

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Vice dirección: Microbiología

Departamento de Virología

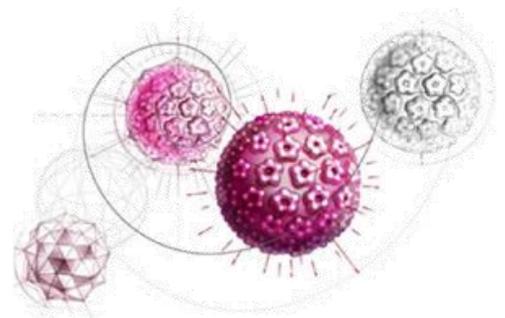
Papilomavirus humanos y factores asociados al desarrollo de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino y anal en poblaciones de riesgo.

La Habana, Cuba, 2007-2012.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Yudira Soto Brito. *MSc.*

La Habana
2015



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Vice dirección: Microbiología

Departamento de Virología

Papilomavirus humanos y factores asociados al desarrollo de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino y anal en poblaciones de riesgo. La Habana, Cuba, 2007-2012.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Yudira Soto Brito. *MsC.*

Tutores:

Dra. Vivian Kourí Cardellá, *Dr. C. Prof. Titular. Inv. Titular*

Dra. María Eugenia Toledo Romani, *Dr. C.*

Asesora:

Dra. Mayra Muné Jiménez, *Dr. C. Prof. Titular. Inv. Titular*

**La Habana
2015**

Agradezco a todo el equipo multidisciplinario que hizo posible la realización de este trabajo: especialistas, técnicos, personal de enfermería y pacientes.

Muchas gracias a todos mis compañeros y profesores.

A mis padres

A mi hijo

A Leo

LISTADO DE ABREVIATURAS

- AAR:** anoscopia de alta resolución
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNg:** ácido desoxirribonucleico genómico
- ADNs:** ácidos desoxirribonucleicos
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- ATCC:** colección americana de cultivos tipo (del inglés, *American Type Culture Collection*)
- BLAST:** proceso básico de alineamiento (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*)
- CA:** cáncer anal
- CC:** cáncer cervicouterino
- CCB:** carcinoma de células basales
- CCE:** carcinoma de células escamosas
- CRPV:** Papilomavirus de conejo de cola algodonosa (del inglés *cottontail rabbit papillomavirus*)
- dNTP:** desoxirribonucleótidos trifosfato
- E:** temprano (del inglés *early*)
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico (del inglés *epidermal growth factor*)
- ELISA:** del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
- FIGO:** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
- FDA:** Agencia de Drogas y Alimentos (del inglés *food and drug administration agency*)
- HSH:** hombres que tienen sexo con otros hombres
- HSM:** hombres que tienen sexo con mujeres
- HT:** heterosexuales
- IC:** intervalo de confianza
- IPK:** Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
- ITS:** infecciones de transmisión sexual
- L:** tardío (del inglés *late*)
- LCR:** región de control (del inglés *long control region*)

LIE: lesiones intraepiteliales escamosas

LIEA: lesiones intraepiteliales escamosas anales

MAL: marco abierto de lectura

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés *Major Histocompatibility Complex*)

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

NIA: neoplasia intraepitelial anal

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: razón de productos cruzados (del inglés *odd ratio*)

pb: pares de base

pRb: proteína del retinoblastoma.

PRR: papilomatosis respiratoria recurrente

PV: Papilomavirus

PVB 1: Papilomavirus bovino tipo 1

PVH: Papilomavirus humanos

PVH-AR: Papilomavirus humanos de alto riesgo oncogénico

PVH-BR: Papilomavirus humanos de bajo riesgo oncogénico

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RCP-TR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RIC: rango intercuartil

RP: razón de prevalencia

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VLP: partículas tipo virus (del inglés *virus like particles*)

βG: β-globina

SÍNTESIS

Se presentan evidencias sobre la frecuencia de circulación de Papilomavirus humanos (PVH) en diferentes grupos de riesgo de la población cubana residente en La Habana y su relación con variables virológicas y clínico-epidemiológicas. Se estudiaron mujeres entre 15 y 59 años con una citología negativa previa (2007-2009), mujeres mayores de 30 años con citología positiva (2009-2011) y hombres seropositivos a VIH (abril-agosto 2012). Se demostró, mediante detección de ADN, secuenciación nucleotídica y cuantificación viral, una frecuencia elevada de infección por PVH, por encima de 50%. Los genotipos oncogénicos 16, 18, 31, 45, 52 y 58 fueron los más frecuentes. La carga viral de PVH 16, 18 y 58 se asoció con el incremento de la severidad de las lesiones cervicales. Los factores de riesgo ($p < 0,05$) para adquirir la infección o para desarrollar lesiones precursoras de cáncer cervicouterino y anal fueron: el consumo prolongado de anticonceptivos orales, el hábito de fumar, el nivel de escolaridad por debajo del nivel medio y la práctica sexual ano-receptiva y oral-genital. Esta es la primera investigación sobre la frecuencia de infección y epidemiología molecular de PVH en grupos de riesgo de la población cubana, incluyendo individuos de diferentes edades y sexo. Los resultados apoyan el uso de la vacuna contra PVH y la inclusión de la pesquisa de PVH dentro del programa de detección precoz del cáncer cervicouterino.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN	1
I.1 ANTECEDENTES	1
I.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO	3
I.3 OBJETIVOS	3
I.4 NOVEDAD CIENTÍFICA	4
I.5 VALOR TEÓRICO Y PRÁCTICO	5
II MARCO TEÓRICO	8
II.1 HISTORIA	8
II.2 CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA	9
II.3 ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN	10
II.3.1 Estructura viral	10
II.3.2 Organización genómica y proteínas virales	10
II.3.3 Replicación viral y diferenciación del epitelio	12
II.4 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN ANOGENITAL POR PVH	12
II.5 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN ANAL POR PVH EN INMUNOCOMPROMETIDOS	14
II.6 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES ANOGENITALES POR PVH	15
II.6.1 Infecciones anogenitales en hombres	16
II.6.1.1 Infección anal en hombres seropositivos a VIH	17
II.6.2 Infección anogenital por PVH en Cuba	17
II.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	18
II.7.1 Lesiones benignas en la mucosa anogenital	18
II.7.2 Lesiones malignas en la mucosa anogenital	18
II.7.3 Manifestaciones clínicas en otras localizaciones anatómicas	20
II.8 INMUNIDAD	20
II.9 DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR PVH	22
II.9.1 Métodos de hibridación de ácidos nucleicos	22
II.9.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	23
II.9.3 RCP en Tiempo Real (RCP-TR)	23
II.9.4 Métodos comerciales para la detección de ácidos nucleicos de PVH	23
II.10 PREVENCIÓN Y CONTROL	24
II.10.1 Prevención de la transmisión sexual	24
II.10.2 Vacunación como método de prevención del CC	24
II.10.3 Pesquisa del cáncer cervicouterino	25
II.10.4 Pesquisa del cáncer anal	26
II.11 OPCIONES TERAPÉUTICAS EN LA ACTUALIDAD	26
III DISEÑO METODOLÓGICO	28
III.1 DISEÑO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN Y PRESENTACIÓN DE LOS ESTUDIOS	28

III.2. FRECUENCIA DE INFECCIÓN CERVICAL POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS, GENOTIPOS CIRCULANTES Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS EN MUJERES SEXUALMENTE ACTIVAS, ENTRE 15 Y 59 AÑOS, RESIDENTE EN 4 MUNICIPIOS DE LA HABANA.....	29
III.2.1 Diseño del estudio, horizonte temporal, universo y muestra	29
III.2.2 Operacionalización de las variables.....	30
III.2.3 Muestras clínicas.....	30
III.2.4 Técnicas y procedimientos	30
III.2.4.1 Toma de muestras clínicas	30
III.2.4.2 Análisis citomorfológico-colposcópico.....	31
III 2.4.3 Detección y genotipificación de PVH.....	31
III 2.4.3.A Extracción de ADN	31
III.2.4.3.B RCP cualitativa.....	32
III.2.4.3.C Hibridación “Dot Blot” para la genotipificación de PVH	33
III.2.5 Técnicas de recolección, procesamiento y análisis de la información.....	33
III.2.6 Consideraciones éticas	34
III.3 FRECUENCIA DE INFECCIÓN, GENOTIPOS DE PVH, VALOR DE LA CARGA VIRAL Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN VIRAL Y AL GRADO DE LAS LESIONES CERVICOUTERINAS, EN MUJERES MAYORES DE 30 AÑOS, CON CITOLOGÍA POSITIVA.....	34
III.3.1 Diseño del estudio, horizonte temporal, universo y muestra	34
III.3.2 Muestras clínicas.....	35
III.3.3 Operacionalización de las variables.....	35
III.3.4 Técnicas y procedimientos	35
III.3.4.1 Toma de muestras clínicas	35
III.3.4.2 Análisis citomorfológico-colposcópico.....	36
III.3.4.3 Detección y genotipificación de PVH.....	36
III.3.4.3.A Extracción de ADN	36
III.3.4.3.B Implementación de la RCP-TR y obtención de las curvas estándares	36
III.3.4.3.C Aplicación de la RCP-TR a las muestras clínicas.....	38
III.3.4.3.D RCP cualitativa.....	38
III.3.4.3.E Secuenciación nucleotídica	39
III.3.4.3.F Análisis filogenético	39
III.3.5 Técnicas de recolección, procesamiento y análisis de la información.....	39
III.3.6 Consideraciones éticas	40
III.4 FRECUENCIA DE INFECCIÓN ANAL, GENOTIPOS DE PAPILOMAVIRUS HUMANOS, VALOR DE LA CARGA VIRAL Y SU ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS EN HOMBRES CUBANOS SEROPOSITIVOS A VIH CON OTRAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL.....	40
III.4.1 Diseño del estudio, horizonte temporal, universo y muestra	40
III.4.2 Muestras clínicas.....	41
III.4.3 Operacionalización de las variables.....	41
III.4.4 Técnicas y procedimientos	41
III.4.4.1 Toma de muestras clínicas	41
III.4.4.2 Análisis citomorfológico.....	42
III.4.4.3 Detección y genotipificación de PVH	42
III.4.4.3.A Extracción de ADN	42
III.4.4.3.B RCP cualitativa tipo específica para PVH 6 y 11	42
III.4.4.3.C RCP-TR para la detección de PVH en células de la mucosa anal	43
III.4.5 Técnicas de recolección, análisis y procesamiento de la información.....	43
III.4.6 Consideraciones éticas	43

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
IV.1 FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR PVH, PRESENCIA DE LESIONES INTRAEPITELIALES CERVICALES Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS EN MUJERES SEXUALMENTE ACTIVAS, ENTRE 15 Y 59 AÑOS, RESIDENTE EN 4 MUNICIPIOS DE LA HABANA	45
IV.1.1 Frecuencia de infección por PVH y su relación con el resultado de la citología cervical	45
IV.1.2 Genotipos de PVH más frecuentes en población femenina, entre 15 y 59 años y su relación con la presencia de las lesiones detectadas en la citología cervical.....	47
IV.1.3 Variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas asociadas con la infección por PVH en población femenina entre 15 y 59 años	50
IV.1.4 Variables predictivas para la infección con genotipos de PVH de alto riesgo oncogénico y para el desarrollo de las lesiones cervicales de alto grado en población femenina, entre 15 y 59 años	53
IV.2 FRECUENCIA DE GENOTIPOS DE PVH, CARGA VIRAL Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA PRESENCIA DE LESIONES INTRAEPITELIALES CERVICALES DE ALTO GRADO, BAJO GRADO Y CÁNCER EN MUJERES MAYORES DE 30 AÑOS	57
IV.2.1 Implementación de la RCP-TR para la detección de PVH. Confección de las curvas estándares	57
IV.2.2 Aplicación de la RCP-TR a las muestras clínicas	60
IV.2.3 Secuenciación nucleotídica y análisis filogenético.....	60
IV.2.4 Frecuencia de infección por PVH en mujeres mayores de 30 años. Relación con el resultado de la citología confirmatoria.....	61
IV.2.5 Genotipos de PVH más frecuentes en mujeres mayores de 30 años y su asociación con el grado de las lesiones citológicas.....	64
IV.2.6 Variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas asociadas con la infección por PVH en mujeres mayores de 30 años.....	67
IV.2.7 Predictores de riesgo para la infección viral y para la progresión de las lesiones cervicales en mujeres mayores de 30 años.....	70
IV.2.8 Valor de la carga viral de PVH oncogénicos en mujeres mayores de 30 años	71
IV.3 FRECUENCIA DE INFECCIÓN ANAL, GENOTIPOS DE PAPILOMAVIRUS HUMANOS, VALOR DE LA CARGA VIRAL Y ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS EN HOMBRES CUBANOS SEROPOSITIVOS A VIH CON OTRAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL	74
IV.3.1 Frecuencia de infección por PVH en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH. Relación con el resultado de la citología anal.....	74
IV.3.2 Genotipos de PVH más frecuentes en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH y su asociación con el grado de las lesiones citológicas anales.....	79
IV.3.3 Valor de la carga viral de PVH oncogénicos en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH y su asociación con el grado de las lesiones citológicas anales.....	82
IV.3.4 Relación entre los factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos y la infección por PVH detectada en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH	83
IV.3.5 Relación entre los factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos y las lesiones detectadas en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH.....	86
V DISCUSIÓN INTEGRADA.....	91
VI CONCLUSIONES	96
VII RECOMENDACIONES	97
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
IX ANEXOS	115

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

Los Papilomavirus humanos (PVH) son partículas virales con genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. En la actualidad se han identificado más de 120 genotipos de PVH sobre la base de la comparación de secuencias de ADN. Alrededor de 40 de estos genotipos se asocian con infecciones de la mucosa anogenital. La infección anogenital por PVH es la infección de transmisión sexual (ITS) con mayor incidencia en el mundo, pues cerca del 90% de la población sexualmente activa está infectada por estos virus. Esta ITS no está eficientemente controlada por la carencia de antivirales específicos y por el limitado acceso en el mundo al programa de inmunización actual contra estos agentes infecciosos (1).

Diversos estudios sobre la historia natural de la infección por PVH en el cuello uterino, demuestran que la mayoría de las infecciones pueden ser autolimitadas sin ningún cambio citológico detectable. Sin embargo, en los casos sintomáticos las manifestaciones clínicas incluyen condilomas benignos y lesiones intraepiteliales cervicales de diferente grado. De ellas, solo cerca del 10% resultan en lesiones persistentes, de las cuales, aproximadamente 75% evolucionan hacia la carcinogénesis (2, 3).

El cáncer cervicouterino (CC) es una de las causas de muerte más importante a nivel global en mujeres mayores de 30 años, pues aproximadamente 530,000 casos nuevos se diagnostican cada año y cerca de 275,000 muertes en igual período (2, 3). Existe un consenso general, basado en evidencias epidemiológicas, clínicas y virológicas que han permitido demostrar que la infección por PVH es la causa etiología del CC. Varios estudios confirman una alta incidencia y estrecha relación entre el CC y la presencia de ADN de PVH, especialmente con los genotipos de alto riesgo (PVH-AR), cuyo genoma se ha encontrado en más del 90% de todos los carcinomas de células escamosas del tracto anogenital. El comportamiento sexual y reproductivo, las condiciones socioeconómicas, el hábito de fumar y el uso de anticonceptivos orales, constituyen factores de riesgo para contraer la infección viral o para desarrollar lesiones asociadas a dicha infección (1, 4).

De manera rutinaria y establecida por los programas de control del CC, las lesiones del epitelio cervical se detectan por citología, observación colposcópica y análisis histológico. Estos métodos de diagnóstico son importantes en la evolución clínica de las pacientes, sin embargo, no detectan la infección viral y la sensibilidad de los mismos no permite una evaluación precoz de la progresión de las lesiones asociadas a PVH-AR. La infección debe ser identificada mediante la detección del ADN viral a través de técnicas de biología molecular,

específicamente mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), que permite detectar un espectro amplio de genotipos virales. Hasta el momento, la RCP es el método de detección del ADN viral más sensible para demostrar la infección por PVH en lesiones cervicales, pero la posibilidad de extender esta técnica a la pesquisa poblacional es limitada por el costo que esto representa. Los métodos de RCP-hibridación, RCP en tiempo real (RCP-TR) y la secuenciación nucleotídica ofrecen la capacidad de identificar diferentes genotipos de PVH y establecer una asociación entre los tipos virales específicos, las lesiones precursoras de cáncer anogenital y su pronóstico (5).

Los tumores malignos constituyen la primera causa de muerte en todo el planeta y en Cuba existe una tendencia similar (6, 7). A pesar de los esfuerzos realizados por el Programa para el Diagnóstico Precoz del Cáncer del Cuello de Útero (8) en Cuba, esta patología es la tercera en incidencia y la quinta causa de muerte por cáncer, en las mujeres en edad reproductiva. Según el anuario estadístico del MINSAP, en el año 2014 la tasa de muerte por cáncer cervicouterino fue de 8,4/100 000 (9). Estas cifras pueden reducirse si al programa de prevención del CC que se lleva a cabo en Cuba, se incorporaran los métodos moleculares para la detección y tipificación de PVH. La aplicación de estos métodos, junto a los estudios citológicos en mujeres con citologías anormales, permitiría establecer un mejor pronóstico y tratamiento de las pacientes. También, sería una herramienta útil para determinar qué genotipos circulan en la población sin antecedentes de anomalías citológicas y su potencialidad para desarrollar lesiones precursoras del cáncer cervicouterino y anogenital. De esta forma se lograría establecer un seguimiento de la progresión de las lesiones mediante la determinación de la carga viral de PVH-AR y se utilizaría esta información para el uso de tratamientos bien dirigidos a infecciones con éstos genotipos que inducen una progresión rápida al cáncer invasivo. Además, estos programas conducirían a orientar el uso de la vacunación en un futuro con un buen análisis del costo/beneficio.

Es conocido el papel de las infecciones por PVH en el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer en otras localizaciones del tracto genital inferior como la vulva o la vagina en las mujeres y en el pene, en el caso de los hombres. El ano es también considerado un órgano donde las prácticas sexuales o la cercanía a la vagina, conduce a la transmisión de la infección con PVH en mujeres y hombres (10).

El cáncer anal (CA) en la población general no suele ser muy frecuente, aunque su incidencia se ha incrementado en los últimos 20-30 años, sobre todo en poblaciones de riesgo como son: mujeres con antecedentes de lesiones malignas cervicales asociadas a la infección por PVH, pacientes trasplantados y en aquellos individuos que viven infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)/sida (11). La incidencia de CA es mayor en hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH), particularmente en aquellos

infectados con VIH. Actualmente, en estos grupos de individuos se ha logrado establecer la asociación entre la infección por PVH y la progresión al CA (12, 13).

