.

La proteína Mayor L1 constituye el elemento estructural primario de la cápside viral, así mismo representa un objetivo importante en la respuesta inmune mediada por células. El gen L2 es un componente menor de la cápside, que interviene en el montaje y el empaquetamiento del ADN viral dentro de los viriones. Otras funciones de L2 incluyen la unión del virión al citoesqueleto, el transporte dentro del citoplasma y facilita el escape endosomal del genoma viral después de la infección (Kamper et al., 2006). Además, el genoma del VPH posee una región larga de control (LCR); (Jundt, Herr, Angel, Zur Hausen, & Bauknecht, 1995).

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 (Munoz et al., 1996).

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 (Munoz et al., 1996). La proteína E7 interactúa con la proteína supresora de tumor de retinoblastoma (pRB) y daña su función como regulador de crecimiento celular (Munoz et al., 2009).

## **1.7 Clasificación de VPH**

Existen más de 200 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% (Carter et al., 2000). Los 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 (Castellsague, 2008; Munoz et al., 1996).

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, respectivamente (Munoz, Castellsague, de Gonzalez, & Gissmann, 2006). 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 (Carter et al., 2000; Labropoulou et al., 1997).

### **1.8 Replicación de VPH**

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 tamizaje cuyo objetivo principal sea detectar mujeres en riesgo de padecer la enfermedad (Carter et al., 2000).

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 (Carter et al., 2000).

### **1.9 Respuesta inmune**

La interrelación entre el Virus Papiloma Humano y hospedero es compleja y variada. Utiliza dos propiedades básicas para eludir el sistema inmune humano.

**En primer lugar**, las células inmunes circulantes no detectan la presencia del virus fácilmente debido a que no existe una fase de viremia. La infección inicial se localiza en la membrana basal mientras que las células de Langerhans son particularmente abundantes en la capa apical de la mucosa. **En segundo lugar**, VPH no provoca grandes daños a las células hospedero, tales como la lisis de la célula infectada, esto conlleva a que la inflamación sea mínima y evita una posterior señalización, lo que permite que el virus se replique con bajo número de copias e infecte las células

sin que se produzca una respuesta inmune que impida la infección y replicación del virus en las células del epitelio (Kanodia, Fahey, & Kast, 2007; Stanley, 2006)

### **1.9.1 Respuesta inmune innata:**

La infección de VPH en las células del epitelio comienza con una respuesta inespecífica, procesos inflamatorios, quimio atracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células asesinas naturales (NK), anticuerpos naturales y sistemas de complemento. Las células reticulares de Langershans (LC) y queratinocitos fagocitan partículas virales para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación, que incluye la presentación en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con HLA clase II, CD40 y B7, y migración a los ganglios linfáticos locales (Matthews et al., 2003; Mota, Rayment, Chong, Singer, & Chain, 1999). Las LC con HLA, moléculas estimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y citoquinas como IL12 o IL 10 activan los LT nativos y dirigen su diferenciación hasta células efectoras (Niedergang et al., 2004). La información adquirida por las células dendríticas (DC) dirige la inmunidad mediada por LT ayudadores o citotóxicos, Th1 o Th2 (Cho et al., 2001; Kalinski, Hilkens, Wierenga, & Kapsenberg, 1999).

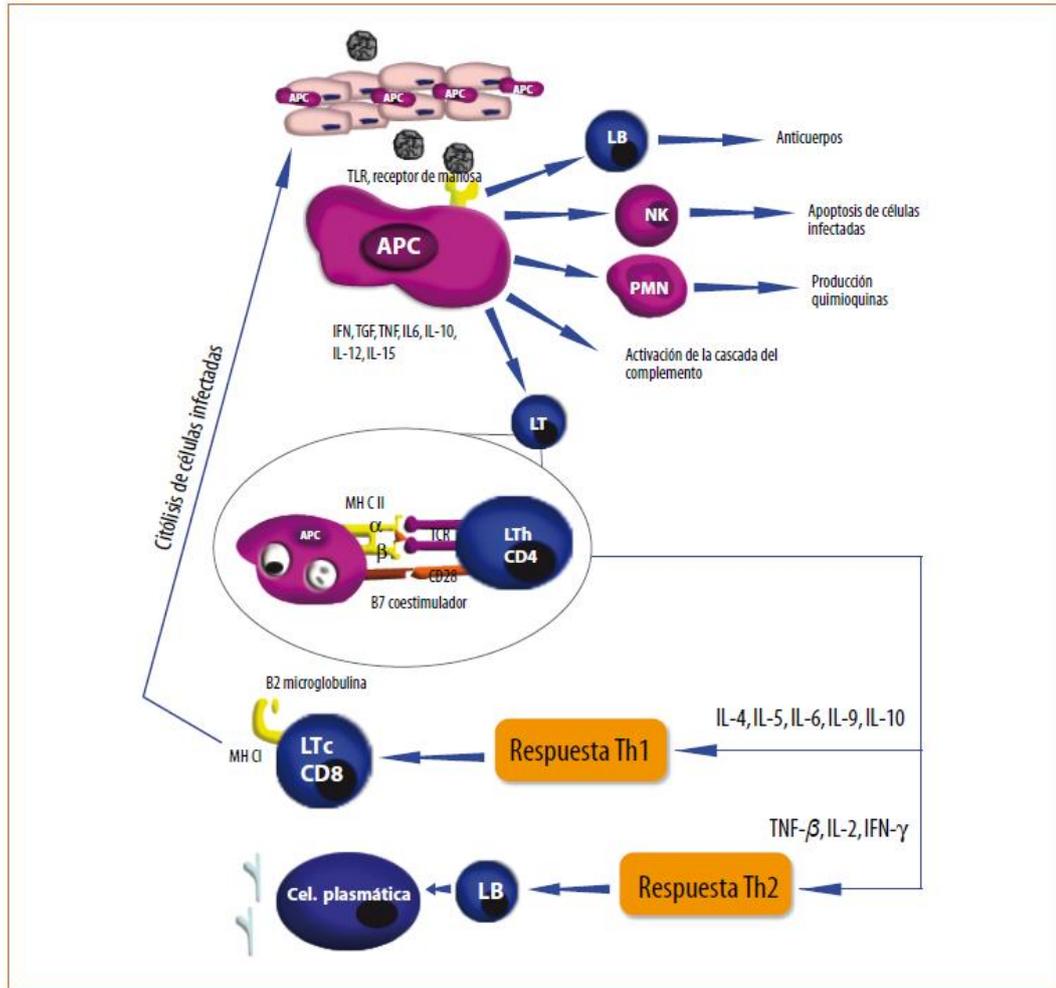
Por su lado las células NK inducen la apoptosis de las células infectadas por VPH, mediante los activadores e inhibidores de los receptores de muerte (KIR). La unión entre KIR y HLA regula la inmunidad mediada por las células NK; en las células infectadas la expresión de HLA disminuye, esto ocasiona la activación de células NK y la citólisis (Hernandez et al., 2006; Wang & Hildesheim, 2003) (Ilustración 4).

Los Toll-like receptors (TLRs), desempeñan un papel importante en la inmunidad innata. La activación de los TLR provoca un perfil de expresión proinflamatorio que promueve la inmunidad innata. El ADN de VPH de

doble hebra es reconocido principalmente por TLR 9 y se inicia una cascada de INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , y INF- $\gamma$ 1. Por otra parte los TLRs y los interferones son el objetivo de las oncoproteínas de VPH que resulta en un patrón de expresión aberrante que contribuye a la persistencia del virus y a su potencial cancerígeno (DeCarlo et al., 2012).

### **1.9.2 Citoquinas**

La activación del sistema inmune innato activa la producción de moléculas co-estimuladoras como las interleuquinas (IL), interferones (IF), factor de crecimiento transformante (TGF) y factor de necrosis tumoral (TNF), que ejercen un control directo sobre las células infectadas (Chang & Laimins, 2000). Las alfa defensinas humanas 1, 3 y 5 (HD-1, HD-3 y HD5) son capaces de inhibir a VPH in vitro (Doorbar, 2006). Los linfocitos T CD4+ maduran a linfocitos T ayudadores (Th), que dependiendo la vía IL-12 o IL 2 e Interferón- $\gamma$ , se activará la producción de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos (CTL + 8) o de linfocitos B respectivamente, cuyo principal objetivo es la producción de anticuerpos contra la proteína de la cápside L1, aunque se han descrito anticuerpos débiles que van dirigidos contra E2, E6, E7, y L290. La gran mayoría de estos anticuerpos son de clase IgG1, una respuesta predecible contra antígenos virales; por otro lado se dará la expresión de interleuquinas del tipo IL4, IL5, IL6, IL10 (Gutierrez-Xicotencatl et al., 2016), (Ilustración 4).



**Ilustración 2.** Mecanismo de respuesta inmune contra la infección por Virus Papiloma Humano (VPH).  
 Fuente: Rincón, Olga, et al. Virus papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. En: Revista colombiana de obstetricia y ginecología. 2007. Vol. 58, no. 3, p. 202-212.

### 1.9.3 Inmunidad celular

Una vez las células presentadoras de antígeno (CPA) están activadas, son reconocidas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> que serán activados, únicamente, si se reconocen todas las moléculas de superficie implicadas. Luego de la activación de estas células, los Linfocitos T y B reconocen las células infectadas mediante HLA clase I. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tienen la capacidad de actuar frente a la invasión viral, las células B plasmáticas producirán anticuerpos contra infecciones por HPV. Las células T activadas al contacto con el Ag pueden controlar el reto inicial del virus,

pero estas mueren y se da una diferenciación de células T de memoria las cuales hacen parte de la respuesta inmune tardía. (Gutierrez-Xicotencatl et al., 2016; Kalinski et al., 1999) (Ilustración 4).

#### **1.9.4 Inmunidad humoral**

Los anticuerpos contra VPH son altamente específicos, especialmente contra las proteínas de la cápside que actúan como partículas diana (L1 y L2), pueden ser efectivos para prevenir la infección. Estos anticuerpos específicos se detectan entre 4 meses y 5 años después de la infección primaria. En el caso de las proteínas tempranas, los anticuerpos específicos para E7 aparecen solamente en el desarrollo de cáncer (Gissmann, Jochmus, Nindl, & Muller, 1993; Mora-Garcia & Monroy-Garcia, 2015).

#### **1.10 Vacunas**

Hasta la fecha existen dos vacunas contra virus papiloma humano, una tetravalente Gardasil (VPH6, 11, 18 y 16) y una bivalente Cervarix (VPH 18 y VPH 16). Estas vacunas permiten inmunizar al paciente contra estos tipos de VPH, logrando así la eliminación de células infectadas (Duh & Vandevijver, 2008; Partridge & Koutsky, 2006).

Gardasil® es una suspensión inyectable en viales de dosis única de 0.5mL, compuesta por proteínas L1 en forma de partículas no infecciosas similares al virus (VLPs), producidas por tecnología de ADN recombinante mediante el uso de un sistema de expresión que utiliza células derivadas de *Sacharomyces cerevisiae*. Cada dosis de 0.5mL contiene 20µg de proteína L1 de VPH-6, 40µg de proteína L1 de VPH-11, 40µg de proteína L1 de VPH-16 y 20µg de proteína L1 de VPH-18 adsorbidas en un

adyuvante compuesto de sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo (Ansstasiou-Fotaki, Deligeoroglou, & Kreatsas, 2007).

Cervarix® es una suspensión inyectable producto de tecnología recombinante que utilizan un sistema de expresión con células derivadas de *Trichoplusia ni*. Cada dosis de 0.5mL está compuesta por 20µg de proteína L1 de VPH-16 y 20µgde proteína L1 de VPH-18 en forma de VLPs adsorbidas en el adyuvante llamado ASO4, el cual está compuesto por hidróxido de aluminio y monofosforil lípido A(Duh & Vandevijver, 2008).