Por lo tanto, se hace necesario conocer la frecuencia de infección por PVH en el canal anal de hombres cubanos seropositivos a VIH y determinar la frecuencia de lesiones intraepiteliales escamosas anales (LIEA), así se podría evaluar la factibilidad de estudiar, mediante un sistema de pesquisa virológica y citológica, la evolución de estos pacientes hacia el CA, que es cada vez más frecuente en este grupo de riesgo y que pudiera detectarse de manera precoz.

Los aspectos antes mencionados describen una problemática: En Cuba no existen, hasta el momento, estudios de línea de base ni otra información epidemiológica suficiente sobre los genotipos de PVH que circulan en diferentes grupos de riesgo, solo se conocen pocos datos en pequeños grupos de pacientes (14). No se conocen bien las variables asociadas a la infección con genotipos oncogénicos de PVH y al desarrollo de lesiones cervicouterinas y anales causadas por dichos genotipos. No se aplican técnicas de detección de ADN de PVH, genotipificación o monitoreo de la carga viral para su diagnóstico y seguimiento. Con el objetivo de determinar la frecuencia de circulación de Papilomavirus humanos, específicamente los genotipos oncogénicos, en diferentes poblaciones de riesgo residentes en La Habana, Cuba y la asociación de factores virales y clínico-epidemiológicos, con el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino y anal, se han desarrollado una serie de estudios que abordamos en esta investigación y que pretenden demostrar la siguiente hipótesis.

I.2 Hipótesis de trabajo

La infección por Papilomavirus humanos de alto potencial oncogénico, resulta de elevada frecuencia en diferentes grupos de riesgo de la población en Cuba y bajo la influencia de determinados factores, conduce a la progresión de las lesiones precursoras de cáncer cervicouterino y anal.

I.3 Objetivos

General

Determinar la frecuencia de circulación de Papilomavirus humanos en diferentes poblaciones de riesgo residentes en La Habana, Cuba y la asociación de factores virales y clínico-epidemiológicos, con el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino y anal.

Específicos

1. Identificar la frecuencia de infección cervical por Papilomavirus humanos, los genotipos circulantes y su relación con las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en mujeres sexualmente activas, entre 15 y 59 años.
2. Determinar los genotipos de Papilomavirus humanos, el valor de la carga viral y los factores de riesgo asociados a la infección viral y al grado de las lesiones cervicouterinas, en mujeres mayores de 30 años, con citología positiva.
3. Identificar la frecuencia de infección anal, los genotipos de Papilomavirus humanos, el valor de la carga viral y su posible asociación con las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en hombres cubanos seropositivos a VIH con otras infecciones de transmisión sexual.

I.4 Novedad científica

- Es el primer estudio, empleando métodos moleculares, donde se demuestra en individuos cubanos de diferentes edades y sexo, el predominio casi absoluto, de genotipos de Papilomavirus humanos de alto riesgo oncogénico.
- Mediante esta investigación se obtienen las primeras secuencias nucleotídicas de Papilomavirus humanos provenientes de individuos cubanos infectados, lo que aporta datos de interés nacional e internacional.
- Se identifican por primera vez, en diferentes grupos de la población cubana, las variables predictivas para la infección con genotipos oncogénicos de Papilomavirus humanos.
- Se identifican, por primera vez en adolescentes cubanas, infecciones virales con genotipos oncogénicos mediante tecnología de detección de ADN, en las cuales se detectan lesiones cervicales de alto grado que se asocian al inicio temprano de las relaciones sexuales. Este grupo etario no está incluido en el universo del programa para la detección precoz del cáncer cervicouterino.
- Se demuestra, por primera vez, en individuos cubanos infectados por Papilomavirus humanos, el valor de la carga viral de los genotipos oncogénicos 16, 18 y 58 como marcador de severidad de las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino y anal.
- Por primera vez en Cuba se realiza la detección de Papilomavirus humanos y de lesiones precursoras del cáncer anal en hombres seropositivos a VIH, lo que evidencia la elevada prevalencia de genotipos oncogénicos y de coinfecciones. Además, se detecta un gran número de casos con algún tipo de anomalía en la citología anal.

I.5 Valor teórico y práctico

- Este estudio demuestra la elevada prevalencia de los genotipos oncogénicos de Papilomavirus humanos en todos los grupos de individuos estudiados, este aspecto es esencial para proponer al MINSAP la inclusión de las técnicas moleculares para la detección de Papilomavirus humanos como herramienta en el diagnóstico temprano y seguimiento de las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino y anal, así como la necesidad de la vacunación contra Papilomavirus humanos en Cuba.
- La alta prevalencia de los genotipos oncogénicos de Papilomavirus humanos en mujeres con citología negativa indica la necesidad de estudiar con mayor profundidad la posible presencia de citologías atípicas dentro de este grupo, asociadas a la infección con dichos genotipos; este hallazgo permite proponer al Programa Nacional para el Control del Cáncer Cervicouterino, profundizar en estos estudios y la posibilidad de reevaluar y actualizar el sistema de clasificación citológica según la Clasificación Bethesda, 2001.
- Los resultados obtenidos sobre la relación entre las variables clínicas y epidemiológicas predictivas para desarrollar lesiones de alto grado o cáncer y para la infección viral, detectada por métodos moleculares, contribuyen al conocimiento de la interacción virus-hospedero. Además, pudiera indicar puntos vulnerables en la educación sexual de la población, en el papel de la atención primaria de salud y en la necesidad de actualizar los programas para la detección precoz del cáncer cervicouterino y anal.
- Los resultados de esta investigación forman parte de tres publicaciones, han sido presentados en varios eventos científicos y han recibido varios premios y reconocimientos. También han formado parte de dos Tesis de Maestría en Virología y una Tesis de Especialista en Dermatología.

Publicaciones científicas que avalan el resultado

1. Human Papillomavirus Infections in Cuban Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. Yudira Soto, Mayra Muné, Estrella Morales, Adibel Goicolea, Julio Mora, Rosa Ramírez, Vivian Kouri, Melkis Alfonso and Ulrich Hennig. *Sexually Transmitted Diseases*, 34 (12): 974-976, 2007.
2. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación de Papilomavirus Humanos de alto riesgo oncogénico. Soto Y*; Kourí V; Martínez PA; Correa C; Torres G, Goicolea A, Morier L; Capó V, Pérez L; Alemán Y; Rodríguez H; Álvarez A. *Vaccimonitor*; 21 (1): 30-37, 2011.
3. Molecular epidemiology of human papillomavirus infections in cervical samples from Cuban women over 30 years. Yudira Soto, Griselda Torres, Vivian Kourí, Celia María Limia, Adibel Goicolea, Virginia Capó, Lissette Pérez, Ana Isabel de la Torre, Ledy Xiomara López, Anamays Govín, Consuelo Beatriz Correa,

Yoan Alemán, Alina Ana Álvarez, Blanca Rosa Manzano, *Journal of Lower Genital Tract Dis*; 18 (3): 210-17, 2014.

Eventos

- VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y III Congreso de Medicina Tropical, Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba. Diciembre 4-7, 2007.
- Congreso “70 Aniversario del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba, Octubre-Noviembre, 2009.
- 15th International Scientific Congress CNIC 2010, III Symposium on Infectious Diseases and Vaccines. Scientific Meeting, Palacio de Convenciones La Habana, Cuba Junio 28– Julio 1, 2010.
- VII International Congress of Immunology. La Habana, Cuba, Marzo 2011.
- Congreso Quimi-Cuba., La Habana, Cuba. 9-12 Octubre 2012.
- XV Congreso de la Sociedad Cubana de Ginecología y Obstetricia. La Habana. Cuba, Mayo 2013.
- 1er Taller de Virología Médica. La Habana, Cuba, Diciembre 2013.
- Congreso “Patología 2014” Congreso de la Sociedad Cubana de Patología. La Habana, Cuba. Febrero 2014.
- XIV Exposición Nacional “Forjadores del Futuro”, IPK, La Habana, Cuba, Abril 2014.
- Congreso de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología, XVI Congreso Internacional de Virología. Julio 2014. Montreal, Canadá.
- VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. V Congreso Nacional de Medicina Tropical. V Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el sida en Cuba. Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba. 14 al 16 de Octubre, 2014.
- First ICGEB Workshop on Human Papillomavirus: from Basic Biology to Cervical Cancer Prevention, November 19-21, 2014, Rosario, Argentina.
- First International Convention of Immunopharmacology “Vaccipharma 2015”. Junio 2015. Varadero, Matanzas, Cuba.

Proyectos y tesis relacionados con el tema

- Proyecto ramal titulado: Detección y caracterización de infecciones producidas por Papilomavirus Humano en mujeres mayores de 30 años con neoplasia intraepitelial cervical en Ciudad de la Habana, Cuba. Enero 2009-diciembre 2011.

- Tesis de maestría en Virología titulada: Implementación de métodos inmunoquímicos para la detección de Papilomavirus Humano tipo 16 en muestras cervicouterinas. Autora: Lic. Griselda Torres López. febrero 2010.
- Tesis de grado para optar por el título de especialista en primer grado en Dermatología titulada: Infecciones de transmisión sexual y lesiones precursoras del cáncer anal en hombres seropositivos al VIH. Abril-agosto de 2012. Autora: Dra. Yanara García Leyva. Noviembre 2013.
- Tesis de maestría titulada: Infección por Papilomavirus Humano y lesiones precursoras de cáncer anal en hombres seropositivos a VIH. Abril-agosto 2012. Autora: Lic. Celia María Limia León. Diciembre 2014.

Premios y reconocimientos

- Resultado relevante. Instituto de Medicina Tropical. 2014.
- Premio de la Academia de Ciencias de Cuba. Marzo 2015.
- Premio Anual de Salud. Octubre 2015.
- Premio Relevante del Fórum de Ciencia y Técnica a nivel provincial. Noviembre 2015.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

II MARCO TEÓRICO

II.1 Historia

La naturaleza infecciosa de las verrugas, una de las manifestaciones clínicas de la infección con Papilomavirus (PV), fue reconocida por los ancestros griegos y romanos. Sin embargo, hasta el siglo XIX se consideraron como formas de sífilis o gonorrea. La etiología de las verrugas humanas se confirmó a principios de 1900, cuando se demostró la transmisión de la enfermedad a partir de filtrados libres de células, obtenidos de lesiones (15). Como consecuencia, los PV se identificaron en varias especies de vertebrados, además de los humanos. Debido a que estos virus tienen un rango de hospederos muy específico para cada especie, no fue posible estudiar las características biológicas de los Papilomavirus humanos (PVH) en modelos animales (16).

El primer PV animal fue identificado en 1930 por Richard Shope, el cual caracterizó la naturaleza transmisible de los papilomas cutáneos presentes en el conejo de cola algodonosa. El PV identificado por Shope en este tipo de lesiones, ahora designado como el papiloma del conejo de cola algodonosa (CRPV, del inglés *cottontail rabbit papillomavirus*), fue el primer virus tumoral de ADN identificado (17).

La infección por PVH se identificó por primera vez, durante el proceso de necropsia, debido a la presencia de una verruga plantar descubierta en un cuerpo momificado en el siglo XII antes de Nuestra Era. Posteriormente, en el siglo XIV, se confirmó la asociación entre el origen viral de las verrugas genitales y la vía de transmisión sexual (18).

Debido a la incapacidad de los PV para propagarse en cultivos celulares, fueron estudiados con menor intensidad en las décadas de 1950 y 1960 (19). El clonaje y la secuenciación del genoma viral, surgidos en la década de 1970 a 1980, aumentaron notablemente la posibilidad de estudiar sus propiedades biológicas y bioquímicas. (20). En 1972 comenzaron a desarrollarse experimentos para establecer la asociación entre el CC y las infecciones por PVH. Esta teoría se apoyó en las observaciones de determinados casos donde las lesiones de condilomas acuminados evolucionaban a carcinomas de células escamosas, este fenómeno resaltó el potencial carcinogénico de los PVH (21). En 1975, se publicó por primera vez, por Harald zur Hausen, el posible papel causal de estos virus en la etiología del CC, dando un giro sustancial a las especulaciones en este campo de la investigación (22). Ocho años después se identificaron los tipos de PVH 16 y 18 en casos de CC (23).

En la segunda mitad de la década de 1980 se estudiaron con profundidad aspectos clínicos y experimentales sobre los PVH, después que se reconociera su importancia médica, empleando fundamentalmente ensayos de transformación *in vitro* que permitieron el análisis de las funciones involucradas en la proliferación celular (24). En esta misma década, el interés de los investigadores y especialistas se focalizó hacia todos aquellos tipos virales asociados a las lesiones genitales. Los PVH se consideran como los agentes virales que constituyen la mayor causa de los cánceres humanos de origen epitelial, encostrándose en casi 100% de los casos de CC y asociándose con otros cánceres anogenitales y orofaríngeos (25, 26).

II.2 Clasificación y taxonomía

Inicialmente los PV se clasificaron junto a los Poliomavirus en la familia *Papovaviridae*, debido a que comparten muchas de sus características. Sin embargo, la secuenciación del genoma de los PV, indicó que su organización genética difiere de la de los Poliomavirus y que su transcripción es unidireccional a diferencia de la transcripción bidireccional de los Poliomavirus. El establecimiento de estas diferencias y otras desde el punto de vista clínico, trajo como consecuencia que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus clasificara los PV en una familia independiente, la *Papillomaviridae* (27). Hasta la actualidad se han identificado más de 120 tipos de PVH, de los cuales más de 40 están asociados a las infecciones del tracto anogenital (28).

La secuenciación del genoma de estos virus ha permitido establecer su organización filogenética de acuerdo a la homología de la secuencia del marco abierto de lectura (MAL) L1, que codifica una de las proteínas estructurales y la más conservada. Se han descrito relaciones filogenéticas similares entre otras regiones del genoma (27). La clasificación actual se propone cubrir esta amplia gama estableciendo: género, especie, tipos o genotipos, subtipos y variantes. La categoría más abarcadora es el género. Los PV se dividen en 29 géneros, cada uno de los cuales está designado por una letra del alfabeto griego. Al ser el número de géneros superior al de letras, se utiliza el prefijo "dyo", que significa por segunda vez. De esta forma, después de Omega-PV se continúa con Dyodelta-PV. Con esta clasificación, los PVH se agrupan en 5 de los 29 géneros: Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu. El resto de los géneros están constituidos por PV animales (29).

Todos los miembros de un género determinado comparten más del 60% de homología en cuanto a la secuencia nucleotídica del gen L1. Una especie está constituida por aquellos PV que, dentro de un mismo género, comparten entre 60% y 70% de homología. Por otro lado, un genotipo dentro de una especie tiene de 71% a 89% de homología con otros genotipos. Dentro de los genotipos puede haber subtipos, los cuales comparten de 90% a 98% de homología y variantes, las cuales tienen más de 98% de homología entre ellas (28, 29). Mientras que existen relativamente pocos subtipos, hay muchas variantes que se han identificado, fundamentalmente para PVH 16, el genotipo estudiado con mayor intensidad debido a su importancia médica (30). También se

describen variantes para los genotipos de PVH 18, 31, 52 y 58 (31). Los PVH con mayor importancia médica son los pertenecientes al género Alfa. La mayoría de estos infectan principalmente mucosas y genitales externos. De estos, los genotipos asociados al CC y a otros tumores malignos, son denominados como genotipos de PVH de alto riesgo oncogénico (PVH-AR) y forman parte de las especies 5, 6, 7, 9 y 11 (25, 32). El PVH 16, genotipo encontrado con mayor frecuencia en el CC, es miembro de la especie 9, mientras que el PVH 18 que es el siguiente genotipo más comúnmente asociado al CC, está incluido en la especie 7. Por otro lado, el PVH 6 que causa la mayoría de las verrugas genitales, forma parte de la especie 10 y está incluido dentro de los genotipos de PVH de bajo riesgo oncogénico (PVH-BR) (33).

II.3 Estructura y replicación

II.3.1 Estructura viral

Los PVH son un grupo de partículas virales pequeñas, que presentan un genoma de ADN de doble cadena y pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Son virus desnudos y de talla pequeña, capaces de provocar lesiones epiteliales de origen maligno, aunque también constituyen la causa de un amplio espectro de lesiones proliferativas de naturaleza benigna. La cápsida viral presenta simetría icosaédrica, tiene un diámetro de 55 nm y está compuesta por 72 capsómeros, de los cuales 60 son hexonas y el resto pentonas. Está formada por dos proteínas estructurales; una de ellas denominada L1, se conoce como la proteína mayoritaria de la cápsida y la otra proteína estructural, L2, que se conoce como proteína minoritaria de la cápsida por representar un menor porcentaje dentro de la misma. Al ser virus desnudos, los PVH son relativamente resistentes al calor y a los solventes orgánicos, incluso muestran una resistencia y estabilidad mayor que otros virus desnudos (33).

II.3.2 Organización genómica y proteínas virales

La partícula viral de los PVH está formada por una sola molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 kb (Figura 1).

El contenido guanina-citosina de la mayoría de los PVH es de 42% y el ADN constituye aproximadamente un 12% del peso del virión. Todos los MAL están localizados en una de las dos cadenas del ADN viral y la otra cadena contiene pequeños MAL no conservados, por lo que se asume que es no codificante (34). Las cadenas codificantes presentan aproximadamente 10 MAL, que se denominan tempranos (E, del inglés *early*) o tardíos (L, del inglés *late*) en dependencia de su localización en el genoma, con respecto al origen de replicación (34) (Figura 1).

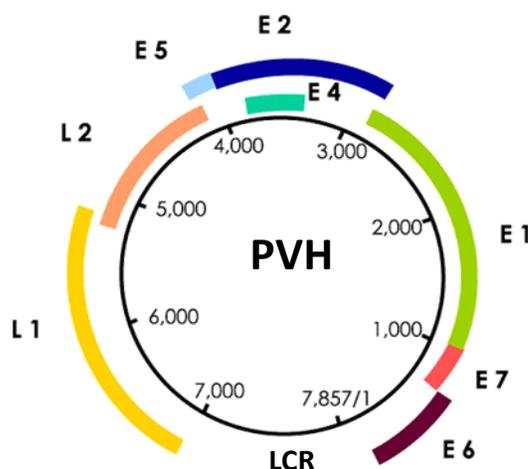


Figura 1. Representación esquemática del genoma de Papilomavirus humanos. **Fuente** (35).