### **1.11 Métodos de identificación**

La citología, que se introdujo hace más de 60 años, ha demostrado ser una herramienta útil en la detección de lesiones precursoras de cáncer de cuello uterino. Como prueba de tamizaje, 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 ASCUS, ASCH, y LEIBG (Kitchener, Castle, & Cox, 2006).

Considerando el papel crucial del VPH en el desarrollo del CC, se ha evaluado la utilidad de su detección como test de tamizaje. 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 ya que permite la identificación de mujeres en riesgo de CC. Sin embargo, requiere una infraestructura más sofisticada, como también personal entrenado. A pesar de esto se presenta como un método que podría utilizarse junto a la citología asegurando un programa de tamizaje simple, accesible, rápido y eficaz para detectar a mujeres en riesgo de desarrollar cáncer cervical principalmente en países de medios y escasos recursos (Berget, Olsen, & Poll, 1977).

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 (Coutlee et al., 2005).

En la actualidad, se han desarrollado técnicas de biología molecular 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 (Ibeanu, 2011).

Una de las técnicas más empleadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR siglas en inglés de: Polimerase chain reaction) (Iftner & Villa, 2003). Ésta, es una técnica muy sensible y específica que permite identificar la presencia de ADN viral, incluso cuando hay bajos número de copias en la muestra. Sin embargo presenta limitantes relacionadas con la selección de los 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 GP5+/6+, que permiten detectar baja cantidad de ADN de VPH (Remmerbach et al., 2004), MY09/11 diseñado para detectar infección en la existencia de múltiples tipos virales (Qu et al., 1997) y pU1M/2R el cual es específico para varios tipos de VPH de alto riesgo (Camargo et al., 2011; S. Soto-De Leon et al., 2011; S. C. Soto-De Leon et al., 2009).

## 1.12 Antecedentes

La qPCR, es una de las técnicas más usadas y confiables para la determinación de carga viral (Iftner & Villa, 2003); permite la detección de mínimas cantidades de copias virales, con alta sensibilidad y especificad, y como consecuencia, confiable detección (Moberg et al., 2003). La identificación de la carga viral para VPH se ha realizado en muestras de mujeres con varios grados de lesión (Hudelist et al., 2004), con varios tipos virales (Gravitt et al., 2007; Guo et al., 2007; Ramanakumar et al., 2010), y con diferentes muestras (Coutlee, Mayrand, Roger, & Franco, 2009), entre otros. La qPCR provee la mejor medida de la carga viral de los VPHs y permite investigar el papel de la carga viral de VPH en la historia natural de la asociación de VPH y carcinogénesis cervical (Coutlee et al., 2005).

La determinación de la carga viral, adquiere mayor importancia clínica debido a que las terapias encaminadas a la eliminación de las lesiones provocadas por VPH están asociadas con altas tasas de recurrencia. Con el uso de la terapia antiviral, no es frecuente la recurrencia, se piensa que esto se debe a una reducción de la carga viral y a la estimulación de la inmunidad local gracias a la liberación de antígenos virales lo que podría permitir una inmunidad celular para todo el VPH residual. De esta manera la cuantificación de la carga viral permite visualizar la efectividad de los tratamientos y así desarrollar tratamientos antivirales más efectivos.

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. En un estudio transversal realizado en China, se encontró una fuerte asociación de carga viral alta en mujeres con Carcinoma In Situ, con un OR de 68 (IC95% 17.8-259.7), así, establece que una carga viral alta podría predecir un riesgo futuro de desarrollar CC y plantea la

posibilidad de emplear marcadores adicionales para identificar de manera temprana a mujeres en riesgo (Wu et al., 2006).

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. Encontraron 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 (Hernandez-Hernandez et al., 2003).

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 (Coutlee et al., 2005).

En estudios que han empleado la técnica de qPCR, se ha encontrado que el riesgo de desarrollar Carcinoma *In Situ* (CIS), es proporcional al aumento en la carga viral del VPH-16 detectada por PCR en tiempo real, reporta 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, evidencia 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 qPCR 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 (Josefsson et al., 2000; Ylitalo et al., 2000).

En Colombia, en un estudio de cohorte con 1.728 mujeres, fueron seguidas durante 9 años, se encontró que la persistencia de VPH-16 aporta mayor riesgo para el desarrollo de lesiones de alto grado, planteó 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 (Munoz et al., 2009).

En la presente investigación se buscó determinar la carga viral en mujeres con lesión cervical mediante qPCR de dos tipos virales de alto riesgo, previamente identificados como los de mayor prevalencia en Colombia, con la finalidad de comparar la carga viral de los dos tipos de VPH de alto riesgo con mayor prevalencia en nuestro país.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Tipo y área de estudio.

El presente es un estudio de tipo descriptivo transversal en el que se determinó la prevalencia de infección y carga viral de Virus Papiloma Humano de alto riesgo (tipo 16 y 18) en el que se evaluó los factores relacionados con la infección por VPH en muestras cervicales de una población femenina. Se seleccionó como área de muestreo los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos en el departamento de Sucre (Figura 3). Para la recepción y toma de muestra se ubicaron los principales centros de salud de cada municipio y se seleccionaron mujeres que presentaban diagnóstico citológico de LIEBG y ASCUS.



**Figura 3.** Ubicación geográfica de los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos, departamento de Sucre- Colombia.

Fuente: <http://www.elsevierimages.com/image/.htm>

## **2.2 Población de estudio y tamaño de la muestra.**

El tamaño de la muestra fue calculado a través del programa estadístico Epi info 2000, asumiendo una significancia del 95%, una prevalencia de infección por VPH estimada en mujeres de 49,2% (soto de león 2009), un error de 5% y una población conocida de 394.000, lo que estimó una muestra de 384 mujeres; del tamaño de la población mencionada, cuatro se retiraron del estudio por estar limitadas al momento de proporcionar el frotis cervical, ocho tenían histerectomía previa, ocho llenaron el cuestionario epidemiológico de forma inadecuada; así, la muestra quedó constituida por 364 mujeres distribuidas de manera estratificada de acuerdo al tamaño de la población de cada municipio, en total fueron 155 con diagnóstico compatible con LEIBG y 209 con reporte de ASCUS. Con el fin de determinar la prevalencia en el departamento de Sucre y factores virales relacionados con el número de copias de dos tipos de VPH de alto riesgo (VPH 16-18), las muestras fueron colectadas durante un periodo de doce meses comprendido entre mayo de 2012 y mayo de 2013. A todas las participantes se les realizó una encuesta que permitió recopilar información sobre datos demográficos y comportamiento sexual, así como la presencia de anormalidad cervical, que permitió evaluar factores asociados a la infección por VPH (ver Anexo1).

## **2.3 Criterios de inclusión y exclusión**

### **2.3.1 Criterios de inclusión**

- Mujeres entre 13 y 65 años, que aceptaron participar voluntariamente en el estudio, y accedieron a la toma de muestra cervical, previo diligenciamiento del consentimiento informado.
- Pacientes con diagnóstico citológico LEIBG y ASCUS .

### 2.3.2 Criterios de exclusión

- Se excluyeron aquellas muestras cervicales en las que no se obtuvo amplificación del gen constitutivo B-globina mediante PCR convencional (7 mujeres).

## 2.4 Aspectos éticos

Este estudio se realizó con el aval del comité de ética de la Universidad de Sucre para realizar investigación científica en muestras humanas. Todos los pacientes que aprobaron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado para el procesamiento de la muestra según dicta la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico (Anexo 2).

## 2.5 Muestras biológicas

Las muestras biológicas fueron obtenidas a partir del cérvix de las pacientes en estudio, tomadas por personal profesional en el área de la salud mediante exfoliación mecánica del cuello del útero con un citocepillo vaginal (imagen 1), y se depositaron en microtubos estériles previamente rotulados que contenía 1.5 ml de tampón fosfato salino PBS 1X para su conservación y transporte al laboratorio Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre. Las muestras biológicas fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.



**Imagen 1.** Exfoliación mecánica del cérvix con un citocepillo.

## 2.6 Extracción de ADN viral

El aislamiento del ADN viral a partir de las células exfoliadas del cérvix se realizó mediante el uso del estuche de extracción QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) según recomendaciones del fabricante. Previo a la extracción con el estuche se procedió a la agitación de la muestra mediante vortex por 1 minuto para desprender el material adherido a las fibras del citocepillo, posteriormente se centrifugó a 8000 r.p.m. por 1 minuto, luego el citocepillo fue retirado con una pinza estéril y se repitió el proceso con el vortex por 1 minuto para homogenizar la muestra.

## 2.7 Valoración de la calidad del ADN

La calidad de ADN de las muestras se evaluó mediante la amplificación por PCR convencional del gen constitutivo de B-globina humana con dos oligonucleótidos PC04 y GH20 que actúan como cebadores de 260 pb de dicho gen con un tamaño de 260 pb (Tabla 1). La reacción fue realizada en un volumen final de 25 µl que contenía 5µl de ADN, PCR 1x, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada primer PC04 y GH20, 1U de Platinum® Taq DNA Polymerase. El perfil térmico utilizado para la amplificación fue: 94 °C x 3 min, 94°C x 1 min, 55 °C x 1 min, 72 °C x 1 min, por 40 ciclos, y una temperatura final de extensión de 72 °C x 4 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con GelStar. Se utilizó como marcador de peso molecular ZR 100pb DNA Marker y como control positivo, ADN extraído de sangre humana.

Cebador	Longitud	Posición	Secuencia (5'-3')
GH20	20 pb	Forward	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
PC04	20 pb	Reverse	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

**Tabla 1.** Secuencias de cebador GH20/PC04 que flanquean una región de aproximadamente 260pb del gen β-globina.

## 2.8 Amplificación por PCR del gen L1 de VPH

La detección del genoma viral se llevó a cabo en un termociclador para PCR de punto final, para esto, se emplearon los cebadores consenso MY09 y MY11 (Tabla 2), descritos por Resnick y colaboradores, estos cebadores delimitan una región conservada de 450 pb del gen L1 que codifica para la cápside viral. El volumen final de la reacción fue de 25 µl la cual contenía PCR buffer 1x, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada primer MY09 y MY11, 1Ude Platinum® Taq ADN polimerasay 5ul de ADN. El perfil térmico utilizado para la amplificación por PCR fue: 94 °C x 3 min, 94°C x 1 min, 56 °C x 1 min, 72 °C x 1 min, por 40 ciclos, y una temperatura final de extensión de 72 °C x 4 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con GelStar, y se utilizó como marcador de peso molecular ZR 100pb DNA Marker. Se usó como control negativo agua ultrapura y como control positivo ADN de VPH (Papillomavirus type 16 y 18 Ca Ski cells).

Cebador	Longitud	Posición	Secuencia (5'-3')
MY09	20 pb	Forward	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
MY11	20 pb	Reverse	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG

**Tabla 2.** Secuencias de primers MY09/11, que flanquean una región de 450pb de la región L1 de la proteína mayor de la cápside del virión de VPH.

## **2.9 Cuantificación de la carga viral de VPH16 y VPH18 por PCR tiempo real**

### **2.9.1 Elaboración de la Curva Estándar para cada VPH**

Se llevó a cabo la qPCR para conocer la carga viral absoluta de VPH tipo 16 y 18 presentes en cada una de las muestras y expresar los resultados en copias/uL. La curva estándar fue obtenida de 5 diluciones seriadas 1/10 ( $10^0$  a  $10^4$  copias), cada una por triplicado a partir de los controles positivos Amplirun® Papillomavirus type 16 (Ca Ski cells) DNA control y Amplirun® Papillomavirus type 18 (Hela cells) DNA control, que contienen concentraciones conocidas.

Una vez construida la curva de calibración para cada tipo viral, se analizó cada muestra para la detección y cuantificación de VPH-16 y VPH-18. La PCR en tiempo real fue realizada con el sistema de detección Spectrum 96 Real Time Thermal Cyclers. Se realizaron dos qPCR para cada paciente, una para detectar VPH-16 y otra para VPH-18. Se llevó a cabo la detección y cuantificación en un total de 133 muestras con LEIBG y 178 mujeres con ASCUS que resultaron positivas para VPH por PCR convencional.

Para ambos tipos virales, se realizaron reacciones de PCR empleando sondas específicas tipo Escorpión Sc-16 y Sc-18 con el cebador reverso GP5+ (Tabla 3). Las reacciones se desarrollaron en un volumen total de 10µl que incluía 1X FastStart Universal probe Master (Roche S.A), 0.2 µM de cebador reverso GP5+, 0.2 µM de la sonda escorpión, 1ul ADN y agua libre de ADN para completar el volumen final. Además, para descartar la contaminación con ADN, se incluyeron controles negativos con agua libre de ADNasas (GIBCO).

Las condiciones térmicas consistieron de 100 ciclos de extensión, e incluyeron un paso inicial de denaturación de 10 minutos a 95 °C, seguido

de 100 ciclos de 1 seg a 96° C y 5 seg a 40°C y 1 seg a 72°C. El diseño de los cebadores y el perfil térmico de la qPCR fue modificado a partir de las condiciones descritas por Keithw Hart, et al., (Hart et al., 2001).

<b>Cebador</b>	<b>Longitud</b>	<b>Posición</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
VPH16 Sc16	29pb	forward	5'-FAMccgcggaGTACCTACGACATGGGgccgagg MR-HEGGAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'
VPH16 Sc18	29pb	forward	5'- FAMccgcggaAGCAGTATAGCAGACATGgccgagg MR-HEGGAAAAATAAACTGCAAATCATATTC -3'
GP5+	23PB	Reverse	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'

**Tabla 3.** Secuencias de cebadores y oligonucleótidos Escorpión genotipo específico utilizados en la PCR en tiempo real.

FAM = fluoróforo (6-carboxifluoresceína) MR = Apagador de la fluorescencia (Rojo de metilo) HEG = Bloqueador de PCR (etilen glicol)

## 2.9.2 Definiciones operativas

Carga viral absoluta de VPH-18: Número de copias cuantificadas por PCR en tiempo real.

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

## 2.9.3 Categorización carga viral absoluta

*Carga viral absoluta VPH-16 categorizada:* negativa:  $\leq 0$ ; baja:  $0 < CV \leq 3.87$  copias virales y alta:  $> 3.87$  copias virales.

*Carga viral absoluta VPH-18 categorizada:* negativa:  $\leq 0$ ; baja:  $0 < CV \leq 3.02$  copias virales y alta:  $> 3.02$  copias virales.

## 2.10 Análisis estadístico

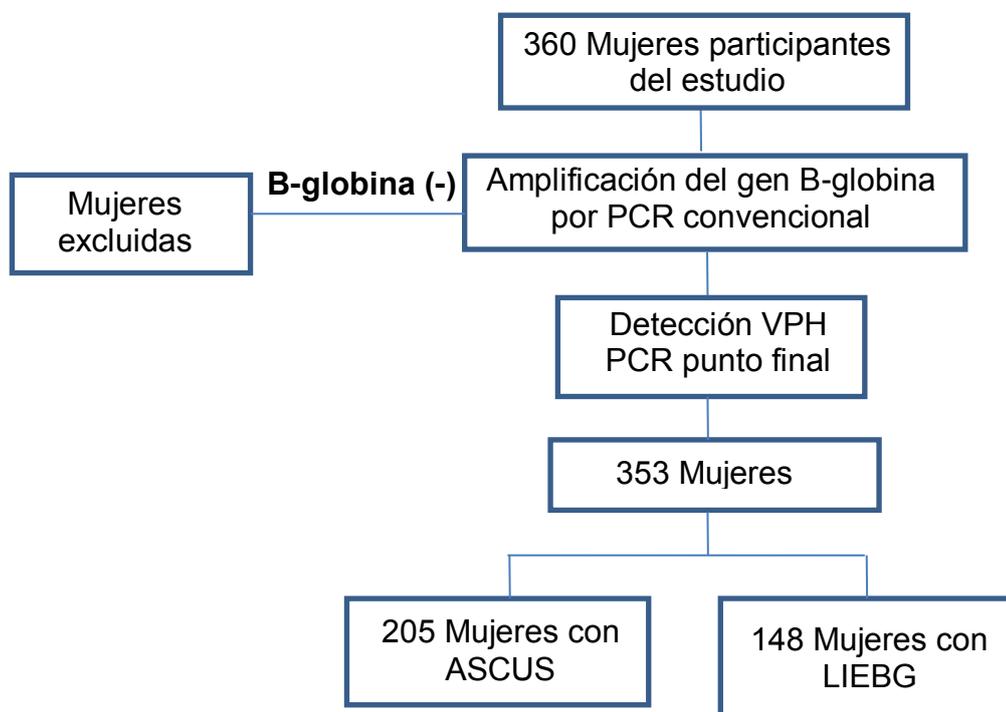
Se calcularon frecuencias y proporciones para el análisis de las variables categóricas. El análisis de Chi cuadrado ( $X^2$ ) fue utilizado para estimar la posible asociación entre las características socio-demográficas y anormalidad citológica frente a la presencia de infección por HPV, se consideró un valor de significancia de  $p \leq 0,05$ . Finalmente, se realizó el análisis de regresión logística para determinar cuál de las variables se correlacionó con la infección por VPH.

Para determinar la distribución de los datos en el caso de las variables cuantitativas, se realizó la prueba de Shapiro Wilks, se obtuvo un  $p < 0.001$ . Se calcularon los valores de media, medianas y rangos intercuartiles teniendo en cuenta la distribución normal de los datos. Se hizo un análisis por Chi cuadrado ( $X^2$ ) para comparar las variables cuantitativas.

La distribución de la carga viral de acuerdo a los resultados de citología se analizó con la prueba de Chi cuadrado para mirar la relación entre los dos tipos de virus detectados y las lesiones que produce. Las cargas virales absolutas fueron analizadas teniendo en cuenta el valor medio de la medida de los triplicados, y se transformaron en  $\log_{10}$  para facilitar la interpretación de los resultados. La carga viral absoluta de cada tipo viral fue categorizada para mejorar la calidad de los análisis.

### 3. RESULTADOS

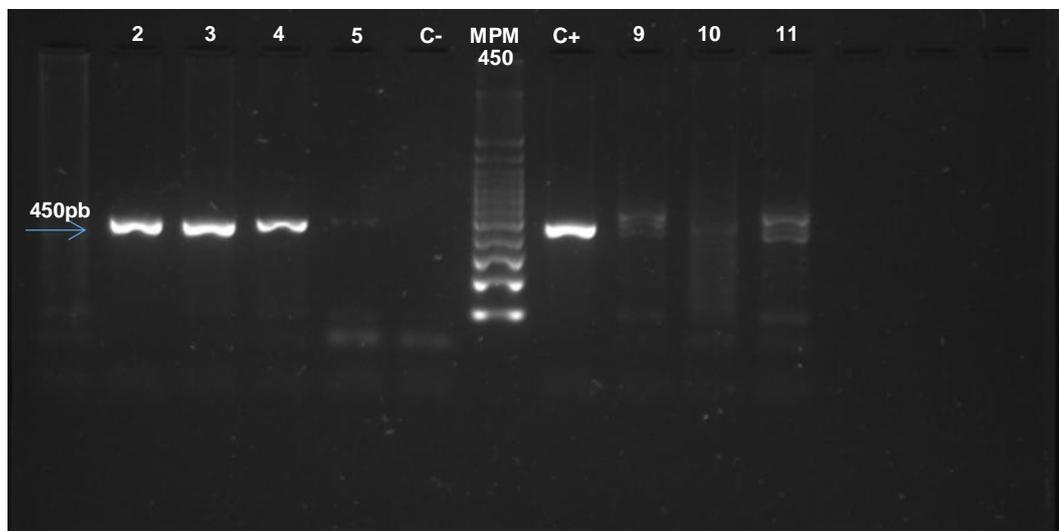
En el estudio, 360 mujeres cumplieron con los criterios de inclusión, sin embargo 7 de ellas fueron excluidas, debido a que no se logró amplificar el gen constitutivo celular B-globina de las muestras cervicales obtenidas. De esta manera la muestra quedó constituida por 353 mujeres; distribuidas en 148 con LIEBG y 205 con reporte de ASCUS. (Ilustración 5).



**Ilustración 3.** Diagrama de flujo de la muestra estudiada.  
VPH: Virus Papiloma Humano; LIEBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado;  
ASCUS: Atipias en escamosas de significado indeterminado.

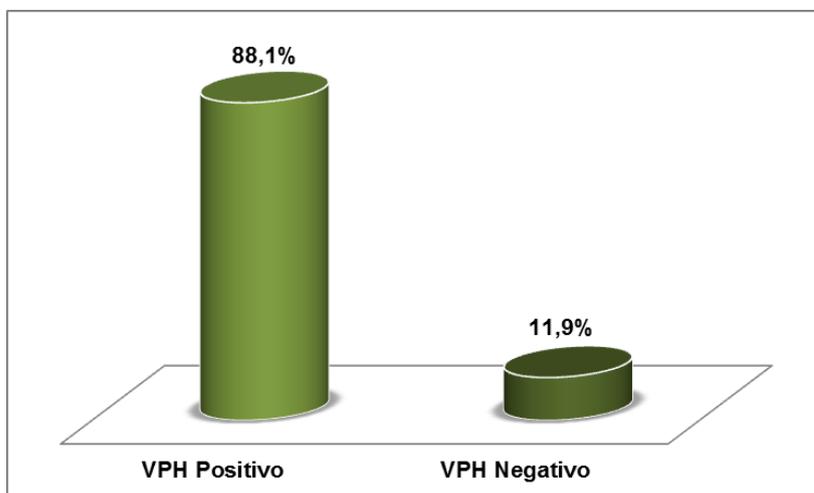
### 3.1 Detección de Virus Papiloma Humano (VPH) en mujeres del departamento de Sucre

Los productos de la amplificación del genoma de VPH obtenidos mediante PCR de punto final fueron visualizados en geles de agarosa al 2%. Se observó que en 311 casos hubo presencia de la banda de 450pb que corresponde al fragmento del gen que codifica la proteína L1 de la nucleocápside del virus (Imagen 2).



**Imagen 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para separar los productos del gen tal amplificados por PCR con los cebadores MY09/11. El fragmento amplificado tiene un tamaño de 450 pb y corresponde al gen L1 de la cápside viral. Los corridos del 2-5, 9-11 pertenecen a seis de las pacientes muestreadas, carril 6, control negativo; carril 8, control positivo. Cada pozo corresponden a productos de PCR amplificados. Control positivo (C+): AMPLIRUN® PAPILOMAVIRUS TYPE 16 DNA CONTROL, control negativo (C-).

Se obtuvo una prevalencia general de 88,1% de positividad para la infección por VPH en la población estudiada del departamento de Sucre (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Porcentaje de casos positivos y negativos para VPH en el departamento de Sucre.

### 3.2 Distribución de VPH en los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos

Los porcentajes de infección para VPH en el área de estudio, fueron: 86.27% en Sincelejo, 87.61% en San Marcos y el 90.51% en Tolú, aunque en el municipio de Tolú se observó un aumento en el porcentaje de infección, no hubo diferencia estadística entre la distribución de la frecuencia de infección viral en las mujeres de los diferentes municipios ( $p$ : 0.5887) (Tabla 4).

Municipio	N°	N° Positivos (porcentaje)	IC 95%	p-value 0.5887 $\chi^2$ 1.06
Sincelejo	124	107 (86,2)	78.67-91.58	
Tolú	116	105 (90,5)	83.29-94.93	
San Marcos	113	99 (87,6)	79.76-92.81	

**Tabla 4.** Porcentaje de infección por VPH según el municipio estudiado.

### 3.3 Frecuencia de VPH obtenida según la lesión cervical

En las 311 (88.1%) muestras que amplificaron para algún tipo de VPH se encontró una frecuencia de positividad de 89,8% en mujeres con LIEBG y 86,8% en mujeres con ASCUS. Al realizar las comparaciones, no se observó diferencia estadística entre los diferentes tipos de lesión cervical (Tabla 5).