La región E codifica las proteínas tempranas E6, E7, E1, E2, E4 y E5 (34). Estas proteínas están involucradas en la persistencia del genoma viral, en la replicación del ADN y en la activación del ciclo de división celular, además de estar asociadas a la transformación celular y a la regulación de los genes virales, fundamentalmente en el caso de los genotipos oncogénicos (36). Además, se identificaron en esta región otros dos MAL, E3 y E8, pero solo existen en algunos genotipos y no se conoce su función (34). La región L codifica las proteínas estructurales L1 y L2, que solo se expresan en células infectadas que se encuentran en la fase productiva de viriones (37). Entre las regiones E y L se encuentra una región de control (LCR, del inglés *long control region*), que no contiene secuencias codificadoras pero que posee promotores y amplificadores importantes en la regulación de la transcripción de los genes virales. Esta región constituye un 10% del genoma del virus (38).

La capacidad transformante de los PVH-AR se explica principalmente por la actividad de sus oncoproteínas E5, E6 y E7 (Tabla 1). Estas proteínas se unen a un gran número de reguladores celulares importantes en el control de procesos biológicos como: la apoptosis, la proliferación celular, la estabilidad cromosómica, la transcripción de genes (oncogenes y genes supresores de tumores), la diferenciación celular y la respuesta inmunológica (39, 40).

Tabla 1. Características generales de las oncoproteínas de Papilomavirus humano.

<i>Proteína</i>	<i>Masa molecular</i>	<i>Localización en la célula</i>	<i>Función</i>
E5	8-10 kDa, hidrofóbica	Citoplasmática	Oncoproteína. Interacción con el receptor de EGF. Proliferación celular y retraso de la diferenciación.
E6	16-18 kDa	Nuclear	Oncoproteína. Regulador negativo de la división celular, degradación de p53. Interacción con varias proteínas celulares.
E7	11 kDa	Nuclear	Oncoproteína. Regulador negativo del crecimiento celular, inactivación de pRb.

Fuente: (41). Abreviatura: EGF: factor de crecimiento epidérmico (del inglés *epidermal growth factor*)

II.3.3 Replicación viral y diferenciación del epitelio

El ciclo de replicación de los PVH está estrechamente vinculado a la diferenciación del epitelio que infecta. Este virus puede acceder a las células epiteliales basales en división, a través de abrasiones microscópicas y adherirse mediante moléculas presentes en la superficie celular tales como: la $\alpha 6$ -integrina, primer candidato reconocido como receptor de los PVH (42) y los proteoglicanos de heparán sulfato (42). La entrada del virus es a través de la endocitosis, tanto mediada por clatrina como por caveolas (43). Una vez dentro de la célula, se produce el desnudamiento y el genoma circular del virus se transporta al núcleo. Tras la división de la célula infectada, el genoma episomal que se encuentra en el núcleo se replica entre 20 y 100 copias y se mantiene en las células hijas. Esto ocurre a través de la fijación del genoma viral a los cromosomas celulares, mediante el factor de replicación/transcripción del virus, E2, siguiendo el mismo patrón establecido para el PVB 1 (44). Se plantea que durante la primera fase de la infección en las células de la monocapa basal, sólo se expresan las proteínas virales de la replicación E1 y E2, con el fin de establecer y mantener bajo número de copias de los genomas virales (45). Aunque las oncoproteínas E6 y E7 también se expresan al inicio de la infección, la línea temporal exacta de los primeros eventos en el ciclo de replicación del virus es difícil de evaluar. Esto es porque todavía es técnicamente muy difícil infectar células epiteliales y seguir el curso de la infección. La misma puede persistir en la célula madre infectada y sus células hijas en la capa basal del epitelio durante un largo período, hasta varios años. Este fenómeno se conoce como persistencia viral y se considera como el factor de riesgo principal para la progresión tumoral (46). Sin embargo, una infección normal requiere que a partir de la división de las células madres basales se formen células hijas con la capacidad de diferenciarse en las capas epiteliales superiores. Normalmente, en células no infectadas, después de la diferenciación, las células epiteliales dejan de dividirse y comienza la diferenciación terminal. Es importante destacar que, en las células epiteliales infectadas por PVH-AR, la acción concertada de las oncoproteínas E5, E6 y E7 y sus proteínas asociadas p53 y pRb, respectivamente, reactiva la división celular, inhibe la apoptosis y suprime la diferenciación epitelial (47). La reactivación de la división celular permite además la amplificación del genoma del virus, provocando la producción de miles de copias. Por último, luego de la diferenciación de la capa epitelial granular, las proteínas de la cápsida del virus, L1 y L2, se expresan y encapsidan los genomas virales recién sintetizados. La liberación de los nuevos viriones depende de la rotura mecánica de las células infectadas desprendidas de la última capa del epitelio (40, 48).

II.4 Historia natural de la infección anogenital por PVH

La infección del tracto anogenital por PVH puede ser asintomática o provocar una serie de manifestaciones que varían desde la presencia de condilomas benignos, hasta la ocurrencia de alteraciones neoplásicas de diferentes

grados y cáncer (33). Los exámenes citológicos e histológicos constituyen la base del análisis de estas lesiones pues ofrecen suficiente información para la evaluación clínica de los pacientes (49). La distinción de los diferentes estados patológicos tiene un alto valor pronóstico ya que mientras los condilomas casi siempre permanecen como lesiones benignas, las neoplasias intraepiteliales tienen una alta potencialidad de progresar al cáncer invasivo (50).

Aunque su prevalencia es elevada, tanto en hombres como en mujeres, la mayoría de las infecciones se eliminan de forma espontánea. En la literatura se describe que entre 80% y 90% de las infecciones cervicouterinas por PVH son transitorias y dejan de ser detectables entre uno y dos años (51). Sin embargo, es importante destacar que las infecciones por PVH-AR persisten en el epitelio infectado con mayor frecuencia que las infecciones por genotipos de PVH-BR (52).

La prevalencia de la infección varía con la edad de la población y depende de la sensibilidad de las metodologías utilizadas para detectar el ADN del virus en las muestras clínicas. El pico de prevalencia en las mujeres es entre los 15 y 25 años y disminuye con la edad, aunque se observa un segundo pico de infección en la etapa perimenopáusicas. La disminución de la frecuencia de infección con la edad probablemente se deba a la naturaleza autolimitada de la mayoría de las infecciones por PVH. La historia natural de las infecciones por PVH en los hombres ha sido menos estudiada (53). En la literatura se describe que la mayoría de las infecciones son también autolimitadas, pero a diferencia de lo que ocurre en las mujeres, la prevalencia de infección por PVH se mantiene constante o disminuye ligeramente con el incremento de la edad, lo cual sugiere infecciones con períodos de persistencia más prolongados o mayores frecuencias de reinfecciones (54).

La persistencia de la infección por PVH-AR durante largos períodos es un factor de riesgo fundamental para el desarrollo y la progresión de las lesiones neoplásicas y es reconocido como un paso importante en el proceso carcinogénico del CC (55). Se describe la existencia de tres eventos fundamentales durante la infección persistente con PVH-AR como promotores del CC: la integración del ADN viral al genoma de la célula hospedera, la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 (56) y finalmente las complejas interacciones entre E6/E7 y las proteínas celulares. Se conoce que en el evento de integración, los genomas virales se linealizan y se insertan en el genoma de la célula hospedera y los puntos de ruptura del genoma viral pueden estar localizados en cualquier parte de la región L2-L1 (5') y E1-E2-E5 (3'). Cuando ocurre la ruptura del genoma viral provocando una delección o inactivación de E1/E2, se suprime la represión de la expresión de E6 y E7 mediada por E2, lo que implica su sobre expresión. Otra consecuencia de la integración puede ser la inactivación de genes supresores de tumores o activación de proto-oncogenes como cMYC. Estos eventos están asociados con un pronóstico de progresión al cáncer cervicouterino y con una baja proporción de supervivencia a la

enfermedad (57). Las complejas interacciones que se establecen entre las oncoproteínas virales E6 y E7 y las proteínas celulares se basan fundamentalmente en su capacidad de degradar proteínas que actúan como represores tumorales. Tal es el caso de las proteínas p53 y pRb que actúan en la reparación del ADN durante la división celular o induciendo la apoptosis cuando la acumulación de mutaciones es irreparable. Además, E6 es capaz de activar la actividad telomerasa y degradar proteínas que controlan la adhesión celular, la polaridad de membrana y el control de la proliferación. Por su parte, E7 degrada la pRb impidiendo así su función apoptótica. Entre otros mecanismos moleculares, estas son las vías más estudiadas, por las cuales las oncoproteínas de los PVH-AR conducen las células epiteliales a la transformación celular y al cáncer (56, 57) Estos factores, sin embargo, se han estudiado menos en otros tipos de cánceres anogenitales en las mujeres (vulva, vagina y ano) y en los hombres (pene y ano).

La presencia de infecciones múltiples en la mucosa anogenital, tanto en los hombres como en las mujeres, es también un hallazgo muy común de los estudios epidemiológicos (58). Las consecuencias de las infecciones múltiples todavía son debatidas, debido a que a pesar de ser muy comunes en individuos con lesiones premalignas, el número de genotipos detectados disminuye a medida que se incrementa la severidad de las lesiones (59, 60). En la literatura también es ampliamente debatido el riesgo de las reinfecciones con el mismo genotipo (61). Hasta el momento se han planteado dos hipótesis para dar explicación a las reinfecciones. La primera, es basada en la suposición de que las infecciones adquiridas a temprana edad nunca son eliminadas completamente y que las reinfecciones que aparecen años después, son en realidad reactivaciones de la infección inicial. La segunda hipótesis es que la respuesta inmune generada por una infección inicial no sea capaz de proteger completamente frente a infecciones futuras con el mismo genotipo (62).

II.5 Historia natural de la infección anal por PVH en inmunocomprometidos

En la literatura se describe, de manera muy amplia, cuales son las etapas fundamentales de la historia natural de la infección por PVH en el cérvix, sin embargo se conoce muy poco sobre la infección anal por PVH, particularmente en individuos inmunocomprometidos. Esto se ha convertido, en las últimas décadas, en un tema de gran importancia ya que la incidencia de CA se ha incrementado considerablemente en este grupo de individuos (11, 12). Basado en la historia natural de la infección cervicouterina, se plantea que las etapas fundamentales en la patogénesis del CA pudieran involucrar: las infecciones persistentes con genotipos de alto riesgo oncogénico, los cambios celulares en el epitelio anal que den lugar al desarrollo de lesiones neoplásicas denominadas neoplasias intraepiteliales anales (NIA) de alto grado, seguido de la progresión al CA de células escamosas y al carcinoma anal invasor (63).

En inmunocomprometidos, particularmente en HSH seropositivos a VIH, la infección anal por PVH suele ser frecuente y no disminuye con el incremento de la edad (64). Se plantea que en este grupo de individuos es muy frecuente la presencia de infecciones múltiples (65-68), además de ser muy susceptibles a reinfecciones (69).

Una posible explicación para la elevada prevalencia de la infección anal por PVH y la falta de asociación con los grupos etarios, es que la infección por PVH en el ano sea más persistente que en el cérvix, y aún más en individuos inmunocomprometidos con conductas sexuales de riesgo (64, 70). Los estudios sobre la historia natural de la infección por PVH en el cérvix, no pueden ser simplemente extrapolados a la infección anal en inmunocomprometidos y sobre todo en HSH seropositivos a VIH, ya que la prevalencia de la infección por PVH y las conductas sexuales difieren significativamente a lo observado en las mujeres inmunocompetentes (71).

II.6 Epidemiología de las infecciones anogenitales por PVH

Los PV han coexistido con la especie humana a través de miles de años, sufriendo pocos cambios en su composición genómica (72). De los más de 40 genotipos de PVH que se asocian con las infecciones de la mucosa anogenital, 15 están involucrados, en diferente grado, con los procesos neoplásicos y son denominados como genotipos de alto riesgo oncogénico (29). Dentro de estos se encuentran los PVH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, y 82. Los PVH 26, 53, 66, 67 y 70, son clasificados como genotipos de probable alto riesgo oncogénico y los PVH 6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 62, 64, 69, 71, 72, 81, 83, 84 y 89 son de bajo riesgo oncogénico (25). El PVH 16 es el más frecuente de los virus oncogénicos y es responsable del 50% de los casos de CC, mientras que el PVH 18 está involucrado en un 14% de los mismos (73).

La infección anogenital por PVH es la ITS con mayor incidencia en el mundo, pues cerca del 90% de la población sexualmente activa está infectada por estos virus (74). La adquisición de la infección es muy común sobre todo en adolescentes y personas jóvenes, con el inicio de las relaciones sexuales (75, 76). En las mujeres menores de 25 años, la incidencia del CC invasivo es muy baja a escala global (1,7 por 100,000 por año). En estas mujeres, la infección por PVH-AR y las lesiones cervicales de bajo grado tienden a ser fenómenos transitorios (77). La edad media de las mujeres con lesiones de alto grado es aproximadamente de 30 años. A partir de esta edad, es más difícil que el sistema inmunológico elimine exitosamente la infección primaria por PVH-AR, por lo que tienen una mayor probabilidad de desarrollar infecciones persistentes con la consiguiente progresión a las lesiones precursoras y el CC invasivo. Sin embargo, en algunas áreas geográficas esta panorámica está cambiando, debido al inicio cada vez más temprano de las relaciones sexuales y del contagio por PVH-AR. Esto trae como consecuencia la aparición de lesiones precursoras y de CC antes de los 25 años (78).

La mayoría de las infecciones genitales por PVH se transmiten por vía sexual a través del contacto con las superficies mucosas y cutáneas de individuos previamente infectados por los distintos genotipos de PVH; mediante el acto sexual, con o sin penetración, incluyendo el contacto genital-genital, genital-oral, genital-manual y genital-anal (79). Esta ITS no está eficientemente controlada por la carencia de antivirales específicos y por el limitado acceso en el mundo, al programa de inmunización actual (1).

De acuerdo a un meta-análisis realizado en el 2010, que incluyó un millón de mujeres con citología normal procedentes de 59 países y 5 continentes (80), la prevalencia de la infección cervical se mantiene en un rango de 1,6% a 25%, con una prevalencia global estimada de 11,7%. África Sub-Sahariana (24%), el Este de Europa (21,4%) y Latinoamérica (16,1%). Estas regiones mostraron las mayores prevalencias de infección y los menores valores de prevalencia se encontraron en América del Norte (4,7%) y el Oeste Asiático (1,7%).

Por otro lado, se han realizado menos estudios sobre la prevalencia de la infección por PVH de la mucosa anal en mujeres. Se plantea que en mujeres sanas se observa una prevalencia de 42% (81) y que en contraste con las infecciones cervicouterinas, donde la frecuencia de infección disminuye con la edad, la prevalencia de las infecciones anales se mantiene similar en todos los grupos etarios (82). Además de las relaciones sexuales ano-receptivas, se han propuesto como otras vías de transmisión en mujeres, el contacto sexual sin penetración (involucrando los dedos y la boca de la pareja sexual) o la transmisión directa de la vagina al ano, debido a la proximidad de ambos sitios anatómicos (82).

Muchos estudios sobre la etiología del CC y el papel de los factores epidemiológicos y sociodemográficos en el desarrollo del mismo, describen como factores de riesgo: el número elevado de parejas sexuales, el bajo nivel de escolaridad, la carencia de pareja sexual estable, las malas condiciones socioeconómicas, el hábito de fumar, el uso de anticonceptivos orales, entre otros (74, 83, 84). Más allá de la interacción entre los factores epidemiológicos y sociodemográficos con la infección viral, existen otros elementos que pueden influir en la evolución de la enfermedad, tales como los factores virales y los factores genéticos e inmunológicos del hospedero, descritos en los acápites II.4 y II.8, respectivamente.

II.6.1 Infecciones anogenitales en hombres

La prevalencia de la infección por PVH en los hombres está menos definida. Se estima que, en dependencia del sitio anatómico, la prevalencia de la infección por PVH en la población masculina oscila entre 1% y 84%. En las poblaciones de riesgo, como es el caso de los hombres con otras ITS, seropositivos a VIH y que son pareja de mujeres infectadas por PVH, la prevalencia es superior y se encuentra entre 2% y 93% (85).

La infección anal por PVH en los hombres es más frecuente en los HSH (86), particularmente en aquellos individuos seropositivos a VIH (87), sin embargo se describe que la infección por este virus puede ser

comúnmente encontrada en la mucosa anal de hombres que tienen sexo con mujeres (HSM) (88). En estos casos, se plantea que la prevalencia de la infección se encuentra en el rango de un 0% a 32,8% (89) y se definen otras vías de transmisión sexual que no involucran el sexo ano-receptivo (90).

II.6.1.1 Infección anal en hombres seropositivos a VIH

En la literatura se describe que las infecciones anales por PVH en los HSH seropositivos a VIH son muy frecuentes. Se plantea que mediante tecnologías como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) el rango de prevalencia de infecciones con genotipos no carcinogénicos se encuentra entre 85% y 95%, superior a lo descrito en individuos seronegativos a VIH (26% a 87%) (91). Las infecciones múltiples son también muy comunes, detectándose en varios estudios más de un genotipo de PVH, con frecuencias desde 23% hasta 60% en los hombres seronegativos a VIH y desde 54% hasta 95%, en hombres seropositivos a VIH (91).

Algunos estudios sobre la etiología del CA demuestran el papel de los factores de riesgo para contraer la infección por PVH o padecer alguna de las enfermedades asociadas a la infección viral. Estos factores de riesgo están relacionados con determinadas conductas sexuales de riesgo tales como: el número elevado de parejas sexuales anales, el sexo ano-receptivo, el sexo desprotegido, el sexo oral, los antecedentes de condilomas y la presencia de otras ITS (91, 92). Además de estos factores, el estado inmunológico se ha asociado a un mayor riesgo para contraer infección por PVH y padecer alguna de las enfermedades asociadas a la infección por estos virus, particularmente el bajo conteo de linfocitos T CD4+ es uno de los factores de riesgo identificado con mayor frecuencia (13, 93).

II.6.2 Infección anogenital por PVH en Cuba

En Cuba no existen, hasta el momento, estudios de línea de base que brinden información epidemiológica suficiente sobre los genotipos de PVH que circulan en diferentes grupos de la población. Se han publicado algunos datos sobre la infección por PVH en mujeres cubanas con CC (14), los cuales han permitido conocer la frecuencia de infección por PVH en estas pacientes. Se estudiaron 45 casos y se detectó infección en un 91,1%. El genotipo más prevalente fue el PVH 16 seguido de los tipos 18, 45, 31, 39, 51, 56 y 59. Sin embargo, estos datos son insuficientes y las variables asociadas a la infección y al desarrollo de las lesiones cervicouterinas, aún no se conocen en la totalidad de la población femenina cubana.