PCR	Nº de casos	Nº positivos (Porcentaje)	Insuficiente $\beta$ -globina	CI 95%	p-value 0.3847
					$X^2$ 0.76
<b>LIEBG</b>	205	133 (89.8%)	4	83.5 – 94.0 %	
<b>ASCUS</b>	148	178 (86.8%)	3	81.2 – 90.9 %	

**Tabla 5.** Frecuencia de casos positivos en los diferentes tipos de lesión cervical. Análisis estadístico para establecer significancia, utilizando un intervalo de confianza (IC) del 95%. LIEBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; ASCUS: Atipias en células escamosas de significado incierto.

### 3.4 Evaluación de posibles factores de riesgo asociados a la infección por VPH.

Para analizar el porcentaje de infección por VPH y su asociación con las variables sociodemográficas y conducta sexual, se realizó un análisis univariado. Como se muestra en la tabla 6, la edad, número de parejas sexuales y método de planificación mostraron diferencia estadística (Tabla 6). Lo que indica que estas variables se asociaron significativamente con la infección por VPH ( $P < 0.05$ ).

<b>Variables</b>	<b>N</b>	<b>VPH PCR Pos</b>	<b>%</b>	<b>CI 95%</b>	<b>X<sup>2</sup> (p-value)</b>
<b>Municipio</b>					0,5887
Sincelejo	124	107	86,29	0.786-0.915	
San Marcos	113	99	87,61	0.797-0.928	
Tolú	116	105	90,51	0.832-0.949	
<b>Edad</b>					<b>0,0194</b>
17-28	110	94	85,45	0.771-0.912	
29-40	135	127	94,07	0.882- 0.972	
41-52	74	64	86,48	0.760-0.929	
53-65	34	8	23,52	0.113-0.415	
<b>Estado Civil</b>					0,6861
Soltero	147	127	86,39	0.795-0.912	
Unión libre	98	87	88,77	0.804-0.939	
Casado	108	97	89,81	0.821-0.945	
<b>Escolaridad</b>					0,3662
Alta	49	44	89,79	0.769-0.961	
Media	133	113	84,96	0.774-0.903	
Baja	171	154	90,05	0.843-0.939	
<b>Partos</b>					0,928
NP1	117	102	87,17	0.794-0.924	
NP2	98	87	88,77	0.804-0.939	
NP3m3	138	122	88,4	0.815-0.930	
<b>Edad 1a Rel. Sexual</b>					0,4158
rs13-16	94	80	85,1	0.759-0.913	
rs17-20	176	155	88,0633	0.821-0.922	
rsm20	83	76	91,56	0.828-0.962	
<b>No. Parejas Sexuales</b>					<b>0,0465</b>
P1	184	160	86,95	0.810-0.913	
P2	117	109	93,16	0.865-0.967	
P3m3	52	42	80,76	0.670-0.899	
<b>Método de Planificación</b>					<b>0,0215</b>
Hormonal	103	86	83,49	0.746-0.898	
Preservativo	180	167	92,77	0.877-0.959	
Ninguno	70	58	82,85	0.715-0.904	
<b>Lesión Cervical</b>					0,3847
LEIBG	148	133	89,86	0.835-0.940	
ASCUS	205	178	86,82	0.812-0.909	

**Tabla 6.** Análisis univariado de factores relacionados al riesgo de infección por VPH. VPH: Virus Papiloma Humano; LEIBG: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; ASCUS: Atipias en células escamosas de significado incierto; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; IC: intervalo de confianza; X<sup>2</sup>: Chi cuadrado.

Por regresión logística se encontró que la edad entre 41-52 años ( $p = 0.014$ ), haber tenido más de tres compañeros sexuales ( $p = 0.016$ ) y utilización de anticonceptivos orales ( $p = 0.038$ ) se correlacionó con la infección por VPH (Tabla 7).

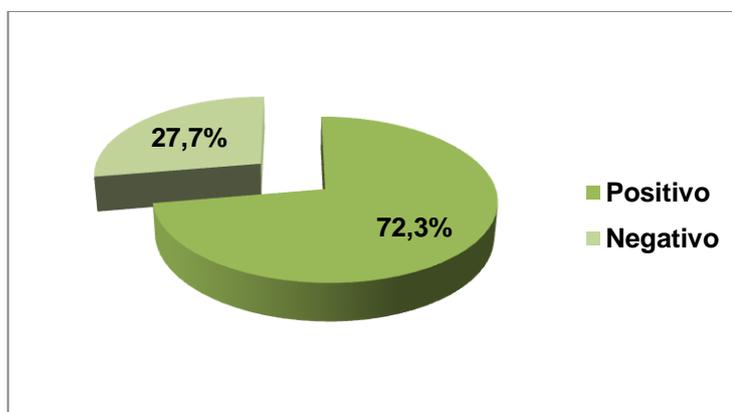
Factor	B	SE	Wald	P-Value	Exp (B)	IC 95%	
						Min	Max
<b>Edad</b>							
41-52	1,404	0,574	5,992	0,014	4,073	1,323	12,54
<b>No. Compañeros Sexuales</b>							
>3	1,261	0,521	5,856	0,016	3,531	1,271	9,808
<b>Método de planificación</b>							
Hormonal	0,916	0,441	4,304	0,038	2,499	1,052	5,938

**Tabla 7.** Análisis de regresión logística de los factores asociados al riesgo de infección por Virus Papiloma Humano.

B. Coeficiente de regression parcial; Wald, Wald  $\chi^2$  test; Exp (B), exponenciación del coeficiente B; CI, intervalo de confianza.

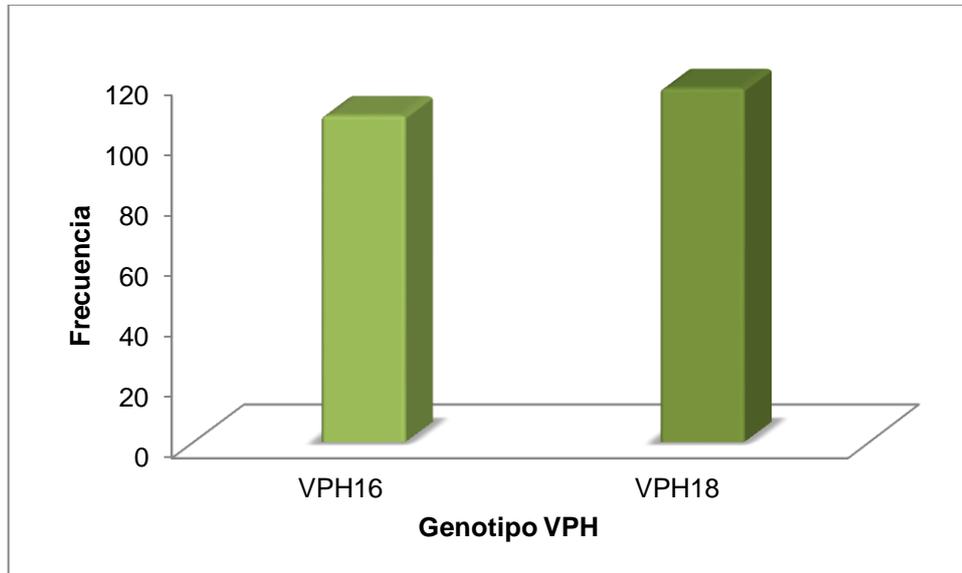
### 3.5 Detección y cuantificación de VPH 16 y 18 mediante PCR tiempo real

Las 311 muestras positivas para algún tipo de VPH obtenidas por PCR convencional fueron seleccionadas para la detección y cuantificación de VPH de alto riesgo tipo 16 y 18 mediante qPCR. Se observó que el 72,3% ( $n=225$ ) de los casos fueron positivos (gráfico 2).



**Gráfico 2.** Porcentaje de VPH de alto riesgo detectados por PCR tiempo real.

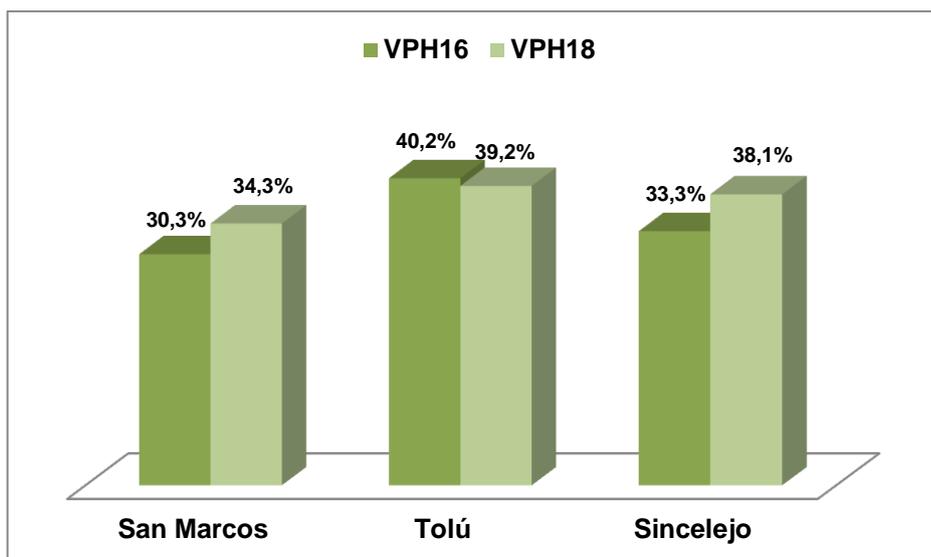
La frecuencia del tipo de VPH mostró que el VPH-18 fue el genotipo más frecuente con 117 casos (37,6%), seguido por el VPH-16 con 108 casos (34,7%) (Gráfico 3); sin embargo, no hubo diferencia estadística al realizar el análisis chi cuadrado.



**Gráfico 3.** Frecuencia de genotipos VPH16 y VPH18.

### **3.6 Distribución de VPH de alto riesgo de acuerdo al municipio de estudio.**

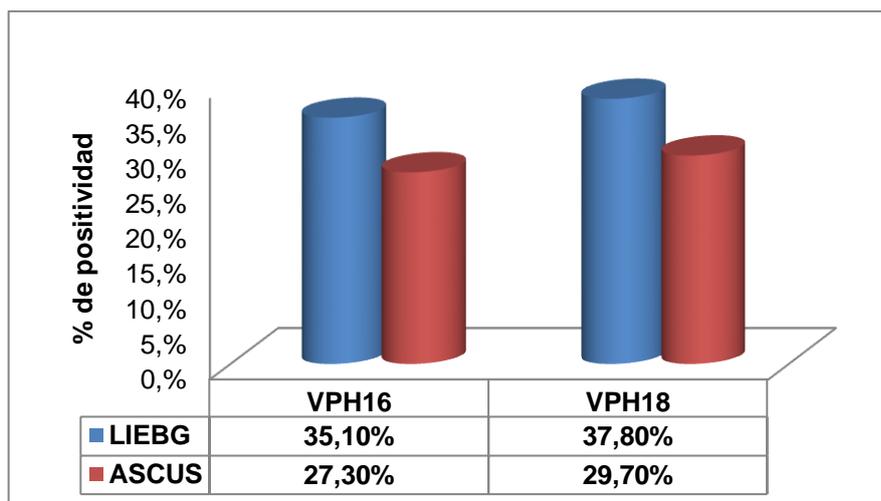
Al analizar las infecciones por tipo de VPH 16 y 18 y el sitio de origen de las mujeres, no se encontró diferencia estadística; como se muestra en el gráfico 4 para los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos, los porcentajes de 30,3%, 40,2%, y 33,3% correspondieron a VPH16  $p=0.3957$  y un 34,3% 39,2 y 38,1 correspondieron a VPH18  $p=0.7042$  respectivamente (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Distribución de VPH de alto riesgo (Tipo 16 y 18) en los tres municipios. VPH: Virus Papiloma Humano

### 3.7 Frecuencia de VPH 16 y 18 según la lesión cervical.

Las distribución de genotipos de VPH 16-18 según el tipo de lesión cervical, mostró que el VPH-18 fue el genotipo viral más frecuente en los dos tipos de lesiones, 42,1% en mujeres con LEIBG (56 casos) y 34,3% en mujeres con ASCUS (61 casos), seguido por el VPH-16, 39,1% en mujeres con LEIBG (52 casos) y 31,4% en mujeres con ASCUS (56 casos) (Gráfico 5). No obstante, no hubo diferencia estadística en la distribución viral, con esto se considera que la diversidad viral en las dos anomalías citológicas es similar, aún con la variación en las frecuencias de casos para los distintos tipos identificados.



**Gráfico 5.** Distribución de genotipos VPH16 y VPH18 en LEIBG y ASCUS. VPH: Virus Papiloma Humano; LEIBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; ASCUS: Atipias en células escamosas de significado incierto.

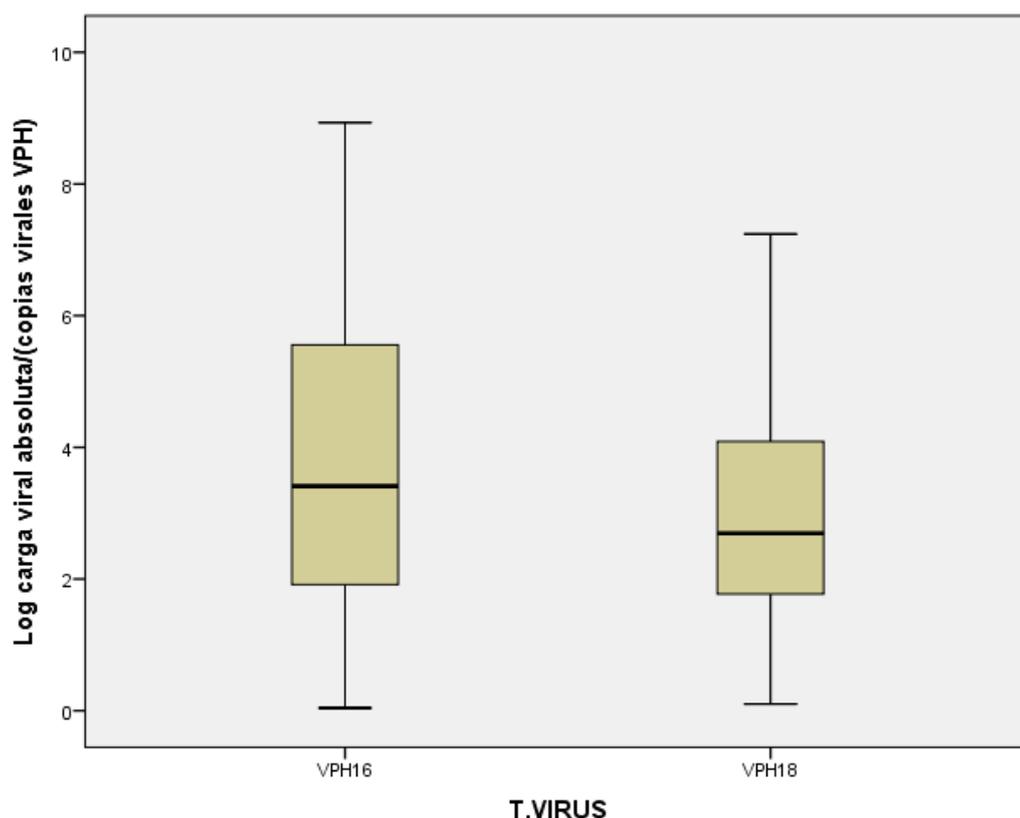
### 3.8 Distribución de los tipos de VPH según la carga viral absoluta en lesiones cervicales

Los títulos virales en mujeres con LEIBG infectadas con VPH-16 presentaron una mayor proporción de infecciones con una carga viral alta (78,8%), mientras que en mujeres con el mismo tipo de lesión infectadas por VPH-18 se encontró una carga viral alta en el 51,7% de las muestras; en contraste, en mujeres con ASCUS, se observó una alta frecuencia de mujeres con carga viral baja para ambos genotipos virales (Tabla 8). No se observó diferencia estadística de la distribución de la carga viral entre el genotipo viral y el tipo de lesión cervical; sin embargo, el análisis mostró diferencia entre el número de copias virales y el genotipo VPH-16 y VPH-18 ( $p=0.03$ ).

Tipo VPH	n	%	Mujeres con LEIBG (n=)				Mujeres con ASCUS (n=)				p valor	p valor				
			Negativa		Baja carga viral		Negativa		Baja carga viral							
			n	%	n	%	n	%	n	%						
VPH-16	108	34,7	0	0	11	21,1	41	78,8	9	16,0	44	78,5	3	0,5	0,08	0,03
VPH-18	117	37,6	4	0,7	23	41,1	29	51,7	9	14,7	32	52,4	20	32,7	0,33	

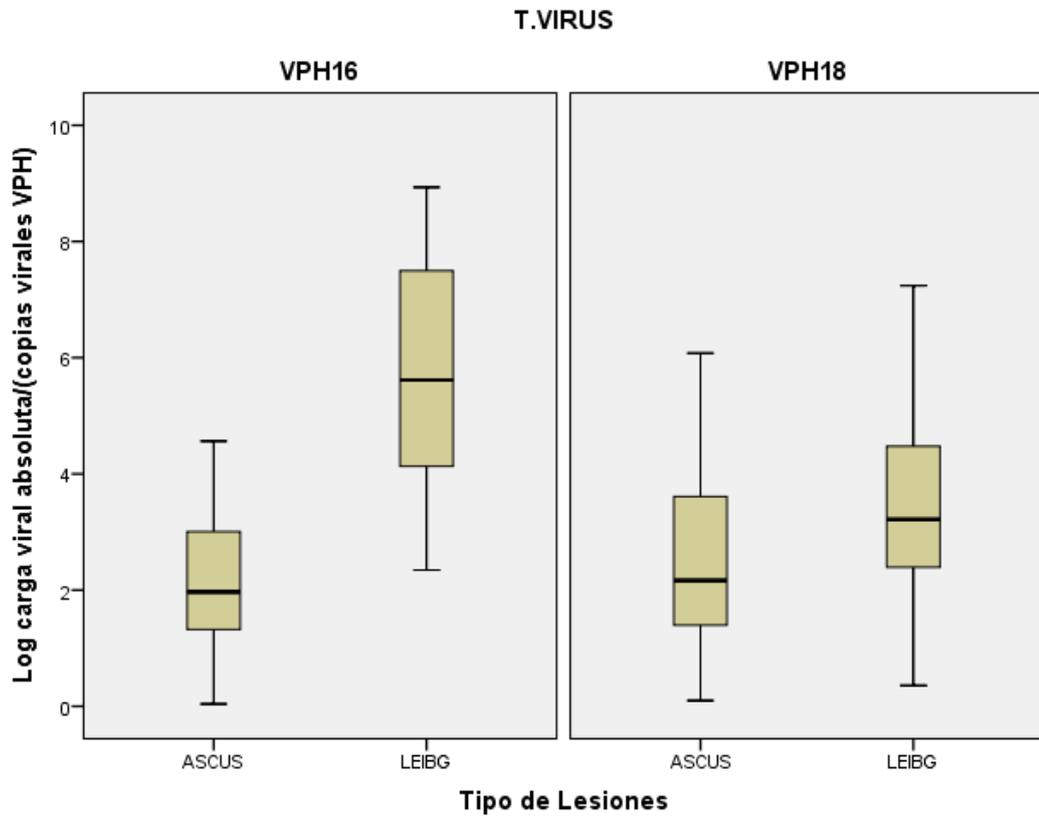
**Tabla 8.** Distribución tipo específica de la carga viral absoluta categorizada.

En la gráfica 6, se observa la distribución de la carga viral absoluta de cada tipo viral representado por los valores de la mediana y rango intercuartiles, después de transformación logarítmica de los datos. Cabe resaltar que el tipo viral con mayor carga absoluta, fue VPH-16, con mediana de 3.41 copias virales y media de 1.48 copias virales ( $p=0,03$ , Tabla 8).



**Gráfico 6.** Distribución de la carga viral absoluta para VPH16 y VPH18. 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. Se observaron diferencias estadísticas en cuanto a distribución de la carga de ADN de acuerdo al tipo de VPH ( $p=0.03$ ). Abreviaciones: VPH: Virus Papiloma Humano.

No se observaron diferencias estadísticas en la distribución de la carga viral absoluta para cada tipo de VPH-AR evaluado según el tipo de lesión cervical; aunque, en mujeres con LEIBG la carga viral absoluta fue mayor para ambos tipos virales, con mediana para VPH-16 de 3.41 copias virales, VPH-18 de 2.69 copias virales (Gráfica 7).



**Gráfico 7.** Distribución de la carga viral absoluta para VPH16 y VPH18 en LEIBG y ASCUS.

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. No se observaron diferencias en cuanto a distribución de la carga de ADN de cada tipo de VPH entre los tipos de lesión cervical. VPH: Virus Papiloma Humano; LEIBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; ASCUS: Atipias en células escamosa de significado incierto.

#### 4. DISCUSIÓN

El Cáncer Cervical es una neoplasia maligna con progresión natural hacia la muerte. Los estudios realizados han mostrado que la mayoría de estos tumores tienen una progresión gradual y sus lesiones precursoras pueden mantenerse en fase reversible o *in situ* por varios años en la mayoría de las pacientes (Franco, 1991).

La qPCR es una técnica de alta sensibilidad y especificidad, que facilita la detección y cuantificación de un bajo número de copias de ADN viral y fue un método acertado y adecuado para evaluar la relación de la carga según el tipo viral en lesiones cervicales (Andersson et al., 2005; Moberg et al., 2003; Schmitt et al., 2013). Esta investigación, empleando la técnica de PCR punto final y PCR tiempo real, permitió determinar la frecuencia de infección de VPH en los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos y la cuantificación de la carga viral de los tipos oncogénicos más frecuentes en nuestro país (VPH 16 y 18) (Camargo et al., 2011).

En este estudio, se encontró una prevalencia general de infección por VPH de 88,1% para los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos, en el departamento de Sucre, ésta está entre las más altas reportadas para las distintas regiones del país (Molano, Posso, et al., 2002; Molano, van den Brule, et al., 2002; Sierra-Torres, Acosta-Aragon, & Orejuela-Aristizabal, 2006; S. C. Soto-De Leon et al., 2009), en estos estudios han encontrado tasas de prevalencia de infección viral que van desde 14,8% a 49,5%, dependiendo del grado de lesión analizado. Adicionalmente, al comparar la presencia de infección viral en las mujeres que presentaron un diagnóstico citológico de LEIBG y aquellas con reporte de ASCUS, mostraron una alta tasa de prevalencia de infección con VPH 16 y 18 con valores de 89,8% y 86,8% respectivamente. El elevado porcentaje de muestras cervicales VPH positivas encontradas en nuestro estudio puede deberse a la naturaleza de estas infecciones, por ser el virus papiloma

humano el agente etiológico para el desarrollo de lesiones cervicales (Trottier & Burchell, 2009). Las diferencias de infección aquí encontradas, respecto a las reportadas en el país, podría sugerir alta frecuencia de portadoras asintomáticas de VPH en los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos-Sucre, e indicar que existe una subestimación de casos de infección por la baja sensibilidad y especificidad de la interpretación de la citología exfoliativa, principalmente en mujeres con ASCUS, sumado a que existen notables variaciones en la sensibilidad de las pruebas de los programas de tamizaje para la población en esta región del país (F. Garcia et al., 2003). Las frecuencias encontradas, sugiere que el método de diagnóstico utilizado y las características de la población evaluada, tienen una influencia directa en el nivel de detección de la infección viral (Qu et al., 1997; Sierra-Torres, Arboleda-Moreno, & Orejuela-Aristizabal, 2006).