Por otra parte, en Cuba no existen suficientes investigaciones sobre la infección por PVH en la mucosa anal en poblaciones con conductas sexuales de riesgo, como es el caso de los individuos seropositivos a VIH. Solo existen datos publicados acerca de la presencia de infección por PVH en lesiones condilomatosas localizadas en diferentes zonas de la región anogenital de un grupo de individuos seropositivos a VIH (94). Este estudio mostró una prevalencia elevada de infección en las muestras de condilomas, con los genotipos de PVH 6 y 11

(63,3% y 53,3%, respectivamente). Se demostró, además, la presencia de PVH de alto riesgo oncogénico en lesiones condilomatosas, detectándose en 63,3% de las muestras analizadas.

II.7 Manifestaciones clínicas

II.7.1 Lesiones benignas en la mucosa anogenital

Verrugas genitales o condilomas: Los condilomas en su forma clásica son floridos y exofíticos (condiloma acuminado), aunque también pueden ser en forma de espícula, pápula, planos, pigmentados, invertidos y otras formas micropapilares (33). Aparecen generalmente en adultos jóvenes y en individuos con marcada promiscuidad sexual (95). Estas lesiones en los hombres, se localizan en el pene, alrededor del ano, en el periné y menos frecuentemente en el escroto. En las mujeres, se localizan en el introito vaginal, la vulva, el ano, el periné y raras veces en el cérvix (33). Muchas de las lesiones condilomatosas se eliminan espontáneamente o como respuesta a un tratamiento, sin embargo en poblaciones con estados de inmunosupresión estas lesiones pueden provocar serios problemas de salud (96). Los genotipos de PVH que se asocian con más frecuencia a estas lesiones son los PVH 6 y 11, aunque en algunos estudios se ha detectado la presencia de genotipos de alto riesgo oncogénico, fundamentalmente el PVH 16 (97, 98).

Papulosis Bowenoide: La Papulosis Bowenoide es una enfermedad relacionada con las verrugas genitales. Las lesiones consisten generalmente en pequeñas pápulas que son similares histológicamente a las lesiones provocadas por la enfermedad de Bowen. En la mayoría de estas lesiones se detecta el PVH 16, aunque también se han encontrado asociados otros genotipos como los PVH 18, 32, 33, 31, 34, 39, 42 y 45 (99).

II.7.2 Lesiones malignas en la mucosa anogenital

Lesiones malignas en la vulva, la vagina y el pene: Los PVH pueden infectar otras regiones genitales que están constituidas por un epitelio estratificado. La presencia de PVH, generalmente del genotipo 16, se ha detectado con frecuencia en cánceres de vulva, de vagina y de pene (100-102). Otra de las manifestaciones en estas regiones es el condiloma acuminado gigante, también denominado como el tumor de Buschke-Lowenstein. Esta lesión es un carcinoma de células escamosas (CCE) de bajo grado y localmente invasivo que involucra los genitales externos, con mayor frecuencia el pene, y se encuentra asociado a los PVH- BR, tales como el PVH 6 y 11 (33).

Cáncer cervicouterino: Los CCE representan un 85% de los CC y los Adenocarcinomas que surgen en el epitelio glandular, son los tumores menos frecuentes. La mayoría de los CC se localizan en la zona de transformación, la cual se ubica en el extremo inferior del cuello uterino, donde las células columnares del endocérvix se unen al epitelio escamoso estratificado de la vagina (103). El CC invasivo está precedido por una serie de anomalías progresivas en el epitelio cervical, las cuales de acuerdo al análisis citológico empleando

el Sistema de Clasificación de Bethesda 2001, se dividen en: insatisfactoria, negativa para lesión intraepitelial o malignidad; lesiones intraepiteliales escamosas (LIE), que se separan en LIE de bajo grado y LIE de alto grado; células atípicas de significado indeterminado, que se separan en: atipia de significado indeterminado (Atípicas) y atipia de significado indeterminado con sospecha de alto grado (Atípicas de alto grado) (104). Existe otra clasificación anterior conocida como Sistema de Richart (105) y que todavía es utilizada para la clasificación histológica de las lesiones, en la que se establecen las siguientes categorías: no útil, negativa para células malignas, infección por PVH, neoplasia intraepitelial cervical de grado I (NIC I), neoplasia intraepitelial cervical de grado II (NIC II), neoplasia intraepitelial cervical de grado III (NIC III), Carcinoma in situ, Carcinoma invasor, célula neoplásica de otro origen e infecciones por gérmenes específicos u otras observaciones. En este caso la clasificación de NIC I incluye los casos con displasia leve, la NIC II incluye casos con displasia moderada y la NIC III incluye aquellos casos con displasia severa o Carcinoma in situ (46). Debido a esto, como parte de los programas de prevención del CC, se realiza la prueba citológica o Prueba de Papanicolaou a todas las mujeres sexualmente activas (106). La edad a la que se inician estos programas de pesquisa en la población femenina puede depender de las particularidades de cada país, pero generalmente comienzan a partir de los 20 o 25 años (107, 108). La presencia de PVH en el CC se ha comprobado en casi un 100% de los casos y aproximadamente la mitad de ellos están asociados a PVH 16, mientras que entre 4% y 24%, están asociados a PVH 18. Otros genotipos de alto riesgo oncogénico detectados con frecuencia en el CC son los PVH 31, 33, 45 y 58 (33).

Cáncer anal: El CA es una enfermedad poco frecuente, que representa de 1% a 2% de los tumores malignos del sistema digestivo, sin embargo su incidencia es elevada en determinados grupos de riesgo (103). Estos tumores se dividen en categorías, de acuerdo a su clasificación histológica, y los más frecuentes son: el CCE, el carcinoma basaloide o cloacogénico y los adenocarcinomas. Generalmente, el tipo de carcinoma anal asociado a PVH con mayor frecuencia es el CCE (109). En estudios epidemiológicos se demuestra que más del 90% de los casos son asociados a la presencia de infecciones por PVH-AR, con predominio de los genotipos de PVH 16 y 18. La mayoría de estos tumores surgen en la zona de transición entre el epitelio escamoso y el columnar, similar a lo que ocurre en el CC (110). La inmunosupresión y las conductas sexuales que incrementan la probabilidad de adquirir infecciones por PVH, son los factores de riesgo fundamentales para el desarrollo de los cánceres anales asociados a PVH. Debido a esto, la infección con VIH y las relaciones ano-receptivas son factores estrechamente asociados al CCE del ano y los HSH seropositivos a VIH constituyen la población de riesgo fundamental (111, 112).

El examen citológico de las células de la mucosa anal puede detectar las células neoplásicas, de manera similar a lo que ocurre con la prueba de Papanicolaou en el cuello uterino. Los estadios neoplásicos en el ano, determinados mediante análisis citológico, se ajustan a la nomenclatura del Sistema de Bethesda 2001 (104) y se clasifican en: negativa para lesión intraepitelial o malignidad, lesiones intraepiteliales anales (LIEA) de bajo grado, LIEA de alto grado; células atípicas de significado indeterminado, que se dividen en atipia de significado indeterminado (Atípicas) y atipia de significado indeterminado que no excluye una lesión de alto grado (Atípicas de alto grado) y CCE (113, 114). La anoscopía de alta resolución (AAR) es un procedimiento que utiliza un instrumento que magnifica la imagen con una alta calidad, se puede visualizar la zona de transición y permite la toma de muestras mediante biopsias. Este proceder facilita el acceso a las áreas de la mucosa del canal anal que sean sospechosas de lesiones precursoras del CA y cualquier otro tipo de lesión (115). Los cambios neoplásicos que se detectan mediante el examen histológico del tejido obtenido a partir de la biopsia se clasifican como: NIA I, NIA II y NIA III. Las NIA I son análogas a las LIEA de bajo grado, clasificadas mediante citología, y las NIA II y III son las equivalentes a las LIEA de alto grado. Las LIEA de alto grado o las NIA II y III, son consideradas como lesiones precursoras del CCE del ano (114, 116).

II.7.3 Manifestaciones clínicas en otras localizaciones anatómicas

Las infecciones por PVH se clasifican no solo con respecto a la onogenicidad de los genotipos infectantes sino también a la localización de la infección según el tipo de epitelio. Los genotipos que infectan la piel se denominan cutáneos y los que infectan las mucosas o epitelios menos queratinizados se denominan genotipos mucosos. Esta clasificación también se conoce como dependiente del tropismo viral (103). Las principales manifestaciones clínicas, excluyendo aquellas localizadas en las zonas genitales, causadas por los genotipos de PVH mucosos son: la papilomatosis laríngea, las verrugas de la cavidad oral, la hiperplasia epitelial focal, cerca del 20% de los tumores orales y entre 60% y 80% de los tumores orofaríngeos. Las lesiones causadas por los PVH cutáneos en diferentes localizaciones del cuerpo son: las verrugas cutáneas, la epidermodisplasia verruciforme y los cánceres de piel no melanomas (103).

II.8 Inmunidad

El ciclo de vida del virus, que se produce durante la diferenciación de los queratinocitos y concluye con la liberación de los viriones a través de las células descamadas, tiende a minimizar la exposición de los antígenos virales al sistema inmune. La respuesta inmune de las células T parece ser más importante para la regresión de la infección, mientras que la inmunidad humoral probablemente ayuda a prevenir la propagación del virus a nuevos sitios dentro del hospedero y reducir la probabilidad de reinfección. La regresión de la infección y la resistencia a la reinfección parecen ser fenómenos específicos para cada genotipo viral, de acuerdo a la

presencia de sitios específicos de reconocimiento para células T y células B en las proteínas de los PVH. La estabilidad antigénica aparente dentro de un genotipo de PVH indica que cada tipo viral se somete a una presión de selección inmune relativamente baja (33, 61).

Cuando un individuo infectado con PVH 6 u otro genotipo causante de verrugas anogenitales muestra lesiones múltiples en una localización anatómica, no es raro que la eliminación de una sola verruga conduzca a la regresión de las demás. Este fenómeno sugiere una respuesta inmunológica provocada por la liberación del antígeno a partir de la verruga tratada. Los pacientes con condiciones que afectan a la inmunidad de células T, como el embarazo, la quimioterapia inmunosupresora, o infección por VIH, tienen un mayor riesgo de infección persistente por PVH, así como un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino. Probablemente, algunas de las infecciones en estos individuos son realmente reactivaciones de la infección latente, en lugar de ser reinfecciones por exposición exógena, incluso las infecciones por PVH de bajo riesgo. Los pacientes inmunosuprimidos son notoriamente difíciles de tratar y la reducción de la supresión inmune puede estar asociada con la mejora espontánea de las lesiones inducidas por PVH (33, 61).

Aunque estas observaciones indican que el sistema inmune, especialmente las células T, puede influir en el curso y resultado de la infección por PVH, la inmunidad protectora no se puede analizar de manera individual pues existen determinantes virales que inducen las respuestas inmunes responsables de la regresión o mecanismos de evasión. Varios antígenos virales pueden poseer esta capacidad, dada la heterogeneidad genética de las respuestas inmunes humanas y que la infección por PVH es autolimitada en la mayoría de los individuos inmunocompetentes. Los estudios en modelos animales aportan evidencias experimentales de que la respuesta inmune celular a E1, E2, E6, E7 y L2 puede contribuir a la regresión de las lesiones. Las lesiones que se eliminan también contienen gran cantidad de células CD4 + y células CD8 + (33). En las mujeres, la respuesta potente de células T citotóxicas y T auxiliaoras contra las proteínas E2, E6, E7 de PVH 16 ocurre con más frecuencia en las pacientes con antecedentes de lesiones que han curado clínicamente, con respecto a aquellas con lesiones persistentes (33, 61).

Los mecanismos de evasión del sistema inmune se manifiestan en individuos infectados de manera persistente con PVH-AR donde se afecta la activación de la respuesta de interferón, pues se produce la inactivación de proteínas reguladoras de la ruta de los interferones. También disminuye la expresión de genes inducibles por el interferón, disminuye la expresión de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- β) y aumenta la expresión de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10). La maduración de los antígenos MHC dependientes de las oncoproteínas virales de PVH-AR también se puede ver afectada lo que puede contribuir a la evasión inmune (55).

Como se comentará en el acápite dedicado a la prevención, los altos niveles de anticuerpos séricos neutralizantes inducidos por la vacunación pueden prevenir la infección por PVH. Sin embargo, en condiciones naturales, la prevención contra la reinfección depende de la inmunidad celular, tanto de células B como de células T. Los niveles de anticuerpos contra L1 pueden correlacionarse más con la duración de la infección que con la regresión, pues algunas mujeres con lesiones que se eliminan espontáneamente no tienen anticuerpos detectables contra L1 (33).

Existen evidencias que indican que los polimorfismos antigénicos de MHC clase I y II y de otras proteínas asociadas a la presentación antigénica como Tap1, Tap2 y KIR pueden predisponer a las personas a favor o en contra del desarrollo de displasia cervical y cáncer de cuello uterino. Los casos con variantes alélicas específicas tienen una mayor probabilidad de desarrollar infecciones persistentes. La integridad de los alelos de MHC clase II juega un papel importante en la respuesta inmune a la infección por PVH. Las evidencias obtenidas en modelos animales demuestran que, tanto la susceptibilidad y la resistencia a la infección persistente y a la progresión a carcinoma se relacionan con los alelos de clase II (55).

Los pacientes que desarrollan tumores asociados a PVH tienen un mayor riesgo de desarrollar un segundo tumor por esta misma causa. En los receptores de trasplante renal, esta asociación es casi segura y depende de su inmunosupresión. Por extensión, es posible que los individuos inmunocompetentes que desarrollan más de un tumor asociado a PVH, puedan tener una respuesta inmune alterada frente a la infección por el virus. El componente genético es esencial y puede influir hasta en un 27% de los casos (117).

II.9 Diagnóstico de las infecciones por PVH

Las infecciones por PVH generan una respuesta inmune humoral frente a la proteína mayoritaria de la cápsida L1 y aunque los niveles de anticuerpos son de bajos a moderados, estos se mantienen detectables por varios años. Debido a esto, las infecciones pasadas no se pueden diferenciar de las infección presentes mediante un ensayo serológico, además de la reactividad cruzada que presentan los genotipos genéticamente relacionados. A este aspecto se le añade que estos virus no se propagan en cultivos celulares convencionales. Por consiguiente, las metodologías adecuadas para el diagnóstico de las infecciones por PVH son las técnicas de biología molecular que permiten la detección de los ácidos nucleicos virales (118).

II.9.1 Métodos de hibridación de ácidos nucleicos

La hidridizacion de ácidos nucleicos, en sus múltiples variantes (hibridación Southern Blot, hibridación *in situ* e hibridación Dot Blot), fue utilizada inicialmente para la detección del genoma de PVH en muestras clínicas de tejidos o células infectadas. Estas técnicas generan resultados confiables, son sensibles, bastante específicas y reproducibles, pero incluyen un cúmulo de ensayos que consumen bastante tiempo y trabajo por lo que se han

ido sustituyendo por técnicas menos laboriosas. La desventaja fundamental de estas técnicas es que cuando no se combinan con pasos previos de amplificación del ADN viral conllevan a una baja sensibilidad, al uso de elevadas concentraciones de ácidos nucleicos purificados y a procedimientos aún más laboriosos y demorados (119).

II.9.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Mediante la RCP puede detectarse un solo genotipo de PVH utilizando cebadores que se unan a secuencias específicas del mismo, o pueden detectarse varios tipos simultáneamente, ya sea utilizando una mezcla de cebadores específicos o empleando cebadores degenerados o consenso. Los cebadores consenso se seleccionan teniendo en cuenta la existencia de secuencias conservadas entre varios tipos de PVH (118). Los protocolos de RCP que se utilizan para la detección de PVH generalmente emplean cebadores degenerados o consenso tales como: MY09/11, PGMY09/11, GP5+/GP6+ y SPF (120), los cuales permiten la amplificación de un gran número de genotipos en una misma reacción de amplificación. Estos cebadores amplifican regiones conservadas del genoma de PVH dentro del gen L1 (121). Luego de la amplificación, los genotipos pueden identificarse mediante secuenciación nucleotídica, análisis con enzimas de restricción, hibridación con sondas específicas o por una RCP adicional con cebadores específicos (118).

II.9.3 RCP en Tiempo Real (RCP-TR)

La RCP-TR es una técnica con elevada reproducibilidad, sensibilidad y especificidad, que es utilizada con frecuencia en la detección e identificación de genotipos de PVH. Las ventajas de esta técnica en el diagnóstico de las infecciones por estos agentes son: la capacidad para determinar el valor de la carga viral, la detección de múltiples genotipos en una misma reacción (debido al uso de diferentes fluorocromos que emiten fluorescencia durante la amplificación), la detección de ácidos nucleicos en pequeñas concentraciones, reproducibilidad, rapidez y su aplicabilidad a muestras clínicas (122). Para la detección de los genotipos se utilizan cebadores específicos que amplifican segmentos de interés para cada tipo de PVH (123). La RCP-TR permite determinar además, la presencia de ARNm de las oncoproteínas virales E6 y E7 (11, 19, 62) y la detección del genoma viral integrado (124).

II.9.4 Métodos comerciales para la detección de ácidos nucleicos de PVH

Debido a la importancia de la detección de PVH-AR en la prevención y el seguimiento de las lesiones precursoras de cáncer, se han desarrollado métodos comerciales que permiten la detección y tipificación de los PVH más relevantes desde el punto de vista clínico. Entre ellos se encuentran: *Amplicor HPV test* (Roche Diagnostics, Suiza), *Linear array HPV Genotyping test* (Roche Diagnostics, Suiza), *Innolipa HPV Genotyping Extra* (Innogenetics, Bélgica), *Biopat kit* (Biotools, España) y *Clart Clinical Array Papillomavirus 2*

(Genómica, España). Además de la amplificación del genoma, se han aprobado otros protocolos que se basan en la hibridación directa del ácido nucleico viral sin previa amplificación como es el caso del estuche *Hybrid Capture 2 HPV DNA Test* (QIAGEN, Gaithersburg, Alemania) (118, 125).

II.10 Prevención y control

II.10.1 Prevención de la transmisión sexual

La prevención primaria de las enfermedades provocadas por los PVH involucra la educación a la población sobre las prácticas sexuales seguras. Los programas de educación sexual elaborados por los Ministerios de Salud podrían prevenir la transmisión de las infecciones por PVH y disminuir el riesgo de desarrollar lesiones asociadas a esta infección. El conocimiento de los principales factores de riesgo para la infección y el desarrollo de las lesiones es un aspecto importante en la estrategia de prevención. La abstinencia sexual o el sexo protegido mediante el uso del condón, son las conductas más seguras para prevenir las infecciones anogenitales por PVH. También se puede disminuir el riesgo manteniendo relaciones monógamas, limitando el número de parejas sexuales y evitando el comienzo de las relaciones sexuales a edades tempranas (126).

II.10.2 Vacunación como método de prevención del CC

Desde el año 2006 se aprobaron, por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) dos exitosas vacunas profilácticas contra PVH, una vacuna tetravalente y la otra bivalente. Las dos fueron diseñadas para la prevención, en mujeres, de los cánceres de cuello uterino, vulva y vagina, asociados a los genotipos de alto riesgo oncogénico más frecuentes (PVH 16 y 18). Aunque en los ensayos clínicos de estas vacunas no se evaluó su impacto en la prevención del CA, teóricamente, debido a su fisiopatología, un porcentaje importante de los CCE de ano pudiera ser prevenible con la vacunación contra PVH empleando dichas vacunas (127). De hecho, se han obtenido resultados post vacunación que demuestran la reducción de las lesiones anales premalignas (NIA II/III) asociadas a las infecciones por PVH 16 y 18 (127). En el caso de la vacuna tetravalente su diseño, además de los genotipos 16 y 18 también incluye los tipos de PVH 6 y 11 para la prevención de las verrugas genitales causadas por estos genotipos virales, que son los más comunes en dichas lesiones (128).

Ambas vacunas, por ser profilácticas, se incluyen en los programas de inmunización preferentemente a edades tempranas, antes del comienzo de las relaciones sexuales (129). La vacuna tetravalente Gardasil[®] (producida por Merck y Co, Inc., Whitehouse Station, New Jersey, EEUU) se utiliza en mujeres que se encuentran entre los 9 y los 26 años (130). La vacuna bivalente Cervarix[®] (producida por GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica) está aprobada para su uso en mujeres entre 9 y 25 años (131). Ambas están compuestas por la proteína L1 de los PVH, que es un antígeno potente cuando se inocula por vía parenteral o intradérmica y genera una respuesta

duradera con títulos elevados de anticuerpos neutralizantes. La expresión de L1 mediante la tecnología de ADN recombinante produce partículas tipo virus (VLP, del inglés *Virus Like Particles*).

La vacuna tetravalente Gardasil[®] está compuesta por VLP formados por L1 de los genotipos 6, 11, 16 y 18. Las proteínas son expresadas en *Saccharomyces cerevisiae* y se autoensamblan como VLP no infecciosas con su conformación intacta.

La vacuna bivalente Cervarix[®] contiene VLP formados por L1 de los genotipos 16 y 18. En este caso las proteínas son expresadas en células de insecto (*Trichoplusia ni* Hi-5) utilizando un Baculovirus como vector de expresión y también se autoensamblan en VLP no infecciosas con su conformación intacta (132).

En varios ensayos clínicos se demostró que a pesar de las diferencias en las formulaciones, ambas vacunas son muy inmunogénicas, bien toleradas, seguras y altamente efectivas en la profilaxis de las infecciones por los genotipos incluidos en dichas formulaciones y en la prevención de aproximadamente un 70% de los casos de CC (133, 134).

En diciembre de 2014 se aprobó por la FDA, la nueva vacuna profiláctica Gardasil^{®9}, diseñada para prevenir la infección con 9 genotipos de PVH (135). Dicha vacuna incluye VLP, obtenidas también por vía recombinante, contra los cuatro genotipos que incluye la vacuna tetravalente Gardasil[®], además VLP de otros cinco genotipos de alto riesgo oncogénico (PVH 31, 33, 45, 52 y 58). Gardasil^{®9} está indicada para administrarse a mujeres que no han iniciado las relaciones sexuales, con edades comprendidas entre los 9 y los 26 años de edad. Su aplicación previene las siguientes enfermedades: cáncer cervicouterino, de vulva, de vagina y cáncer anal causados por los tipos de PVH 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58; además, las verrugas genitales o condilomas causados por los genotipos de PVH 6 y 11. Previene también las lesiones premalignas o displásicas en las mismas localizaciones, causadas por los 9 genotipos antes mencionados. Está indicada y aprobada para su uso en jóvenes masculinos, entre los 9 y los 15 años de edad para la prevención del cáncer anal y las lesiones precursoras causadas por los genotipos incluidos en la formulación vacunal. El uso de Gardasil^{®9} puede prevenir entre 70% y 90% de los cánceres anogenitales y el mismo porcentaje de las infecciones por PVH. Aunque su aprobación es muy reciente ya se comienza a extender su aplicación (136, 137).

II.10.3 Pesquisa del cáncer cervicouterino

El objetivo fundamental de la pesquisa de CC es la detección temprana de las lesiones de alto grado, precursoras del cáncer de cuello uterino. La detección temprana de estas lesiones no previene la infección por PVH, pero puede prevenir la mayoría de los casos de CC y muertes, si las mujeres con resultados citológicos anormales reciben tratamiento y seguimiento adecuados (126). Los métodos utilizados en la pesquisa se apoyan en el examen citológico, colposcópico e histológico. El diagnóstico citológico se realiza por la técnica descrita por

Papanicolaou y empleando el Sistema de Clasificación de Bethesda 2001 (104), descrito en el acápite II. 7. 2. El análisis colposcópico utiliza la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), propuesta en Sídney, Australia en 1996, como se señala en el Programa Nacional para el Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello del Útero en Cuba (8), publicado en el año 2001.

El examen histológico se realiza empleando el sistema de clasificación establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1984 (8). Este examen, para las muestras de tejido obtenidas mediante biopsia, confirma el diagnóstico cito-colposcópico, establece el tipo de tumor y determina si es *in situ*, micro infiltrante o invasor, lo que permite definir la conducta terapéutica a seguir. Para tomar las muestras mediante biopsias dirigidas y realizar el diagnóstico histológico confirmatorio de las lesiones, se utiliza el videocolposcopio, que permite una visión estereoscópica de la zona epitelial en estudio, diferenciando las lesiones del resto del epitelio mediante una solución de ácido acético al 5% (138).

II.10.4 Pesquisa del cáncer anal

Debido a que las NIA de grado II y III son los precursores del CA, al paralelismo biológico entre las NIC y las NIA y a la elevada incidencia de CA, en determinados grupos de riesgo, varios grupos de investigación proponen que se establezca un programa de pesquisa de CA, similar al establecido para el CC (139, 140). Teniendo en cuenta la importancia de la citología en la pesquisa del CC, se sugiere que se establezca la citología anal como parte de la pesquisa del CA en pacientes de alto riesgo (141). Se plantea que aquellos casos con citología positiva (atípica o más) deben ser remitidos a una consulta especializada para la realización de una anoscopía de alta resolución (AAR) con toma de muestras por biopsia (113). Esta técnica es análoga a la colposcopia y es utilizada porque la severidad de las NIA solamente puede confirmarse a partir del análisis histológico de las biopsias, ya que se plantea que la citología anal subestima el grado de severidad de las lesiones (142). La efectividad de la pesquisa mediante citología anal, como primer eslabón del programa de detección precoz del CA, se ha evaluado a través de varias investigaciones mediante la comparación de los resultados de las citologías con los resultados histológicos de biopsias tomadas durante la AAR. Se determinó que esta técnica tiene una sensibilidad entre 69% y 93%, con una especificidad entre 32% y 59% (143).

II.11 Opciones terapéuticas en la actualidad

No hay una terapia antiviral específica, por lo que, la mayoría de los tratamientos son esencialmente ablativos, por exégesis y/o citodestructivos, o están dirigidos al estímulo del sistema inmune (144). Estas terapias pueden dividirse en métodos quirúrgicos, químicos e inmunomoduladores. Entre las terapias quirúrgicas se incluyen la crioterapia, exégesis o vaporización con láser y la radiocirugía (145). La escisión quirúrgica ofrece como ventaja la eliminación

rápida de las lesiones entre 80% y 90% de los casos. Sin embargo, las recurrencias son de un 25% a 39%, aproximadamente (146).

Los métodos químicos se basan fundamentalmente en el efecto citotóxico, mediante mecanismos quimodestructivos y anti-proliferativos (147, 148). Entre estos agentes, los más empleados son la Podofilina, el Ácido Tricloro Acético y el 5-Flúor-uracilo (149).

Los inmunomoduladores basan su efecto contra la infección viral en la modulación de la respuesta inmune innata, estimulando la secreción de interferones de tipo I y otras citoquinas proinflamatorias, por las células dendríticas, los macrófagos y los queratinocitos. Entre los inmunomoduladores más utilizados está el Imiquimod y los interferones obtenidos por vía recombinante (150, 151). Recientemente se ha comenzado a utilizar el Cidofovir, un antiviral análogo de nucleótido que inhibe la replicación viral (152).

CAPÍTULO III
DISEÑO METODOLÓGICO

III DISEÑO METODOLÓGICO

III.1 Diseño general de la investigación y presentación de los estudios

Se presenta una investigación en servicios y sistemas de salud. Se integran tres estudios de corte transversal conducidos en La Habana, en poblaciones con riesgo de padecer infección o enfermedad asociada a Papilomavirus humanos, durante el período 2007-2012. Se investigó la frecuencia de circulación de diferentes genotipos de Papilomavirus humanos y aspectos de la epidemiología molecular de las infecciones producidas por estos virus como agentes causales de lesiones intraepiteliales cervicales, cáncer cervicouterino y lesiones intraepiteliales anales.

1. Estudio observacional de corte transversal conducido en población femenina entre 15 y 59 años de 4 municipios de La Habana para identificar la frecuencia de infección cervical por Papilomavirus humanos, los genotipos circulantes, la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales así como las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas asociadas. Enero 2007-diciembre 2009. (corresponde al objetivo 1).
2. Estudio analítico de corte transversal con caso-control anidado conducido en mujeres mayores de 30 años con citología positiva atendidas en las consultas de Patología de Cuello Uterino de dos hospitales ginecobstétricos de La Habana, para determinar la frecuencia, los genotipos de PVH, el valor de la carga viral y los factores de riesgo asociados a la infección viral y a las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, bajo grado y cáncer cervicouterino. Enero 2009-diciembre 2011. (corresponde al objetivo 2)
3. Estudio observacional de corte transversal conducido en hombres cubanos seropositivos a VIH atendidos por presentar otras infecciones de transmisión sexual que se analizan para identificar la frecuencia de infección en la mucosa anal, los genotipos de PVH, el valor de la carga viral en las lesiones precursoras del cáncer anal y su posible asociación con variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas. Abril-agosto 2012. (corresponde al objetivo 3).

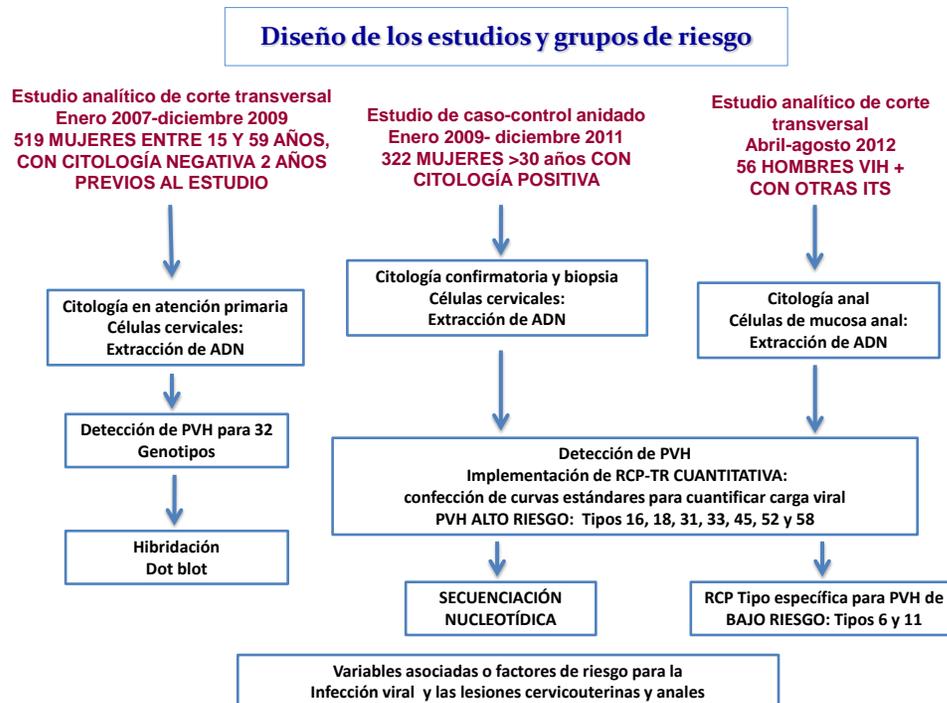


Figura 2. Diagrama de flujo de trabajo en la investigación. Diseño de los estudios y grupos de riesgo analizados.

III.2. Frecuencia de infección cervical por Papilomavirus humanos, genotipos circulantes y su relación con las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en mujeres sexualmente activas, entre 15 y 59 años, residente en 4 municipios de La Habana

III.2.1 Diseño del estudio, horizonte temporal, universo y muestra

Se realizó un estudio observacional de corte transversal conducido en población femenina de 4 municipios de La Habana, durante el período de enero de 2007 a diciembre de 2009 para identificar la frecuencia de infección cervical por PVH, la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales así como las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas asociadas.

El universo estuvo constituido por todas las mujeres sexualmente activas entre 15 y 59 años que acudieron a consultorios del médico de la familia para la realización de la citología cervical de rutina o prueba de Papanicolaou (153), o por otras causas; en el caso de las menores de 25 años. Los consultorios se seleccionaron en La Lisa, Marianao, Playa y Plaza. La selección de los mismos se realizó teniendo en cuenta que presentaban la mayor densidad de población femenina entre 15 y 59 años residente en La Habana, durante el período de estudio (154). Se establecieron como criterios de inclusión la edad, entre 15 y 59 años, los resultados de una citología cervical negativa en un período de dos años anterior a la realización de la investigación o que nunca antes se les hubiera realizado una citología cervical. Aquellas mujeres menores de 25 años, que no están

incluidas en el universo del programa para la detección precoz del CC, asistieron a los consultorios por ser sexualmente activas y desear participar voluntariamente en la presente investigación. Además, se determinó como criterio de inclusión que la citología realizada en el momento del estudio resultara útil para su interpretación.

La muestra quedó constituida por 519 mujeres de las cuales el menor porcentaje estuvo representado por jóvenes entre los 15 y 20 años (8,5%) y la mayor proporción tenía un nivel de escolaridad correspondiente a la enseñanza media (50,7%). Más de la mitad fueron mujeres fumadoras (51,8%) y casadas (68,4%). Cerca del 10% utilizó anticonceptivos orales por más de cinco años. La gran mayoría declaró haber tenido menos de dos parejas sexuales en los últimos dos años (91,3%) y más de la mitad (58,4%) tuvo antecedentes de infecciones de transmisión sexual (ITS). Las características generales de la muestra estudiada aparecen en el Anexo 1.

III.2.2 Operacionalización de las variables

En el Anexo 2 se describe la operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH y las lesiones intraepiteliales cervicales en mujeres entre 15 y 59 años residentes en 4 municipios de La Habana. Enero 2007-diciembre 2009. En el Anexo 3 aparece la operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH, las lesiones intraepiteliales cervicales y los factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos en las mujeres estudiadas.

III.2.3 Muestras clínicas

Las muestras clínicas para el análisis citomorfológico fueron los extendidos de células cervicouterinas, clasificados como útiles para la realización de la citología cervical y los raspados e hisopados celulares de igual localización para la detección viral.

III.2.4 Técnicas y procedimientos

III.2.4.1 Toma de muestras clínicas

Primeramente se realizó la toma de las muestras cervicouterinas para la prueba de Papanicolaou (153) e inmediatamente después, se colectaron mediante raspado e hisopado, las células cervicales para la detección de ADN de PVH. Las muestras para la detección viral se colocaron en un tubo de congelación (Celistar, greiner bio-one GmbH, Alemania) que contenía 3 mL de una solución salina fosfatada al 1% con dodecil sulfato de sodio al 0,01% (PBS-SDS) estéril, utilizada como solución de transporte para la RCP.

Las suspensiones de las células cervicales destinadas para la RCP se mantuvieron en un recipiente con refrigerante hasta su llegada al laboratorio, donde se centrifugaron a 176,085 x g (1500 rpm) a 4 °C (ALC refrigerated centrifuge, PM 140 R, EEUU). Se descartó el sobrenadante de la solución de transporte y el sedimento de células se lavó con PBS 1X y se le realizó una segunda centrifugación bajo las mismas

condiciones. Una vez obtenidos, los sedimentos de células se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento en el departamento de virología del IPK.

III.2.4.2 Análisis citomorfológico-colposcópico

El análisis citomorfológico se realizó mediante la técnica descrita por Papanicolaou en 1942 (153). El criterio de clasificación de las muestras por citología, para establecer las citologías positivas, se basó en el sistema de nomenclatura que establece el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero (8). En este programa el sistema de nomenclatura define las displasias ligeras como: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado I (NIC I) o lesión intraepitelial cervical de bajo grado. Las displasias moderadas y severas se definen como: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado II y III, respectivamente (NIC II y NIC III), incluyendo carcinoma *in situ* (CIS); que se clasifican como lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado. Dentro de esa nomenclatura se consideran tumores malignos o cáncer cervicouterino: los casos de lesiones intraepiteliales escamosas NIC III + CIS, los carcinomas escamosos, las lesiones glandulares intraepiteliales, los adenocarcinomas y otros tumores malignos de diferente origen. A todos los casos que tuvieron una citología positiva en el momento del estudio, se les realizó una colposcopia que se llevó a cabo en los hospitales ginecobstétricos “Eusebio Hernández” y “Ramón González Coro” según el algoritmo establecido para las pacientes tratadas en las consultas de patología de cuello de útero (8).

III 2.4.3 Detección y genotipificación de PVH

III 2.4.3.A Extracción de ADN

Los sedimentos de las células cervicouterinas se lisaron empleando tampón de lisis y proteinasa K, con posterior separación fenólica de las proteínas y precipitación etanólica del ácido nucleico total. Este producto fue resuspendido en 50 µL de agua bidestilada estéril de los cuales se tomaron 5 µL para realizar la RCP (155).