En esta investigación, las mujeres en edad de 41-52 años, se correlaciono con la infección por VPH, se postula como posibles razones para esta tendencia, la reactivación de infecciones previas no detectadas, el número de compañeros sexuales, mayor tiempo de exposición (G. Garcia, 1970).

Al respecto en nuestra población las pacientes con más de 3 parejas presentaron una prevalencia de VPH 80,7%. El mayor número de parejas sexuales ha sido reportado como un factor asociado al riesgo de infección por VPH. Según Almonte et ál., 2011, a mayor número de parejas sexuales mayor es el riesgo de contraer VPH, menciona que aproximadamente el 20% de mujeres con una sola pareja sexual tenía infección por VPH, mientras que en aquellas mujeres que habían tenido 10 o más parejas sexuales la prevalencia de VPH ascendía a un 69% (Almonte et al., 2011; Castellsague, 2008).

En nuestro estudio el uso de anticonceptivos hormonales se correlacionó significativamente ( $p=0.038$ ) con la relación de infección por VPH y la presencia de alteraciones citológicas. Se ha sugerido que los anticonceptivos hormonales favorecen la replicación viral se debe a que en la región larga de control del genoma del virus, además de los factores de transcripción viral, éstos se unen factores celulares (estimulando o suprimiendo la actividad de genes virales), de los cuales al menos tres han sido caracterizados como elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), corresponde a uno de estos la progesterona (consumida en forma de anticonceptivo oral), la cual, al ser reconocida por receptores en LCR, promueve el aumento de la transcripción de los genes *E6* y *E7* (Castellsague, 2008; Ghanem et al., 2011).

Teniendo en cuenta esta problemática a todas las mujeres participantes de este estudio se les dio a conocer sus resultados y la importancia de un tratamiento oportuno dado que las mujeres diagnosticadas tempranamente y tratadas adecuadamente, tienen casi un 100% de posibilidades de recuperación total. Así mismo, se le informó a los centros de salud, con el fin de que estos resultados ayuden a orientar las acciones de salud pública hacia procedimientos apropiados para la prevención de lesiones precancerosas y cáncer cervical en estas participantes y en la población general de los tres municipios.

Respecto a la frecuencia viral tipo-específica, es importante resaltar la elevada frecuencia de VPH-16 y VPH-18, identificados en la población estudiada (34,7% y 37,6% respectivamente). Estos dos genotipos se clasifican dentro de los VPH-AR más frecuentes alrededor del mundo, tanto en mujeres con lesión cervical como en mujeres asintomáticas (Castellsague, 2008; Insinga, Dasbach, Elbasha, Liaw, & Barr, 2007). Así mismo, han sido documentados como responsables del 70% de los casos de CC, sugiriere una alerta para el departamento de Sucre por el posible riesgo de aumento de casos de lesiones de alto grado debido a los

porcentajes encontrados. Aunque la frecuencia del VPH-18 fue ligeramente mayor a la observada para VPH-16, no hubo diferencia entre estos tipos virales evaluados. Se ha sugerido que los genotipos de VPH reportados en diferentes regiones pueden variar en tipo e incidencia relativa, principalmente en mujeres con hallazgo citológico LEIBG y ASCUS (Humans, 2007; Parkin & Bray, 2006)

Las cargas virales absolutas categorizadas, fueron más altas en las mujeres con lesión LEIBG en comparación con mujeres que presentaron ASCUS (aunque la relación no fue estadística. Estos resultados pueden estar relacionados con el tipo grado de lesión cervical, ya que en nuestra investigación se incluyó mujeres con alteración citológica leve, mientras que en aquellos estudios que muestran asociación, incluyen muestras de diferentes grados de anormalidad de la enfermedad (LIEBG, LIEAG y CC), por lo que estos autores publican que a medida que el grado de lesión es más avanzado, mayor es el número de copias virales. De acuerdo a las observaciones de Schmitz et al (Schmitz et al., 2009) y van Duin et al (van Duin et al., 2002), la carga viral de VPH difiere significativamente en mujeres con informes citológicos normales y anormales; así mismo.

Nuestros resultados demuestran que la distribución de carga viral absoluta del VPH-16 es más alta en comparación con la carga viral obtenida para VPH-18. Algunos estudios indican que el aumento de la carga viral de VPH 16 en frotis cervical aumenta el riesgo de cáncer de cuello uterino invasivo, lo anterior es consistente con estudios previos que han descrito el efecto de la carga viral en el desarrollo de CC (Al-Awadhi et al., 2013; Lum & Le Marchand, 1998). El VPH 16 muestra un riesgo generalmente superior para el desarrollo del cáncer cervical invasivo sobre las categorías de carga viral que el VPH 18. Curiosamente, HPV 16 podría ser capaz de inducir la transformación maligna sin integración al genoma de la célula en contraste con HPV 18, HPV 31 y HPV 35, que

siempre parecen estar presentes en un estado físico integrado en lesiones malignas (Badaracco et al., 2002; Hudelist et al., 2004; Pirami, Giache, & Becciolini, 1997). Esto indica que los factores adicionales a la integración pueden ser importantes para la transformación maligna. Son necesarios estudios longitudinales que incluyen tanto el estado físico y la carga del virus con el fin de determinar su importancia relativa para el desarrollo de cáncer de cuello uterino.

Por otra parte, diversos estudios sugieren que el ADN del VPH-18 es aproximadamente de 10 a 50 veces más eficiente que el ADN del VPH-16 en la inmortalización de células epiteliales y lo hace más agresivo (Barbosa & Schlegel, 1989). Otros investigadores reportan que el HPV-18 puede estar asociado a una forma más agresiva de Cáncer Cervical que otros tipos de VPHs. O bien se reporta que el ADN del VPH-18 fue 5 veces más eficiente que el ADN del VPH-16 para la transformación de queratinocitos *in vitro* (Romanczuk, Villa, Schlegel, & Howley, 1991). Inclusive un estudio sugiere que la expresión de proteínas virales tempranas que incluye los oncogenes pueden ser directamente de un segundo promotor, localizado dentro del LCR del VPH-18 (Schlegel, Phelps, Zhang, & Barbosa, 1988). O que el VPH-18 puede estar asociado con el desarrollo de la progresión hacia Cáncer Cervicouterino más rápidamente. Lo anterior puede ser debido a que la LCR, principal promotor de E6 y E7 de VPH-18 es más potente que el de VPH-16 (Villa & Schlegel, 1991). Al tener el VPH-18 un promotor más potente, esto podría explicar el por qué una infección con baja carga viral del VPH-18 podría ser suficiente para alterar al epitelio cervical y provocar una LIEBG con una menor carga viral que el VPH-16. Sitúa que diferentes mecanismos son utilizados por estos virus para el desarrollo de lesiones y Cáncer Cervical.

No se evidenció relación entre la carga viral de un genotipo específico y la frecuencia de lesiones cervicales, 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 (Das, Bhattacharjee, Sen, Mukhopadhyay, & Sengupta, 2010; Saunier et al., 2008), sin embargo, deben realizarse estudios posteriores donde se incluyan diferentes grados de alteración citológica, para confirmar esta hipótesis. La cantidad de ADN de VPH parece predecir el riesgo de desarrollar carcinoma cervical antes que las alteraciones histológicas sean visibles, y ciertamente mucho antes de la aparición de tumores (Saunier et al., 2008).

En la literatura se encuentran puntos de corte diferentes al categorizar la carga viral, esto depende de la técnica empleada para la cuantificación (PCR en tiempo real, Captura Híbrida II (HCII) (Hernandez-Hernandez et al., 2003) y de la distribución del virus en la población evaluada (Josefsson et al., 2000; Moberg, Gustavsson, & Gyllensten, 2004). 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 la media de los datos.

La importancia de este trabajo radica en que es el primer estudio para el departamento de Sucre donde se incluyeron mujeres con LEIBG y ASCUS, para evaluar la relación entre la carga viral y dos tipos de virus de alto riesgo en lesiones cervicales.

## 5. CONCLUSIONES

En los municipios de Sincelejo, Tolú y San Marcos-Sucre, se presentó un alto porcentaje de infección por VPH en mujeres con LEIBG y ASCUS.

En los municipios estudiados las mujeres con LEIBG y ASCUS tienen la misma posibilidad de estar infectadas con VPH 16 y 18.

La alta frecuencia de infección por Virus Papiloma Humano tipo 16 y 18, considerados de alto riesgo para el desarrollo de lesiones cervicales y Cáncer Cervical, sugiere la posibilidad de aumento de esta patología si no se tratan a tiempo.

La distribución de la carga viral en este estudio fue tipo-específica, independiente al grado de lesión cervical.

La edad, número de parejas sexuales y uso de anticonceptivos hormonales, son factores que en este estudio se asocian a la infección por Virus Papiloma Humano.

## **RECOMENDACIONES**

Llevar a cabo estudios de cuantificación que incluyan otros tipos virales de alto riesgo y pacientes con diferentes lesiones cervicales para confirmar los resultados de este estudio.

Realizar campañas de control y prevención de la infección por VPH con la finalidad de dar a conocer a la población en general sobre el riesgo de adquirir el VPH 16 y 18 incluso en anormalidad ASCUS.

Realizar un seguimiento a las participantes del estudio para determinar la persistencia o resolución de la infección.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aedo, A. S., Melo, A. A., Garcia, P., Guzman, G. P., Capurro, V. I., & Roa, S. J. (2007). [Detection and typification of human papilloma virus in pre cancerous cervical lesions]. *Rev Med Chil*, 135(2), 167-173. doi: /S0034-98872007000200004
- Al-Awadhi, R., Chehadeh, W., Jaragh, M., Al-Shaheen, A., Sharma, P., & Kapila, K. (2013). Distribution of human papillomavirus among women with abnormal cervical cytology in Kuwait. *Diagn Cytopathol*, 41(2), 107-114. doi: 10.1002/dc.21778
- Almonte, M., Ferreccio, C., Gonzales, M., Delgado, J. M., Buckley, C. H., Luciani, S., . . . Sasieni, P. (2011). Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*, 21(9), 1654-1663. doi: 10.1097/IGC.0b013e3182288104
- Andersson, S., Safari, H., Mints, M., Lewensohn-Fuchs, I., Gyllensten, U., & Johansson, B. (2005). Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer*, 92(12), 2195-2200. doi: 10.1038/sj.bjc.6602648
- Anstasiou-Fotaki, P., Deligeoroglou, E., & Kreatsas, G. (2007). The GARDASIL vaccine can prevent cervical carcinoma caused by human papilloma virus (HPV) (results from our participation and from the study carried out in Greece). *Akush Ginekol (Sofiia)*, 46(3), 17-20.
- Ault, K. A. (2006). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2006 Suppl, 40470. doi: 10.1155/IDOG/2006/40470
- Badaracco, G., Venuti, A., Sedati, A., & Marcante, M. L. (2002). HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol*, 67(4), 574-582. doi: 10.1002/jmv.10141
- Barbosa, M. S., & Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene*, 4(12), 1529-1532.
- Bergeron, C. (2003). The 2001 Bethesda system. *Salud Publica Mex*, 45 Suppl 3, S340-344.
- Berget, A., Olsen, J., & Poll, P. (1977). Sensitivity and specificity of screening by cervico-vaginal cytology. *Dan Med Bull*, 24(1), 26-29.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., . . . Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87(11), 796-802.