Los controles se procesaron de igual manera que las muestras clínicas como se ha publicado previamente (155). Como controles positivos se emplearon las líneas celulares de la Colección Americana de Cultivos Tipo (del inglés, *American Type Culture Collection, ATCC*) que se mantuvieron en el laboratorio de cultivos celulares del IPK. Las células de carcinoma cervical humano transformadas por PVH fueron, SiHa con 1-2 copias del genoma de PVH-16 (*ATCC, HTB 35, Rockville, Md*), CaSki con 400 copias del genoma de PVH-16 (*ATCC, CRL 1550*) y HeLa con 10-50 copias del genoma de PVH-18 (*ATCC, CCL 2*). Como controles celulares negativos se utilizaron fibroblastos humanos (*ATCC, CCL 171*) (156).

Se empleó además como control positivo, una mezcla de ADNs, extraídos de muestras positivas a diferentes genotipos de PVH, gentilmente donadas por el Dr. J. M. Palefsky de la Universidad de California, San

Francisco, EEUU. Dichos ADNs correspondieron a los siguientes genotipos: PVH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 72, 155, 291.

La calidad del proceso de extracción del ADN genómico se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE 1X (Tris-borato 40 mM, EDTA 2 mM pH 8.0) teñido con Bromuro de Etidio (0,5 mg/mL) (Sigma, EEUU). Concluida la electroforesis, que se realizó durante 40 minutos a 120 V, el ADN purificado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™, Alemania). El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta su uso (157).

III.2.4.3.B RCP cualitativa

Se empleó un juego de cebadores degenerados MY09/MY11, complementarios a una secuencia nucleotídica del marco abierto de lectura L1 de PVH. Estos cebadores amplifican una secuencia conservada en aproximadamente 35 genotipos diferentes. Además se empleó, como control interno de la extracción del ADN y de la reacción de amplificación, el juego de cebadores PC04/GH20, los cuales son complementarios a una región del gen que codifica para la proteína β globina humana. Los dos juegos de cebadores generan fragmentos de ADN de 450 y 268 pares de base, respectivamente (biomers net, Alemania) y sus secuencias aparecen en la Tabla 2 (158).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores MY09/MY11; PC04/GH20 y talla de los fragmentos amplificados durante la RCP cualitativa para la detección de PVH y de β globina humana.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Talla del producto (pb)</i>	<i>Código degenerado</i>
<i>MY09</i>	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	450	M=A+C
<i>MY11</i>	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG		R=A+G
<i>PC04</i>	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	280	W=A+T
<i>GH20</i>	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC		Y=C+T

Fuente: (158).

La RCP se realizó a partir de 5 μ L de ADN de cada muestra clínica, 2 μ L de ADN de los controles positivos y 3 μ L de ADN del control negativo (156). La mezcla de reacción estuvo compuesta por el tampón de amplificación 1X (cloruro de potasio 500 mM, Tris-ácido clorhídrico 100 mM pH 8.5, Cloruro de Magnesio 2 mM), 200 μ M de cada dNTP, 2.5 unidades de la *Taq* polimerasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EEUU), 5 pmoles de PC04 y GH20, 50 pmoles de MY09 y MY11 y finalmente, agua bidestilada estéril hasta completar un volumen final de 100 μ L (158).

La reacción se realizó en un termociclador programable (Eppendorf, Mastercycler personal, Alemania), según las siguientes especificaciones: un paso inicial de desnaturalización durante 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 1

minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos. El producto se mantuvo a 4 °C (158).

Al finalizar la RCP, los productos se detectaron en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X (Tris-borato 40 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) teñido con Bromuro de Etidio (0,5 mg/mL) (Sigma, EEUU). Concluida la electroforesis, que se realizó durante 40 minutos a 120 V, el producto amplificado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™, Alemania). Se utilizó el marcador de peso molecular *DNA ladder 100 bp* (Promega, Madison, WI, EEUU) para comprobar la talla y la calidad del producto amplificado (Tabla 2). Los productos amplificados se mantuvieron a – 20 °C hasta realizar la hibridación.

III.2.4.3.C Hibridación “Dot Blot” para la genotipificación de PVH

A los productos amplificados a partir de las muestras clínicas y de los controles positivos y negativos se les aplicó el método de hibridación “Dot Blot” con sondas biotiniladas. Se realizaron tres rondas de hibridación para genotipos específicos de PVH en 12 membranas de nylon (Pall Biotyde nylon membranes, Gibco BRL, EEUU). La técnica se realizó con sondas tipo específica (biomers net, Alemania) para los genotipos de PVH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 32, 35, 39, 40, 45, 45, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 68, 59, 61, 66, 69, 70, 73, 155 y 291. Además, se incluyó la sonda para el gen de la β globina humana y un juego de sondas consenso para PVH (biomers net, Alemania), lo que permitió la detección de 35 tipos virales diferentes. El procedimiento de hibridación se llevó a cabo según los pasos establecidos en protocolos publicados previamente, donde se encuentran disponibles las secuencias de ADN específicas para cada una de las sondas empleadas (156, 159).

III.2.5 Técnicas de recolección, procesamiento y análisis de la información

Se diseñó un cuestionario para la recolección de la información de las participantes en el estudio (Anexo 4), previa coordinación con las autoridades sanitarias de cada uno de los municipios. Se revisaron las historias clínicas para la triangulación de la información.

Se confeccionó una base de datos en el paquete estadístico SPSS versión 19.0 (IBM Inc., Berkeley, CA, EEUU) para el análisis de las diferentes variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas que definieron las características de la población. Se calcularon las frecuencias absolutas y porcentuales de infección por PVH, así como de los genotipos específicos e infecciones múltiples identificados en las mujeres estudiadas. Estas frecuencias se determinaron además, para cada tipo de diagnóstico citológico.

Se determinó la relación entre las variables analizadas, la presencia de infección por PVH y los diagnósticos citológicos, para lo cual se realizaron tablas de contingencia y se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrado (X^2), considerando significativos los valores de Razón de Prevalencia (RP) mayores que 1, $RP > 1$ y $p < 0,05$, con

un nivel de significación del 95 %. Para determinar las variables predictivas de la infección por PVH y de las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado en la población estudiada se empleó el método de Regresión Logística Multivariada.

III.2.6 Consideraciones éticas

El estudio se realizó de acuerdo con la revisión actualizada de la Declaración de Helsinki (160), en el momento de la investigación y según lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales, de la medicina actual. Las mujeres, después de recibir toda la información necesaria a través de charlas y material escrito, decidieron si participarían o no en el estudio. El personal calificado le explicó a cada una, la importancia de la investigación para el desarrollo de la medicina y el beneficio de conocer si tiene una infección detectable por PVH como factor de riesgo indispensable para la aparición y evolución de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino. Se le solicitó a cada participante su Consentimiento Informado (Anexo 5), la autorización y firma de los tutores, para el caso de las jóvenes menores de edad que decidieron participar en la investigación y se les comunicó que podrían retirarse del estudio sin perjuicio alguno. Toda la información individual relacionada con los sujetos quedó debidamente custodiada por los responsables del estudio, de forma tal que se garantizó la absoluta confidencialidad de los datos personales.

III.3 Frecuencia de infección, genotipos de PVH, valor de la carga viral y factores de riesgo asociados a la infección viral y al grado de las lesiones cervicouterinas, en mujeres mayores de 30 años, con citología positiva

III.3.1 Diseño del estudio, horizonte temporal, universo y muestra

Se realizó un estudio analítico de corte transversal con caso-control anidado. El universo estuvo constituido por todas las mujeres que asistieron a la consulta de patología de cuello uterino de los hospitales ginecobstétricos “Eusebio Hernández” y “Ramón González Coro” las cuales se remitieron desde el área de atención primaria de salud en La Habana, durante el período de enero de 2009 a diciembre de 2011, por tener una citología positiva.

Se establecieron como criterios de inclusión: la edad; mayor de 30 años y los resultados de una citología satisfactoria mediante la prueba de Papanicolaou (153). Su interpretación y confirmación se realizó mediante el sistema de clasificación del Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero (8). No se excluyeron los casos que tuvieran una citología confirmatoria discordante con el resultado inicial obtenido en el área de atención primaria de salud. De esta manera se generó un estudio con caso-control anidado.

La muestra quedó constituida por 322 mujeres mayores de 30 años con diferentes clasificaciones citológicas. De ellas, 211 fueron confirmadas con un diagnóstico citológico positivo (NIC I, NIC II, NIC III y cáncer). Los

111 casos restantes se diagnosticaron como extendidos citológicos negativos para las lesiones intraepiteliales cervicales o malignidad.

Las características generales de esta muestra se detallan en el Anexo 6. La edad media de las mujeres fue de 40 años, 81,4 % de ellas tenía un nivel profesional, técnico o superior y 70,5 % estaban casadas. En cuanto a la historia sexual y ginecológica, cerca del 10 % tuvo su primera relación sexual antes de los 15 años de edad. Solo un 2,8 % alguna vez usó preservativo y 95,3 % informó haber tenido dos o menos parejas sexuales en los dos años previos al estudio. Un 39,1 % había utilizado anticonceptivos orales, mientras que 48,8% declaró el uso de algún dispositivo intrauterino. Cerca del 60% de las mujeres tuvo tres o más embarazos. En el momento de la toma de las muestras, 13,4% estaba en etapa perimenopáusica y un 25,2 % admitió el consumo continuado de alcohol y cigarrillos.

III.3.2 Muestras clínicas

Las muestras clínicas para la detección de PVH fueron los hisopados de células exo y endocervicales de las 322 mujeres, con diferentes clasificaciones citológicas.

III.3.3 Operacionalización de las variables

En el Anexo 7 se describe la operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH y la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, bajo grado y cáncer cervicouterino en este grupo de estudio. En el Anexo 8 se muestra la operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH, la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, bajo grado y cáncer cervicouterino y los factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos en las mujeres estudiadas.

III.3.4 Técnicas y procedimientos

III.3.4.1 Toma de muestras clínicas

Para la toma de muestras de las células cervicales, la posterior extracción de ADN y detección de PVH, se realizó un proceso similar al descrito en el acápite III.2.4.1. En este caso, a diferencia del procedimiento descrito anteriormente, se empleó un cepillo citológico muescado (Digene, Inc., Gaithersburg, MD, EEUU) que se introdujo en el canal endocervical para posteriormente realizar un barrido en la zona del exocérvix, con el fin de obtener las células endo y exocervicales para la extracción de ADN. Una vez obtenidas las muestras de las células cervicales, se mantuvieron en una solución de transporte comercial (Digene Inc., Gaithersburg, MD) destinada a su conservación, traslado y almacenamiento. Luego se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento en el departamento de virología del IPK, donde se realizó la extracción del ADN y la detección de PVH.

III.3.4.2 Análisis citomorfológico-colposcópico

El análisis citomorfológico y colposcópico se le realizó a cada una de las pacientes incluidas en el estudio en los hospitales ginecobstétricos antes mencionados según los algoritmos establecidos para las pacientes tratadas en todas las consultas de patología de cuello de útero del país (8).

En el presente estudio, el criterio de clasificación de las muestras por citología se reconsideró luego del diagnóstico confirmatorio y se basó en el sistema de nomenclatura que establece el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero (8), incluyendo la referencia que hace este sistema a la Clasificación de Bethesda, 2001 (161). En este sentido las muestras se definieron como: negativas, lesiones intraepiteliales cervicales de bajo grado (NIC I), lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC II y NIC III) y cáncer cervicouterino (NIC III + CIS, carcinomas escamosos, lesiones glandulares intraepiteliales, adenocarcinomas y otros tumores malignos de diferente origen).

III.3.4.3 Detección y genotipificación de PVH

III.3.4.3.A Extracción de ADN

El proceso de extracción de ADN genómico total (ADNg) se le realizó a las células cervicales de todas las muestras clínicas y a las muestras y líneas celulares empleadas como controles positivos y negativos descritos previamente en el acápite III 2.4.3.A. Para ello se empleó el estuche comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), según las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en 200 µL de tampón de elusión y se almacenó a -20° C hasta su utilización.

III.3.4.3.B Implementación de la RCP-TR y obtención de las curvas estándares

Con el propósito de detectar y cuantificar 6 de los genotipos de PVH-AR más frecuentemente asociados a las lesiones intraepiteliales cervicales y al cáncer cervicouterino a escala global (PVH 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58), se realizó la introducción del método de RCP-TR en el laboratorio de ITS del IPK. Para ello se modificaron algunos parámetros de un protocolo publicado previamente, en el año 2009, por Schmitz y cols. (162).

Las secuencias de los cebadores y de las sondas aparecen en la Tabla 3 y se corresponden con una región no codificante de los genes E6 y E7 de PVH (162).

En la implementación, aunque también se empleó la metodología *TaqMan* o sonda de hidrólisis, se trabajó sobre la plataforma *Light Cycler* de *Roche* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EEUU). Esta modificación eliminó el protocolo de reacciones de RCP múltiples, por lo que se emplearon reacciones simples de RCP-TR por muestra y por genotipo. Para este fin, las sondas se marcaron con los fluorocromos BHQ-1a-6-FAM y TAMRA-6-FAM (BHQ: *Black Hole Quencher*; FAM: 6-Fam).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores y sondas empleadas en la RCP-TR reportadas previamente por Schmitz y cols.

<i>Cebadores y Sondas</i>	<i>Secuencias 5'-3'</i>
PVH 16 +	5' GAA CCG AAA CCG GTT AGT ATA A 3' (22 pb)
PVH 16 -	5' ATG TAT AGT TGT TTG CAG CTC TGT 3' (24 pb)
PVH 16 Sonda	5' CAT TTT ATG CAC CAA AAG AGA ACT GCA ATG TTT C 3' (34 pb)
PVH 18 +	5' GGA CCG AAA ACG GTG TAT ATA A 3' (22 pb)
PVH 18 -	5' CAG TGA AGT GTT CAG TTC GGT 3' (21 pb)
PVH 18 Sonda	5' ATG TGA GAA ACA CAC CAC AAT ACT ATG GCG CG 3' (32 pb)
PVH 31 +	5' GAA CCG AAA ACG GTT GGT ATA TA 3' (23 pb)
PVH 31 -	5' ATC GTA GGG TAT TTC CAA TGC 3' (21 pb)
PVH 31 Sonda	5' CAT AGT ATT TTG TGC AAA CCT ACA GAC GCC ATG T 3' (34 pb)
PVH 45 +	5' CAG TGT AAT ACA TGT TGT GAC CAG 3' (24 pb)
PVH 45 -	5' ACA GGA TCT AAT TCA TTC TGA GGT 3' (24 pb)
PVH 45 Sonda	5' CAA GAA AGA CTT CGC AGA CGT AGG GAA ACA C 3' (31 pb)
PVH 52 +	5' AAA CGG TCA GAC CGA AAC C 3' (19 pb)
PVH 52 -	5' CAG CAC CTC ACA CAA TTC GT 3' (20 pb)
PVH 52 Sonda	5' AAC ACA GTG TAG CTA ACG CAC GGC CAT GT 3' (29 pb)
PVH 33 +	5' GCA TGA TTT GTG CCA AGC AT 3' (20 pb)
PVH 33 -	5' CTC AGA TCG TTG CAA AGG TTT 3' (21 pb)
PVH 33 Sonda	5' ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA CAG TGC GTG GAA TGC 3' (36 pb)
PVH 58 +	5' CAC GGA CAT TGC ATG ATT TGT 3' (21 pb)
PVH 58 -	5' TCA GAT CGC TGC AAA GTC TTT 3' (21 pb)
PVH 58 Sonda	5' TTT CAA TTC GAT TTC ATG CAC 3' (21 pb)
β globina +	5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3' (20 pb)
β globina -	5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' (20 pb)
β globina Sonda	5' TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA TCT GAC TCC 3' (30 pb)

Fuente: (162).

Confección de las curvas estándares

Se estableció el número de copias de cada uno de los ADN_g obtenidos a partir de cada línea celular, SiHa y HeLa. Para ello se correlacionó el número de copias de PVH por célula con el número de células a las que se le realizó la extracción del ADN_g. Se procesaron 10 millones de células para ambas líneas celulares.

Posteriormente se procedió a la confección de dos curvas estándares a partir de cada uno de los ADN_g. Para esto se realizaron diluciones seriadas en base 10 de los dos productos, en agua libre de nucleasas. Para el caso de PVH 16 desde 10⁵ copias hasta 10 copias de ADN viral/μL y para PVH 18 desde 10⁶ copias hasta 10 copias de ADN viral/μL. Se realizaron tres réplicas por cada una de las diluciones de los productos de ADN_g. Se añadieron 5 μL de cada dilución a capilares que contenían 15 μL de una mezcla formada por: 8 μL de agua, 4 μL de mezcla universal de RCP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EEUU), 10 pmoles y entre 1-5 pmoles de oligonucleótidos y sonda, respectivamente. Los parámetros del ciclaje fueron los siguientes: 94 °C por 10 minutos y 45 ciclos compuestos por 94 °C durante 15 segundos, 50 °C por 20 segundos y 60 °C durante 40 segundos. Cada uno de los ADN estándares obtenidos se trabajó por separado en días diferentes. Para la construcción de las curvas estándares se empleó el método de la derivación secundaria máxima (SDMM: siglas

del inglés *Second Derivative Maximum Method*), versión 3.3 del programa del *Light Cycler 1.5* de Roche (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EEUU).

Se estableció el límite de detección de la RCP-TR implementada, para lo cual se identificó la última dilución en la que el sistema fue capaz de detectar el ADN diana en el mismo ciclo para todas las réplicas.

Para descartar posibles falsos positivos se amplificaron muestras de ADN extraídos previamente de tres cepas no relacionadas genéticamente: citomegalovirus humano (CMVh: AD169, ATCC); virus de la varicela zóster (VVZ: aislamiento clínico, Laboratorio de ITS, Virología, IPK) y virus del herpes simple 2 (VHS-2: aislamiento clínico, Laboratorio de ITS, Virología, IPK).

Se determinó, además, que no existieran amplificaciones inespecíficas entre los genotipos presentes en cada una de las líneas celulares empleadas como controles para la confección de las curvas estándares.

Por otra parte, se evaluó que el sistema funcionara de manera específica para los diferentes genotipos incluidos en el ensayo. Para ello se analizaron en paralelo 40 muestras clínicas conocidas y genotipadas previamente por RCP cualitativa-secuenciación nucleotídica y por el método implementado.

III.3.4.3.C Aplicación de la RCP-TR a las muestras clínicas

El método implementado y descrito en el acápite anterior se aplicó a las 322 muestras clínicas, las cuales se tipificaron y se cuantificó la carga viral para cada genotipo de PVH empleando las curvas estándares previamente confeccionadas. En todos los casos se empleó como control interno un fragmento del gen que codifica para la β globina humana, para demostrar la calidad del ADN utilizado, según recomiendan los autores del protocolo original (162).

III.3.4.3.D RCP cualitativa

Para completar el genotipado, al ADN obtenido de las 322 muestras clínicas se le realizó una RCP con los cebadores MY09/MY11 como se describe en el acápite III.2.4.3.B (157, 158, 163) y posterior secuenciación nucleotídica. Los productos de la RCP con los cebadores MY09/MY11 se purificaron de forma automatizada en el extractor automático *QIAcubeTM* (QIAGEN, Hilden, Alemania), con el estuche comercial *QIAquick[®] PCR purification* (QIAGEN, Hilden, Alemania), según las indicaciones del fabricante, con la finalidad de secuenciar el producto amplificado. La calidad de la purificación se evaluó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (acápite III.2.4.3.B) y se estimó la concentración final del producto purificado mediante comparación visual con el marcador de peso molecular *DNA ladder 100 bp* (Promega, Madison, WI, EEUU). A todos los ADNs con concentraciones mayores de 50 ng/uL se les realizó secuenciación nucleotídica.

III.3.4.3.E Secuenciación nucleotídica

Para las reacciones de secuenciación se emplearon los mismos cebadores utilizados en la RCP: MY09 (cebador en sentido +) y MY11 (cebador en sentido -), y obtener así, secuencias en ambos sentidos. El producto secuenciado fue de 450 pares de base (158) (Tabla 2).

Se prepararon mezclas constituidas por 5 pmoles de cada uno de los cebadores especificados, 8 µL de la mezcla de reacción de secuencia DTCS *Quick Start Master Mix*, suministrada con el *Dye Terminator Cycle Sequencing* (DTCS) *Quick Start Kit* (Beckman Coulter, EEUU), 5 µL de ADN purificado (aproximadamente 100 ng) y 6 µL de agua, libre de nucleasas, hasta completar 20 µL de reacción. El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial DTCS *Quick Start Master Mix* (Beckman Coulter, EEUU).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se editaron y ensamblaron empleando el paquete informático *Sequencher* versión 4. 10. 1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EEUU). Las secuencias obtenidas se alinearon mediante BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*). Dicho programa permitió la comparación de las mismas con varias de las secuencias de referencia internacional, según los genotipos identificados, disponibles en la base de genes *GenBank* ([www//ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) y para definir el genotipo mayoritario de PVH presente en cada muestra clínica.

III.3.4.3.F Análisis filogenético

La distancia genética entre las secuencias cubanas y las de referencia se calculó con el programa MEGA 5 versión 5.03 mediante el modelo Kimura-2-parámetros con un análisis de re-muestreo (*bootstrap*, del inglés, *re-sampling*) de 1 000 réplicas. El árbol filogenético se construyó con el programa bioinformático Mr. Bayes versión 3.1.2 (164), con la incorporación de los modelos de sustitución nucleotídica que se determinaron con el programa *Model Generator* versión 0.85 (165).

III.3.5 Técnicas de recolección, procesamiento y análisis de la información

Se diseñó un cuestionario para la recolección de la información de las participantes (Anexo 9), previa coordinación con las autoridades sanitarias de cada uno de los hospitales ginecobstétricos donde además, se revisaron las historias clínicas para la triangulación y el completamiento de la información.

Se confeccionó una base de datos en el paquete estadístico SPSS versión 19. 0 (IBM Inc., Berkeley, CA) para el análisis de las diferentes variables. Se calcularon las frecuencias absolutas y porcentuales de infección por PVH, así como de los genotipos específicos e infecciones múltiples identificados en las mujeres estudiadas. Estas frecuencias se determinaron además para cada tipo de diagnóstico citológico y colposcópico.

Se determinó la asociación entre los factores de riesgo más comúnmente estudiados y la presencia de infección por PVH, así como otras variables clínicas y epidemiológicas para lo cual se realizaron tablas de contingencia y se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrado (X^2), considerando significativo los valores de Razón de Productos Cruzados (OR), del Inglés *Odd Ratio*, $OR > 1$ y $p < 0,05$, con un nivel de significación del 95 %. Para determinar los predictores de riesgo de la infección por PVH y de las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado en la población estudiada se empleó el método de Regresión Logística Multivariada.

Para determinar si existió relación entre el valor de la carga viral de los genotipos de PVH presentes en las muestras clínicas y el grado de las lesiones citológicas, se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 3.0. Se emplearon las pruebas Kruskal-Wallis y Mann Whitney para la comparación de las medianas de las cargas virales, considerando significativos los valores de dichos estadígrafos mayores que 1 y el valor de $p < 0,05$.

III.3.6 Consideraciones éticas

El estudio se realizó de acuerdo con la última revisión de la Declaración de Helsinki (160) y lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales, de la medicina actual.

A todas las participantes se les informó el objetivo y la importancia del estudio. Se le solicitó a cada una su Consentimiento Informado (Anexo 10), que firmaron por libre y espontánea voluntad por ser mayores de edad, y se les informó que podrían retirarse del estudio sin perjuicio alguno. Se entregó una copia del consentimiento informado a cada una de estas participantes y luego de manifestar su completa disposición a participar en el estudio, se les pidió dejar constancia de su conocimiento previo sobre la toma de la muestra exo y endocervical, utilizando instrumental desechable para eliminar posibles riesgos de contaminación. Además se les realizó una entrevista según el cuestionario para la recogida de la información, la cual quedó debidamente custodiada por los responsables del estudio, de forma tal que se garantizó la absoluta confidencialidad de los datos personales.

III.4 Frecuencia de infección anal, genotipos de Papilomavirus humanos, valor de la carga viral y su asociación con las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en hombres cubanos seropositivos a VIH con otras infecciones de transmisión sexual

III.4.1 Diseño del estudio, horizonte temporal, universo y muestra

Se realizó un estudio observacional de corte transversal a partir de muestras de la mucosa anal de individuos masculinos seropositivos a VIH-1 que acudieron a la consulta de Dermatología del IPK entre abril y agosto del año 2012, por presentar ITS con manifestaciones cutáneo-mucosas con localización en la región anogenital.

Como criterios de inclusión se estableció, pertenecer al sexo masculino, ser seropositivo al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) con diagnóstico confirmado (ELISA, Western Blot), haber tenido una

infección de transmisión sexual previa, en los últimos dos años o en el momento del estudio; tener una citología anal satisfactoria para su evaluación y que el paciente aceptara incorporarse a la investigación a través de su consentimiento informado. La presencia de secreciones en la mucosa anal sugestivas de infecciones bacterianas u otras condiciones médicas no se consideraron como criterios de exclusión.

Se garantizó que en la unidad de atención médica donde se atendieron los participantes no hubo sesgos de tipo étnico, económico ni sociocultural al seleccionar los pacientes a estudiar.

La muestra quedó constituida por 56 individuos masculinos, seropositivos a VIH, con otras ITS, con manifestaciones cutáneo-mucosas (incluidos condilomas) y con una citología anal satisfactoria. Las características generales de los individuos estudiados se detallan en el Anexo 11. La mediana de la edad de dichos individuos fue de 35 años. Más de la mitad de ellos tenía un nivel de escolaridad correspondiente a la enseñanza media (51,8%) e inició las relaciones sexuales después de los 15 años (66%). Cerca del 90% se identificó como HSH y 85,7% declaró la práctica de sexo anal receptivo. Aproximadamente 20% de los individuos declaró haber tenido más de 10 parejas sexuales en los últimos dos años y 84% presentó lesiones condilomatosas en el momento del estudio. Un 51,8% de los pacientes tenían, en el momento de la investigación, conteo de linfocitos T CD4+ entre 200 y 500 células/mm³.

III.4.2 Muestras clínicas

Las muestras clínicas consistieron en cepillados de la mucosa anal para realizar el estudio citológico y la detección de PVH.

III.4.3 Operacionalización de las variables

En el Anexo 12 se puede observar la operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH y las lesiones intraepiteliales escamosas anales en hombres cubanos seropositivos a VIH. En el Anexo 13 aparece la operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH, las lesiones intraepiteliales escamosas anales y los factores sociodemográficos, epidemiológicos y clínicos en los individuos estudiados.

III.4.4 Técnicas y procedimientos

III.4.4.1 Toma de muestras clínicas

Para la citología, se obtuvieron muestras de las células de la mucosa anal y para este fin se siguió el procedimiento descrito previamente (166). Dichas muestras se colectaron en el IPK y se trasladaron hacia el Hospital "Enrique Cabrera", donde se realizaron los estudios citológicos. Las células del epitelio anal, para la detección de PVH se colocaron en una solución de transporte (Digene Inc., Gaithersburg, MD, EEUU) destinada a la conservación, traslado y almacenamiento de células cervicouterinas. Se mantuvieron a -20 °C

hasta su procesamiento en el departamento de virología del IPK, donde se realizó la extracción del ADN y la detección de PVH.

III.4.4.2 Análisis citomorfológico

Los extendidos celulares de la mucosa anal se colorearon mediante tinción con hematoxilina-eosina (8, 153) para el diagnóstico de lesiones intraepiteliales escamosas anales. Se clasificaron según los criterios de utilidad de la muestra en satisfactoria y no satisfactoria para su evaluación. Las satisfactorias se clasificaron, según el Sistema de Bethesda 2001, actualizado en el año 2003 (167), en: negativas para lesiones intraepiteliales y malignidad (Negativa), células escamosas atípicas de significado indeterminado (Atípicas), células escamosas atípicas de significado indeterminado con sospecha de alto grado (Atípicas de Alto Grado), lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (Lesiones de Bajo Grado), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (Lesiones de Alto Grado) y hallazgo sospechoso de carcinoma *in situ* o invasor.

III.4.4.3 Detección y genotipificación de PVH

III.4.4.3.A Extracción de ADN

Se realizó el proceso de extracción de ADN empleando el estuche comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), según las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en 200 µL de tampón de elusión y se almacenó a -20° C hasta la realización de la RCP-TR. Los controles positivos y negativos empleados para el estudio de estas muestras se describen en el acápite III 2.4.3.A.

III.4.4.3.B RCP cualitativa tipo específica para PVH 6 y 11

Se realizó una RCP cualitativa para la detección de los genotipos de PVH 6 y 11 de bajo riesgo oncogénico. Para ello se emplearon los oligonucleótidos específicos para cada genotipo, diseñados a partir de una región variable del gen L1 de PVH conocida como región V. Sus secuencias pueden observarse en la Tabla 4 (168).

Tabla 4. Secuencias de los cebadores para PVH 6 y 11 y talla de los fragmentos amplificados durante la RCP.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Talla del producto (pb)</i>
PVH6L1+	TGGGGTAATCAACTGTTTGTACTGTGGTA	120
PVH6L1R-	GCATGTACTCTTTATAATCAGAATTGGTGTATGTG	
PVH11L1+	CTGGGGAAACCACTTGTGGTACTGTG	120
PVH11L1R-	CGCATGTATTCTTATAATCTGAATTAGTGTATGTA	

Fuente: (168).

Con el empleo de estos oligos se amplifica un fragmento de 120 pares de base para cada tipo viral y se realizó la RCP en tubos independientes o reacciones simples, como una modificación al protocolo original publicado previamente por Seaman y cols. (168). La mezcla de reacción estuvo compuesta por el tampón de amplificación

1X (cloruro de potasio 500 mM, Tris-ácido clorhídrico 100 mM pH 8,3, cloruro de magnesio 6 mM), 200 μ M cada dNTP, 2.5 unidades de la *Taq* polimerasa (Roche, Diagnostics, Indianapolis, IN, EEUU), 5 pmoles de cada cebador y cantidad suficiente de agua bidestilada estéril para completar un volumen final de reacción de 50 μ L. La RCP se efectuó a partir de 5 μ L del ADN extraído de las muestras clínicas. Las condiciones de amplificación establecidas en el ensayo fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización durante 10 minutos a 94 °C. Seguidamente, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C, y 1 minuto a 72 °C. Se incluyó un paso final de extensión a 72 °C durante 5 minutos y en ese punto el producto se mantuvo a 4 °C. El chequeo de los productos de la RCP para definir la positividad a los genotipos de PVH 6 y 11 según la calidad y talla de la banda esperada se realizó según el procedimiento que se describe en el acápite III. 2. 4. 3. B.

III.4.4.3.C RCP-TR para la detección de PVH en células de la mucosa anal

Se identificaron y cuantificaron 6 genotipos virales de PVH (PVH 16, 18, 31, 33, 45 y 58), mediante el protocolo descrito anteriormente en los acápites III.3.4.3.B y III.3.4.4.

III.4.5 Técnicas de recolección, análisis y procesamiento de la información

Se diseñó un cuestionario para la recolección de la información de los participantes (Anexo 14). Además, se revisaron las historias clínicas para la triangulación y el completamiento de la información. Se confeccionó una base de datos en el paquete estadístico SPSS versión 19. 0 (IBM Inc., Berkeley, CA, EEUU) para el análisis de las diferentes variables. Se calcularon las frecuencias absolutas y porcentuales de infección por PVH, así como de los genotipos específicos e infecciones múltiples identificados en los individuos estudiados. Estas frecuencias se determinaron además para cada tipo de diagnóstico citológico en la citología anal. Se determinó la relación entre las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en estos individuos y la presencia de la infección por PVH, así como con las lesiones intraepiteliales anales. Para ello se realizaron tablas de contingencia y se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrado (X^2). Se consideraron significativos los valores de $RP > 1$ y $p < 0,05$, con un nivel de significación del 95%.

La relación entre los valores de la carga viral de los genotipos de PVH presentes en las muestras clínicas y el grado de la lesión citológica se analizó mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 3.0. Se utilizaron las pruebas Kruskal-Wallis y Mann Whitney para la comparación de las medianas de las cargas virales, considerando significativos los valores de dichos estadígrafos > 1 y $p < 0,05$.

III.4.6 Consideraciones éticas

El estudio se realizó de acuerdo con la última revisión de la Declaración de Helsinki (160) y lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales, de la medicina actual. Los individuos, después de haber recibido

toda la información necesaria a través de charlas y material escrito, pudieron decidir si participarían o no en el estudio.

El personal calificado le explicó a cada uno, cómo se realizaría el estudio, empleando un lenguaje claro y sencillo para facilitar su comprensión, así como el beneficio de conocer si tiene una infección detectable por PVH como factor de riesgo indispensable para la aparición y evolución de lesiones anogenitales premalignas y malignas. Se le solicitó a cada participante su Consentimiento Informado (Anexo 15), la autorización y firma de los tutores, para el caso de los menores de edad que decidieron participar en la investigación y se les comunicó que podrían retirarse del estudio sin perjuicio alguno. Se entregó una copia del consentimiento informado a cada uno de los participantes y luego de manifestar su completa disposición a participar en el estudio, se le realizó una entrevista según el cuestionario previamente elaborado.

A los pacientes se les realizó el seguimiento médico una vez que se confirmó el diagnóstico de infección por PVH en la mucosa anal. Los resultados de las pruebas moleculares de laboratorio se enviaron, de manera confidencial, al especialista y el mismo decidió el tratamiento adecuado según el genotipo viral y el resultado de la citología anal. En el caso de los pacientes que presentaron infección por PVH-AR y citología anal anormal se recomendó al especialista remitirlos a una consulta de proctología, sugiriendo la realización de la anoscopía y el seguimiento mediante citología anal en un período de 6 meses a 1 año.

Los riesgos del estudio fueron mínimos en relación con los beneficios, estos estuvieron relacionados con la toma de la muestra debido a la posibilidad de pequeños sangramientos. La muestra se obtuvo por personal médico calificado y con los cuidados necesarios para minimizar los riesgos.

Toda la información individual relacionada con los sujetos quedó debidamente custodiada por los responsables del estudio, de forma tal que se garantizó la absoluta confidencialidad de los datos personales.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Frecuencia de infección por PVH, presencia de lesiones intraepiteliales cervicales y su relación con las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en mujeres sexualmente activas, entre 15 y 59 años, residente en 4 municipios de La Habana

IV.1.1 Frecuencia de infección por PVH y su relación con el resultado de la citología cervical

En el grupo de mujeres estudiadas durante el período analizado, 41,6% de los casos (216/519) se diagnosticó con citología positiva. De ellos, 41,2% (89/216) presentó lesiones de bajo grado o NIC I y en 58,8% (127/216) se detectaron lesiones cervicales de alto grado o NIC II/III.

La incidencia del CC en Cuba, experimentó un incremento a partir del año 1996, con picos en los valores de la tasa/100,000 en los años 2003 y 2009 (9). El grupo de mujeres estudiadas, aunque no tenían antecedentes de alteraciones citológicas en los dos años anteriores a la investigación, mostró un porcentaje elevado de lesiones de alto grado, lo que se asocia con una tendencia al aumento de estas lesiones precursoras del CC, en el período 2007-2009. Este hallazgo está relacionado con factores que están influyendo en esta población, entre ellos la infección o reinfección con genotipos oncogénicos de PVH. Además otros factores clínico-epidemiológicos que serán analizados más adelante.

La frecuencia de infección en la población analizada fue de 66,3% (344/519) y se comportó con cifras superiores a lo que se ha observado en la mayoría de las investigaciones realizadas a escala global (1, 169). No obstante, estos valores deben ser analizados de acuerdo al diseño del estudio y al tamaño de la muestra. En estudios con diferentes diseños, realizados en países de diversas latitudes como Italia (59), Corea (170), Argentina (171) y Brasil (172, 173), los valores de prevalencia se comportan con cifras variables, con frecuencias que oscilan entre 19% y 47% y pueden llegar hasta un 60%, en dependencia de las características de la población estudiada y del tamaño muestral. Los resultados del presente trabajo son similares, particularmente, a lo que se ha encontrado en poblaciones brasileñas no vacunadas, residentes en determinadas zonas urbanas y seleccionadas bajo los mismos criterios de inclusión y en investigaciones con diseños similares. En dichos estudios las frecuencias de infección oscilan entre 60% y 70%, e incluso superiores (172-174).

La mayoría de los datos publicados en estudios previos de mujeres cubanas no incluyen técnicas de detección viral por métodos moleculares sino mediante estudios citológicos e histológicos en pacientes con lesiones cervicales. Los resultados obtenidos en dichos estudios (175-178) muestran frecuencias de infección más bajas que las

encontradas en el presente estudio, ya sea de manera general o dentro de las diferentes clasificaciones citológicas, de forma particular. Esto es de esperar al comparar una técnica molecular de detección de virus con técnicas que buscan cambios morfológicos en las células, asociados a las infecciones por PVH.