- Camargo, M., Soto-De Leon, S. C., Sanchez, R., Perez-Prados, A., Patarroyo, M. E., & Patarroyo, M. A. (2011). Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia. *Ann Epidemiol*, *21*(3), 204-213. doi: 10.1016/j.annepidem.2010.11.003
- Canfell, K., Shi, J. F., Lew, J. B., Walker, R., Zhao, F. H., Simonella, L., . . . Qiao, Y. L. (2011). Prevention of cervical cancer in rural China: evaluation of HPV vaccination and primary HPV screening strategies. *Vaccine*, *29*(13), 2487-2494. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.085
- Carter, J. J., Koutsky, L. A., Hughes, J. P., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N., & Galloway, D. A. (2000). Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*, *181*(6), 1911-1919. doi: 10.1086/315498
- Castellsague, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, *110*(3 Suppl 2), S4-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.045
- Castle, P. E., Walker, J. L., Schiffman, M., & Wheeler, C. M. (2005). Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer*, *117*(6), 1007-1012. doi: 10.1002/ijc.21279
- Coutlee, F., Mayrand, M. H., Roger, M., & Franco, E. L. (2009). Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids. *Public Health Genomics*, *12*(5-6), 308-318. doi: 10.1159/000214921
- Coutlee, F., Rouleau, D., Ferenczy, A., & Franco, E. (2005). The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, *16*(2), 83-91.
- Cuzick, J., Arbyn, M., Sankaranarayanan, R., Tsu, V., Ronco, G., Mayrand, M. H., . . . Meijer, C. J. (2008). Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*, *26 Suppl 10*, K29-41. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.019
- Chang, Y. E., & Laimins, L. A. (2000). Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol*, *74*(9), 4174-4182.
- Cho, Y. S., Kang, J. W., Cho, M., Cho, C. W., Lee, S., Choe, Y. K., . . . Yoon, D. Y. (2001). Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett*, *501*(2-3), 139-145.
- Das, D., Bhattacharjee, B., Sen, S., Mukhopadhyay, I., & Sengupta, S. (2010). Association of viral load with HPV16 positive cervical cancer pathogenesis: causal relevance in isolates harboring

- intact viral E2 gene. *Virology*, 402(1), 197-202. doi: 10.1016/j.virol.2010.03.030
- de Sanjose, S., Bosch, F. X., Munoz, N., Tafur, L., Gili, M., Izarzugaza, I., . . . Shah, K. V. (1996). Socioeconomic differences in cervical cancer: two case-control studies in Colombia and Spain. *Am J Public Health*, 86(11), 1532-1538.
- de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., Clifford, G., Bruni, L., Munoz, N., & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7(7), 453-459. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70158-5
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033
- DeCarlo, C. A., Rosa, B., Jackson, R., Niccoli, S., Escott, N. G., & Zehbe, I. (2012). Toll-like receptor transcriptome in the HPV-positive cervical cancer microenvironment. *Clin Dev Immunol*, 2012, 785825. doi: 10.1155/2012/785825
- Ding, D. C., Hsu, H. C., Huang, R. L., Lai, H. C., Lin, C. Y., Yu, M. H., & Chu, T. Y. (2008). Type-specific distribution of HPV along the full spectrum of cervical carcinogenesis in Taiwan: an indication of viral oncogenic potential. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 140(2), 245-251. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.03.014
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110(5), 525-541. doi: 10.1042/CS20050369
- Duh, D., & Vandevijver, A. (2008). [Human papilloma virus vaccine (Cervarix)]. *J Pharm Belg*, 63(1), 25-26.
- el Awady, M. K., Kaplan, J. B., O'Brien, S. J., & Burk, R. D. (1987). Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology*, 159(2), 389-398.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., . . . Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6), 1374-1403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027
- Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., . . . Franceschi, S. (2012). Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F12-23. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.055
- Franco, E. L. (1991). Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. *Rev Infect Dis*, 13(6), 1195-1206.
- Garcia-Espinosa, B., Nieto-Bona, M. P., Rueda, S., Silva-Sanchez, L. F., Piernas-Morales, M. C., Carro-Campos, P., . . . Moro-Rodriguez, E. (2009). Genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko,

- Equatorial Guinea. *Diagn Pathol*, 4, 31. doi: 10.1186/1746-1596-4-31
- Garcia, D. A., Cid-Arregui, A., Schmitt, M., Castillo, M., Briceno, I., & Aristizabal, F. A. (2011). 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*, 5, 70-79. doi: 10.2174/1874357901105010070
- Garcia, F., Mendez de Galaz, E., Baldwin, S., Papenfuss, M., Giuliano, A. R., Hatch, K., & Davis, J. (2003). Factors that affect the quality of cytologic cervical cancer screening along the Mexico-United States border. *Am J Obstet Gynecol*, 189(2), 467-472.
- Garcia, G. (1970). [Detection of cervical cancer in 75,855 women. Sequence of cancerization of the cervical epithelium]. *Gac Med Mex*, 100(2), 154-167.
- Ghanem, K. G., Datta, S. D., Unger, E. R., Hagensee, M., Shlay, J. C., Kerndt, P., . . . Koutsky, L. A. (2011). The association of current hormonal contraceptive use with type-specific HPV detection. *Sex Transm Infect*, 87(5), 385-388. doi: 10.1136/sextrans-2011-050005
- Gissmann, L., Jochmus, I., Nindl, I., & Muller, M. (1993). Immune response to genital papillomavirus infections in women. Prospects for the development of a vaccine against cervical cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 690, 80-85.
- Gravitt, P. E., Kovacic, M. B., Herrero, R., Schiffman, M., Bratti, C., Hildesheim, A., . . . Burk, R. D. (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*, 121(12), 2787-2793. doi: 10.1002/ijc.23012
- Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., de Sanjose, S., Franceschi, S., & Clifford, G. M. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*, 131(10), 2349-2359. doi: 10.1002/ijc.27485
- Guo, M., Sneige, N., Silva, E. G., Jan, Y. J., Cogdell, D. E., Lin, E., . . . Zhang, W. (2007). Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol*, 20(2), 256-266. doi: 10.1038/modpathol.3800737
- Gupta, S., Sodhani, P., Sharma, A., Sharma, J. K., Halder, K., Charchra, K. L., . . . Das, B. C. (2009). Prevalence of high-risk human papillomavirus type 16/18 infection among women with normal cytology: risk factor analysis and implications for screening and prophylaxis. *Cytopathology*, 20(4), 249-255. doi: 10.1111/j.1365-2303.2008.00611.x
- Gutierrez-Xicotencatl, L., Salazar-Pina, D. A., Pedroza-Saavedra, A., Chihu-Amparan, L., Rodriguez-Ocampo, A. N., Maldonado-

- Gama, M., & Esquivel-Guadarrama, F. R. (2016). Humoral Immune Response Against Human Papillomavirus as Source of Biomarkers for the Prediction and Detection of Cervical Cancer. *Viral Immunol*. doi: 10.1089/vim.2015.0087
- Haghshenas, M., Golini-Moghaddam, T., Rafiei, A., Emadeian, O., Shykhpour, A., & Ashrafi, G. H. (2013). Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study. *Infect Agent Cancer*, 8(1), 20. doi: 10.1186/1750-9378-8-20
- Hart, K. W., Williams, O. M., Thelwell, N., Fiander, A. N., Brown, T., Borysiewicz, L. K., & Gelder, C. M. (2001). Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 39(9), 3204-3212.
- Hernandez-Hernandez, D. M., Ornelas-Bernal, L., Guido-Jimenez, M., Apresa-Garcia, T., Alvarado-Cabrero, I., Salcedo-Vargas, M., . . . Garcia-Carranca, A. (2003). Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol*, 90(2), 310-317.
- Hernandez, B. Y., McDuffie, K., Goodman, M. T., Wilkens, L. R., Thompson, P., Zhu, X., . . . Ning, L. (2006). Comparison of physician- and self-collected genital specimens for detection of human papillomavirus in men. *J Clin Microbiol*, 44(2), 513-517. doi: 10.1128/JCM.44.2.513-517.2006
- Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Hutchinson, M., Morales, J., . . . Schiffman, M. (2000). Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*, 92(6), 464-474.
- Ho, G. Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J., & Burk, R. D. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 338(7), 423-428. doi: 10.1056/NEJM199802123380703
- Hudelist, G., Manavi, M., Pischinger, K. I., Watkins-Riedel, T., Singer, C. F., Kubista, E., & Czerwenka, K. F. (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*, 92(3), 873-880. doi: 10.1016/j.ygyno.2003.11.035
- Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. (2007). Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 90, 1-636.
- Ibeanu, O. A. (2011). Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther*, 11(3), 295-306.
- Iftner, T., & Villa, L. L. (2003). Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*(31), 80-88.
- Insinga, R. P., Dasbach, E. J., Elbasha, E. H., Liaw, K. L., & Barr, E. (2007). Progression and regression of incident cervical HPV 6,

- 11, 16 and 18 infections in young women. *Infect Agent Cancer*, 2, 15. doi: 10.1186/1750-9378-2-15
- Ishi, K., Suzuki, F., Yamasaki, S., Suto, H., Kina, K., Nojima, M., & Yoshida, K. (2004). Prevalence of human papillomavirus infection and correlation with cervical lesions in Japanese women. *J Obstet Gynaecol Res*, 30(5), 380-385. doi: 10.1111/j.1447-0756.2004.00213.x
- Jacobs, M. V., Walboomers, J. M., Snijders, P. J., Voorhorst, F. J., Verheijen, R. H., Fransen-Daalmeijer, N., & Meijer, C. J. (2000). Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*, 87(2), 221-227.
- Josefsson, A. M., Magnusson, P. K., Ylitalo, N., Sorensen, P., Qwarforth-Tubbin, P., Andersen, P. K., . . . Gyllensten, U. B. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*, 355(9222), 2189-2193. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02401-6
- Jundt, F., Herr, I., Angel, P., Zur Hausen, H., & Bauknecht, T. (1995). Transcriptional control of human papillomavirus type 18 oncogene expression in different cell lines: role of transcription factor YY1. *Virus Genes*, 11(1), 53-58.
- Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., & Kapsenberg, M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*, 20(12), 561-567.
- Kamper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H. C., Florin, L., Bolscher, J., . . . Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol*, 80(2), 759-768. doi: 10.1128/JVI.80.2.759-768.2006
- Kanodia, S., Fahey, L. M., & Kast, W. M. (2007). Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*, 7(1), 79-89.
- Kataja, V., Syrjanen, S., Yliskoski, M., Hippelinen, M., Vayrynen, M., Saarikoski, S., . . . Syrjanen, K. (1993). Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 138(9), 735-745.
- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther*, 7(1), 12-19. doi: 10.1186/ar1469
- Kitchener, H. C., Castle, P. E., & Cox, J. T. (2006). Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/63-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.113
- Labropoulou, V., Diakomanolis, E., Dailianas, S., Kalpaktsoglou, K., Balamotis, A., & Mavromara, P. (1997). Type-specific prevalence of genital human papillomaviruses in benign,

- pre-malignant, and malignant biopsies in patients from Greece. *Sex Transm Dis*, 24(8), 469-474.
- Leon, S., Sanchez, R., Patarroyo, M. A., Camargo, M., Mejia, A., Urquiza, M., & Patarroyo, M. E. (2009). Prevalence of HPV-DNA and anti-HPV antibodies in women from Girardot, Colombia. *Sex Transm Dis*, 36(5), 290-296. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318195762c
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J., & Clifford, G. M. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*, 128(4), 927-935. doi: 10.1002/ijc.25396
- Lum, A., & Le Marchand, L. (1998). A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7(8), 719-724.
- Lynge, E., & Rebolj, M. (2009). Primary HPV screening for cervical cancer prevention: results from European trials. *Nat Rev Clin Oncol*, 6(12), 699-706. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.167
- Matthews, K., Leong, C. M., Baxter, L., Inglis, E., Yun, K., Backstrom, B. T., . . . Hibma, M. (2003). Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol*, 77(15), 8378-8385.
- Moberg, M., Gustavsson, I., & Gyllensten, U. (2003). Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 41(7), 3221-3228.
- Moberg, M., Gustavsson, I., & Gyllensten, U. (2004). Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer*, 112(5), 854-859. doi: 10.1002/ijc.20480
- Molano, M., Posso, H., Weiderpass, E., van den Brule, A. J., Ronderos, M., Franceschi, S., . . . Study, H. P. V. S. G. H. (2002). Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*, 87(3), 324-333. doi: 10.1038/sj.bjc.6600442
- Molano, M., van den Brule, A. J., Posso, H., Weiderpass, E., Ronderos, M., Franceschi, S., . . . Group, H. P. V. S. (2002). Low grade squamous intra-epithelial lesions and human papillomavirus infection in Colombian women. *Br J Cancer*, 87(12), 1417-1421. doi: 10.1038/sj.bjc.6600650
- Mora-Garcia, M. L., & Monroy-Garcia, A. (2015). [Immune response in cervical cancer. Strategies for the development of therapeutic vaccines]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53 Suppl 2, S206-211.
- Mota, F., Rayment, N., Chong, S., Singer, A., & Chain, B. (1999). The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related pre-malignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol*, 116(1), 33-40.

- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., . . . International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, *348*(6), 518-527. doi: 10.1056/NEJMoa021641
- Munoz, N., Castellsague, X., Bosch, F. X., Tafur, L., de Sanjose, S., Aristizabal, N., . . . Shah, K. V. (1996). Difficulty in elucidating the male role in cervical cancer in Colombia, a high-risk area for the disease. *J Natl Cancer Inst*, *88*(15), 1068-1075.
- Munoz, N., Castellsague, X., de Gonzalez, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, *24 Suppl 3*, S3/1-10. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.115
- Munoz, N., Hernandez-Suarez, G., Mendez, F., Molano, M., Posso, H., Moreno, V., . . . Instituto Nacional de Cancerologia, H. P. V. S. G. (2009). Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*, *100*(7), 1184-1190. doi: 10.1038/sj.bjc.6604972
- Murillo, R. (2008). [Cervical cancer control in Colombia: achievements and challenges of cytology based programs]. *Biomedica*, *28*(4), 467-470.
- Murillo, R., Molano, M., Martinez, G., Mejia, J. C., & Gamboa, O. (2009). HPV prevalence in Colombian women with cervical cancer: implications for vaccination in a developing country. *Infect Dis Obstet Gynecol*, *2009*, 653598. doi: 10.1155/2009/653598
- Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2015). The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol*, *123*(5), 271-281. doi: 10.1002/cncy.21521
- Niedergang, F., Didierlaurent, A., Kraehenbuhl, J. P., & Sirard, J. C. (2004). Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens? *Trends Microbiol*, *12*(2), 79-88. doi: 10.1016/j.tim.2003.12.011
- Parkin, D. M., & Bray, F. (2006). Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, *24 Suppl 3*, S3/11-25. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.111
- Partridge, J. M., & Koutsky, L. A. (2006). Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis*, *6*(1), 21-31. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70323-6
- Payan, C., Ducancelle, A., Aboubaker, M. H., Caer, J., Tapia, M., Chauvin, A., . . . Lunel, F. (2007). Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol*, *45*(3), 897-901. doi: 10.1128/JCM.02022-06
- Pirami, L., Giache, V., & Becciolini, A. (1997). Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol*, *50*(7), 600-604.

- Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C. J., Ho, G. Y., Klein, R. S., & Burk, R. D. (1997). PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*, 35(6), 1304-1310.
- Rajkumar, T., Franceschi, S., Vaccarella, S., Gajalakshmi, V., Sharmila, A., Snijders, P. J., . . . Herrero, R. (2003). Role of paan chewing and dietary habits in cervical carcinoma in Chennai, India. *Br J Cancer*, 88(9), 1388-1393. doi: 10.1038/sj.bjc.6600902
- Ramanakumar, A. V., Goncalves, O., Richardson, H., Tellier, P., Ferenczy, A., Coutlee, F., & Franco, E. L. (2010). Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis*, 10, 326. doi: 10.1186/1471-2334-10-326
- Remmerbach, T. W., Brinckmann, U. G., Hemprich, A., Chekol, M., Kuhndel, K., & Liebert, U. G. (2004). PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol*, 30(4), 302-308. doi: 10.1016/j.jcv.2003.12.011
- Romanczuk, H., Villa, L. L., Schlegel, R., & Howley, P. M. (1991). The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol*, 65(5), 2739-2744.
- Saunier, M., Monnier-Benoit, S., Mauny, F., Dalstein, V., Briolat, J., Riethmuller, D., . . . Pretet, J. L. (2008). Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol*, 46(11), 3678-3685. doi: 10.1128/JCM.01212-08
- Scarinci, I. C., Garcia, F. A., Kobetz, E., Partridge, E. E., Brandt, H. M., Bell, M. C., . . . Castle, P. E. (2010). Cervical cancer prevention: new tools and old barriers. *Cancer*, 116(11), 2531-2542. doi: 10.1002/cncr.25065
- Schlegel, R., Phelps, W. C., Zhang, Y. L., & Barbosa, M. (1988). Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J*, 7(10), 3181-3187.
- Schmitt, M., Depuydt, C., Benoy, I., Bogers, J., Antoine, J., Pawlita, M., . . . group, V. s. (2013). Viral load of high-risk human papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(3), 406-414. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-1067
- Schmitz, M., Scheungraber, C., Herrmann, J., Teller, K., Gajda, M., Runnebaum, I. B., & Durst, M. (2009). Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol*, 44(4), 302-307. doi: 10.1016/j.jcv.2009.01.006

- Shin, H. R., Franceschi, S., Vaccarella, S., Roh, J. W., Ju, Y. H., Oh, J. K., . . . Quint, W. (2004). Prevalence and determinants of genital infection with papillomavirus, in female and male university students in Busan, South Korea. *J Infect Dis*, 190(3), 468-476. doi: 10.1086/421279
- Sierra-Torres, C. H., Acosta-Aragon, M. P., & Orejuela-Aristizabal, L. (2006). [Papillomavirus and factors associated with high-risk, cervical intraepithelial neoplasia in Cauca, Colombia]. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 8 Suppl 1, 47-58.
- Sierra-Torres, C. H., Arboleda-Moreno, Y. Y., & Orejuela-Aristizabal, L. (2006). Exposure to wood smoke, HPV infection, and genetic susceptibility for cervical neoplasia among women in Colombia. *Environ Mol Mutagen*, 47(7), 553-561. doi: 10.1002/em.20228
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., . . . Bethesda, W. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 287(16), 2114-2119.
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., . . . Bultmann, B. (2004). Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42(7), 3176-3184. doi: 10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004
- Soto-De Leon, S., Camargo, M., Sanchez, R., Munoz, M., Perez-Prados, A., Purroy, A., . . . Patarroyo, M. A. (2011). Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. *PLoS One*, 6(2), e14705. doi: 10.1371/journal.pone.0014705
- Soto-De Leon, S. C., Camargo, M., Sanchez, R., Leon, S., Urquiza, M., Acosta, J., . . . Patarroyo, M. A. (2009). Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. *Clin Microbiol Infect*, 15(1), 100-102. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02120.x
- Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24 Suppl 1, S16-22. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.002
- Stanley, M., Gissmann, L., & Nardelli-Haefliger, D. (2008). Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines. *Vaccine*, 26 Suppl 10, K62-67. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.066
- Trottier, H., & Burchell, A. N. (2009). Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics*, 12(5-6), 291-307. doi: 10.1159/000214920
- Unger, E. R., Vernon, S. D., Thoms, W. W., Nisenbaum, R., Spann, C. O., Horowitz, I. R., . . . Reeves, W. C. (1995). Human papillomavirus and disease-free survival in FIGO stage Ib cervical cancer. *J Infect Dis*, 172(5), 1184-1190.
- Van Doorslaer, K. (2013). Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, 445(1-2), 11-20. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.012

- van Duin, M., Snijders, P. J., Schrijnemakers, H. F., Voorhorst, F. J., Rozendaal, L., Nobbenhuis, M. A., . . . Meijer, C. J. (2002). Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer*, 98(4), 590-595.
- Vernon, S. D., Unger, E. R., Miller, D. L., Lee, D. R., & Reeves, W. C. (1997). Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer*, 74(1), 50-56.
- Viikki, M., Pukkala, E., & Hakama, M. (2000). Risk of cervical cancer subsequent to a positive screening cytology: follow-up study in Finland. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79(7), 576-579.
- Villa, L. L., & Schlegel, R. (1991). Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology*, 181(1), 374-377.
- Vogolino, G., Poso, F., Privitera, S., Parisio, F., Ghiringhello, B., Gordini, G., . . . Fessia, L. (2000). [The role of human papillomavirus in cyto-histological practice: distribution and prevalence of high-risk strains (16, 18, 31, 33, and 35) in intraepithelial lesions and neoplasia of the uterine cervix]. *Pathologica*, 92(6), 516-523.
- Waggoner, S. E. (2003). Cervical cancer. *Lancet*, 361(9376), 2217-2225. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13778-6
- Wang, S. S., & Hildesheim, A. (2003). Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*(31), 35-40.
- Wiesner-Ceballos, C., Murillo Moreno, R. H., Pineros Petersen, M., Tovar-Murillo, S. L., Cendales Duarte, R., & Gutierrez, M. C. (2009). [Control of cervical cancer in Colombia: the perspective of the health system]. *Rev Panam Salud Publica*, 25(1), 1-8.
- Wu, Y., Chen, Y., Li, L., Yu, G., Zhang, Y., & He, Y. (2006). Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol*, 35(3), 264-269. doi: 10.1016/j.jcv.2005.07.011
- Ylitalo, N., Sorensen, P., Josefsson, A. M., Magnusson, P. K., Andersen, P. K., Ponten, J., . . . Melbye, M. (2000). Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*, 355(9222), 2194-2198. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02402-8
- Yoshida, T., Sano, T., Oyama, T., Kanuma, T., & Fukuda, T. (2009). Prevalence, viral load, and physical status of HPV 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 455(3), 253-259. doi: 10.1007/s00428-009-0823-x
- zur Hausen, H. (1976). Biochemical approaches to detection of Epstein-Barr virus in human tumors. *Cancer Res*, 36(2 pt 2), 678-680.

## Anexos

### Anexo 1. Declaración de consentimiento informado

#### Declaración de Consentimiento Informado

Proyecto: Determinación de la Carga Viral del Virus Papiloma Humano (VPH) y su Relación Con Diferentes Factores de Riesgo en el Departamento de Sucre

Si usted autoriza su participación en este estudio, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.

Yo, \_\_\_\_\_

Nombre completo de la persona que entrega el consentimiento declaro que se me han leído y explicado detalladamente los objetivos, los procedimientos y todos los aspectos relacionados con este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.

Acepto voluntariamente mi participación en el estudio y sé que estoy en libertad de retirarme cuando lo desee.

\_\_\_\_\_

Firma de la persona que entrega el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_)

\_\_\_\_\_

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento

\_\_\_\_\_

Firma del profesional que obtuvo el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_)

Testigo 1 Testigo 2

Nombre: \_\_\_\_\_ Nombre: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Encuesta Epidemiológica

**Proyecto:** Determinación de la Carga Viral de Virus Papiloma Humano (tipos 16 y 18) mediante PCR tiempo real en mujeres con lesión cervical del departamento de Sucre

**Encuesta Epidemiológica:** Características sociodemográficas y Comportamiento Sexual de las mujeres participantes en el estudio.

NÚMERO DE REGISTRO \_\_\_\_\_

FECHA DE DILIGENCIAMIENTO DIA \_\_\_\_ MES \_\_\_\_ AÑO \_\_\_\_

I. Nombre de la participante: \_\_\_\_\_

II. Edad: \_\_\_\_\_

IV. Estado Civil: Soltera ( ) Casada ( ) Unión Libre ( )

V. Dirección: \_\_\_\_\_ VI. Municipio: \_\_\_\_\_

VII. Teléfono: \_\_\_\_\_

VIII. Infección por VPH:

( ) SI Cuál ? \_\_\_\_\_

( ) NO

XI. Factores de riesgo

Escolaridad

( ) Analfabeta

( ) Primaria

( ) Secundaria

( ) Técnica

( ) Profesional

X. Edad inició relaciones sexuales? \_\_\_\_\_

XI. Número de parejas sexuales (en toda su vida)

( ) Una

( ) Dos

( ) Tres o Más de tres

XIII. Antecedentes Obstétricos:

( ) Un parto

( ) Dos partos

( ) Tres o más partos

XIV. Método de planificación

Hormonal ( ) Preservativo ( ) Ninguno ( ).