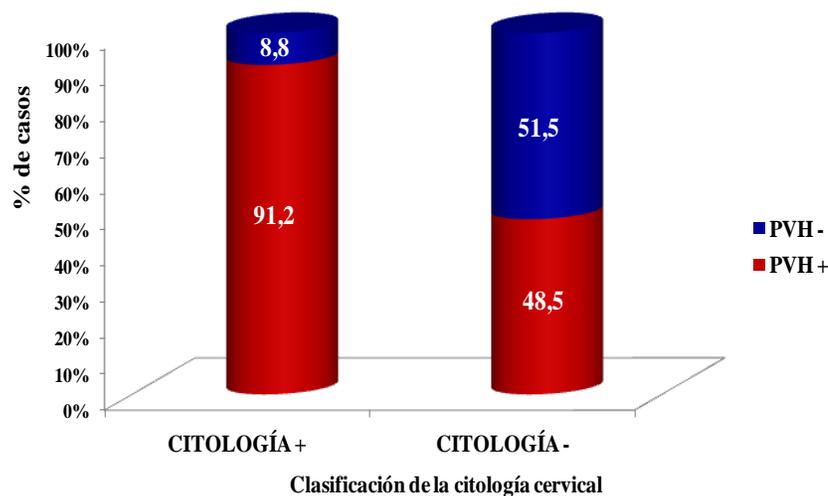


Figura 3. Relación entre la clasificación citológica y la infección por PVH en mujeres entre 15 y 59 años.

Como se observa en la Figura 3, en 91,2% (197/216) de los casos con citología positiva se detectó infección viral, mientras que se identificó la infección en 48,5% (147/303) de los casos con citología negativa ($p=0,000$; $RP=11,00$ IC 95% 6,53-18,54). Estos resultados muestran una probabilidad 11 veces superior de que las mujeres con citología positiva estén infectadas por PVH. En el presente estudio las mujeres con citología negativa presentaron una frecuencia de infección por PVH mayor a lo que se ha establecido en la generalidad de los estudios realizados en los países de diferentes continentes. Las frecuencias de infección por PVH oscilan entre 10% y 30% en mujeres sin alteraciones citológicas, con excepción de datos publicados en África (179), Brasil (172-174) y otros países latinoamericanos donde las conductas de riesgo influyen considerablemente en la historia natural de la infección (180). Para explicar estos resultados, es importante destacar ciertos aspectos. Actualmente, los valores de prevalencia de la infección por PVH se han modificado por la introducción de la vacunación en gran parte de los países desde el año 2006. Sin embargo, en lugares donde la población femenina no ha sido inmunizada contra PVH, como en el caso de Cuba, la frecuencia de infección es superior y está asociada a una serie de conductas sexuales de riesgo. También a factores sociodemográficos y epidemiológicos como la situación laboral, el nivel de escolaridad, el número de parejas sexuales, la edad de inicio de las relaciones sexuales (52), el hábito de fumar y el uso de anticonceptivos orales (181).

IV.1.2 Genotipos de PVH más frecuentes en población femenina, entre 15 y 59 años y su relación con la presencia de las lesiones detectadas en la citología cervical

Se detectaron 30 genotipos virales en la población analizada. Los genotipos que se encontraron circulando más frecuentemente aparecen en la Figura 4. De ellos el más frecuente fue el PVH tipo 16, seguido de los tipos 31 y 18.

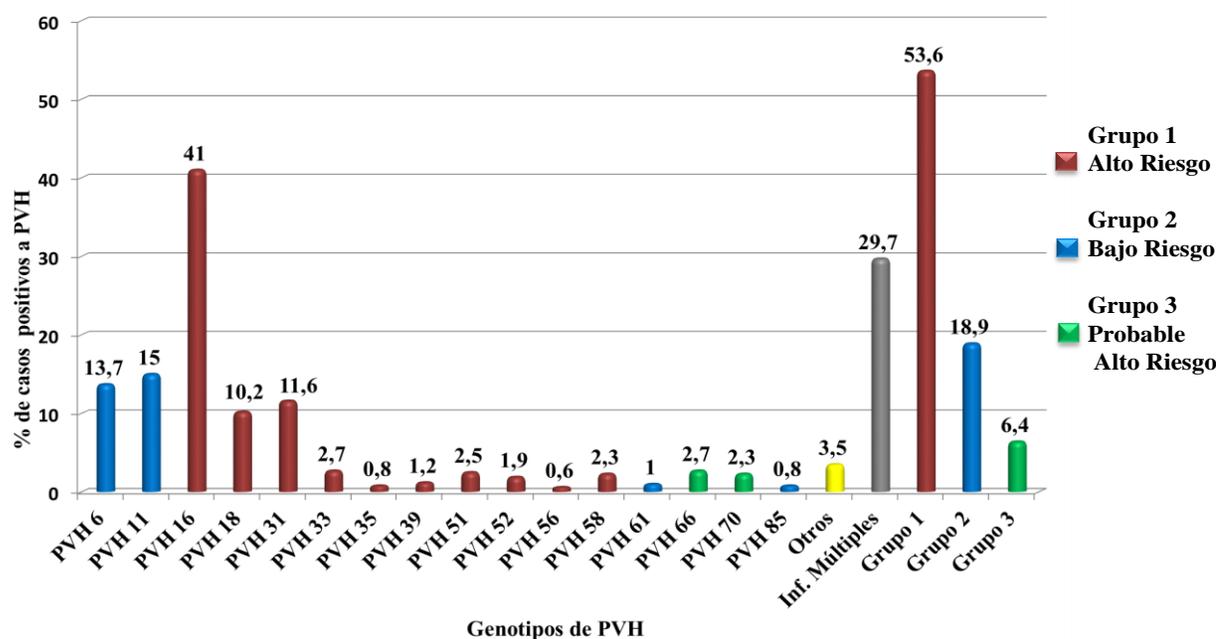


Figura 4. Genotipos de PVH identificados en mujeres entre 15 y 59 años.

Como se observa en la Figura 4, el Grupo 1 incluye todos los genotipos de alto riesgo oncogénico identificados en el estudio; el Grupo 2 contiene todos los genotipos de bajo riesgo oncogénico; el Grupo 3 considera todos los genotipos de probable alto riesgo oncogénico o riesgo no definido. Dentro de las Infecciones Múltiples se tienen en cuenta los casos infectados con más de un genotipo de PVH y el grupo clasificado como "otros" contiene genotipos que no pudieron ser tipificados. Como se puede apreciar, existió un predominio de genotipos de alto riesgo oncogénico.

Muchas investigaciones basadas en estudios poblacionales sobre la circulación y prevalencia de genotipos de PVH, demuestran que los genotipos más frecuentes mundialmente son PVH 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, con la mayor relevancia clínica por su papel causal en la aparición de lesiones precursoras del CC (60, 182). Se demuestra también que estos genotipos de alto riesgo oncogénico pueden detectarse hasta en un 50% de los casos positivos a PVH y en porcentajes mayores, según el grado de las lesiones citológicas (135-137). Los genotipos de bajo riesgo oncogénico como los tipos de PVH 6 y 11 son frecuentes, particularmente en la

población más joven, donde se detectan valores de prevalencia entre 12% y 20%, particularmente en lesiones de bajo grado y verrugas genitales (60, 182, 183). En investigaciones realizadas en países asiáticos (184), Canadá (185), Argentina y en otras áreas geográficas se muestra una distribución similar en cuanto a los genotipos más frecuentes (186). La presencia de estos genotipos se asocia al comienzo de las relaciones sexuales a edades tempranas y a las conductas sexuales de riesgo en poblaciones no vacunadas.

En la Figura 5 se observan las frecuencias de infección por los genotipos de PVH encontrados más comúnmente en la población analizada y asociados ($p < 0,05$) con la citología positiva.

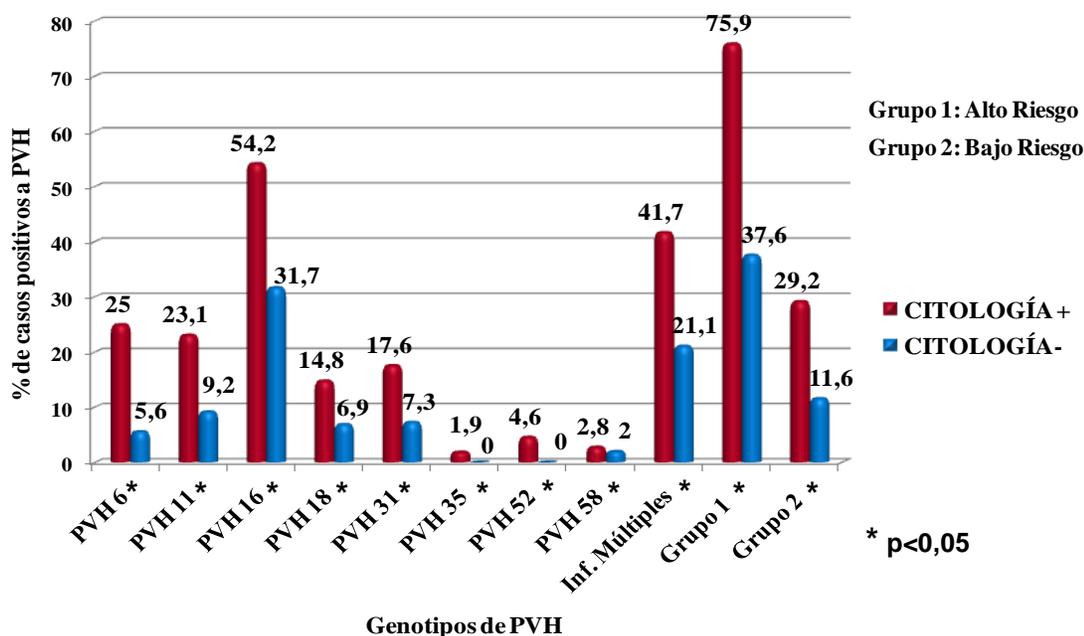


Figura 5. Genotipos de PVH asociados a la citología positiva en mujeres entre 15 y 59 años.

La infección por PVH 6, las infecciones múltiples y aquellas que incluyen genotipos del Grupo 1 (alto riesgo oncogénico) fueron prevalentes en mujeres con cualquier tipo de alteración citológica. Los genotipos de PVH 16, 18, 52 y 58 estuvieron asociados a las lesiones de alto grado (NIC II / III). En las lesiones de bajo grado (NIC I) prevalecieron todos los genotipos de bajo riesgo oncogénico (Grupo 2) y específicamente el tipo 11, de manera mayoritaria. En las Tablas 5, 6 y 7 se muestran las asociaciones encontradas entre la infección por los diferentes genotipos de PVH y las lesiones citológicas de alto y bajo grado.

Este análisis muestra un predominio de genotipos de alto riesgo oncogénico, principalmente asociados a las lesiones de alto grado. Los datos obtenidos en investigaciones realizadas a escala global, respecto a los genotipos circulantes en cada área geográfica, reflejan que las frecuencias varían de acuerdo a las particularidades de cada población (60, 182, 183, 187).

Tabla 5. Genotipos de PVH de alto riesgo oncogénico y resultado de la citología cervical en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis univariado.

<i>Genotipo viral</i> <i>n=216</i>	<i>NIC I</i> <i>n (%)</i> <i>89 (41,2)</i>	<i>NIC II/III</i> <i>n (%)</i> <i>127 (58,8)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>RP (IC 95%)</i>
<i>Positivo a cualquier tipo de PVH</i>	81 (91,0)	116 (91,3)	0,000^a 0,000^b	6,42 (3,03-13,63)^a 7,58 (3,96-14,53)^b
<i>16</i>	44 (49,4)	73 (57,5)	0,077 ^a 0,000^b	1,51 (0,95-2,39) ^a 2,43 (1,62-3,66)^b
<i>18</i>	6 (6,7)	26 (20,5)	0,238 ^a 0,000^b	0,59 (0,24-1,42) ^a 3,48 (1,94-5,23)^b
<i>31</i>	14 (15,7)	24 (18,9)	0,865 ^a 0,172 ^b	0,88 (0,44-1,77) ^a 1,60 (0,87-2,93) ^b
<i>33</i>	5 (5,6)	2 (1,6)	0,074 ^a 0,534 ^b	2,78 (0,91-8,51) ^a 0,51 (0,11-2,29) ^b
<i>35</i>	2 (2,2)	2 (1,6)	0,138 ^a 0,252 ^b	4,92 (0,68-35,39) ^a 3,12 (0,43-22,37) ^b
<i>39</i>	0 (0)	2 (1,5)	0,596 ^a 0,638 ^b	0,83 (0,79-0,86) ^a 1,55 (0,28-8,57) ^b
<i>51</i>	4 (4,5)	4 (3,1)	0,252 ^a 0,530 ^b	2,20 (0,66-7,31) ^a 1,38 (0,41-4,57) ^b
<i>52</i>	0 (0)	10 (7,9)	0,224 ^a 0,000^b	0,82 (0,79-0,86) ^a -
<i>58</i>	0 (0)	6 (4,7)	0,235 ^a 0,037^b	0,82 (0,79-0,86) ^a 3,19 (1,01-10,1)^b

Fuente: Modelo de recogida de información, resultados de la investigación de laboratorio y de la citología cervical.
a: con respecto a NIC I, **b:** con respecto a NIC II/III.

Tabla 6. Genotipos de PVH de bajo y de probable alto riesgo oncogénico y resultado de la citología cervicouterina en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis univariado.

<i>Genotipo viral</i> <i>n=216</i>	<i>NIC I</i> <i>n (%)</i> <i>89 (41,2)</i>	<i>NIC II/III</i> <i>n (%)</i> <i>127 (58,8)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>RP (IC 95%)</i>
<i>Genotipos de bajo riesgo oncogénico</i>				
<i>6</i>	28 (31,5)	26 (20,5)	0,000^a 0,010^b	4,13 (2,39-7,14)^a 1,98 (1,16-3,37)^b
<i>11</i>	31 (34,8)	19 (15,0)	0,000^a 0,980 ^b	4,35 (2,56-7,40)^a 0,99 (0,56-1,74) ^b
<i>61</i>	0 (0)	0 (0)	0,594 ^a 0,341 ^b	0,83 (0,78-0,86) ^a 0,75 (0,71-0,79) ^b
<i>Genotipos de probable alto riesgo oncogénico u oncogenicidad desconocida</i>				
<i>66</i>	1 (1,1)	5 (3,9)	0,202 ^a 1,000 ^b	0,240 (0,031-1,866) ^a 1,096 (0,359-3,349) ^b
<i>70</i>	1 (1,1)	4 (3,1)	0,308 ^a 1,000 ^b	0,286 (0,036-2,252) ^a 0,982 (0,289-3,332) ^b

Fuente: Modelo de recogida de información, resultados de la investigación de laboratorio y de la citología cervical.
a: con respecto a NIC I, **b:** con respecto a NIC II / III.

Tabla 7. Grupos de genotipos de PVH y resultado de la citología cervicouterina en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis univariado.

Grupos n=216	NIC I n (%)	NIC II/III n (%)	Valor de p	RP (IC 95%)
	89 (41,2)	127 (58,8)		
Grupo 1 Alto Riesgo	63 (70,8)	101 (79,5)	0,000^a 0,000^b	2,42 (1,48-3,97)^a 4,71 (2,93-7,58)^b
Grupo 2 Bajo Riesgo	35 (39,3)	28 (22,0)	0,000^a 0,294 ^b	3,77 (2,28-6,24)^a 1,30 (0,79-2,13) ^b
Grupo 3 Probable Alto Riesgo	3 (3,4)	10 (7,9)	0,204 ^a 0,421 ^b	0,46 (0,13-1,55) ^a 1,37 (0,63-2,96) ^b
Grupo de Infección Múltiple	35 (39,3)	55 (43,3)	0,031^a 0,000^b	1,69 (1,05-2,72)^a 2,26 (1,48-3,43)^b

Fuente: Modelo de recogida de información, resultados de la investigación de laboratorio y de la citología cervical.
a: con respecto a NIC I, b: con respecto a NIC II / III.

IV.1.3 Variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas asociadas con la infección por PVH en población femenina entre 15 y 59 años

El análisis de las variables asociadas a la infección por PVH y al desarrollo de lesiones citológicas, son específicas en cada país y en cada grupo de riesgo. Entre las variables que se han estudiado más comúnmente se encuentran los factores culturales, socioeconómicos, étnicos y conductuales (188).

Tabla 8. Datos sociodemográficos y presencia de infección por Papilomavirus humanos en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis Univariado.

Variable	Positivo a PVH n (%)	Valor de p	RP (IC 95%)
Pacientes	344 (100)		
Edad, mediana en años (Cuartil)	34 (27,0-42,0)		0,014
Rangos			
15-20	33 (9,6)		2,17 (1,02-4,62)
21-30	108 (31,4)		2,11 (1,29-3,47)
31-40	116 (33,7)		1,31 (0,84-2,05)
>40	87 (25,3)		Referencia
Nivel de escolaridad		0,025	
Primaria y Secundaria Básica	109 (31,7)		2,15 (1,27-3,65)
Preuniversitario y Técnico Medio	89 (50,9)		1,50 (0,95-2,38)
Universitario	47 (26,9)		Referencia
Situación Laboral		0,012	
Profesional	50 (14,5)		Referencia
Otras	294 (85,5)		1,80 (1,14-2,85)
Estado Civil		0,040	
Casada	225 (65,4)		Referencia
Divorciada, Soltera o Viuda	119 (34,6)		1,53 (1,02-2,29)
Consumo de cigarrillos		0,000	
Sí	218 (63,4)		4,21 (2,84-6,23)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

En la Tabla 8 se observa que existe mayor probabilidad de infección por PVH en aquellas mujeres menores de 30 años (RP=2,11) y aún mayor en las que tenían entre 15 y 20 (RP=2,17), con un nivel de escolaridad por debajo del nivel medio, no profesionales, sin pareja estable y consumidoras de cigarrillos. Los resultados del presente trabajo concuerdan con los datos obtenidos en población brasileña (172, 173) y africana (179) en los que la frecuencia de infección viral es elevada, similar a la detectada en la presente investigación.

Se ha demostrado que la edad (menores de 25 años), la situación laboral inestable o el desempleo, el nivel de escolaridad por debajo del nivel medio, el cambio frecuente de parejas sexuales, el inicio de las relaciones sexuales a edades tempranas (52), el hábito de fumar y el uso de anticonceptivos orales (181), son variables que se asocian a la presencia de infección por PVH y al desarrollo de lesiones cervicouterinas.

La mayoría de las investigaciones realizadas en la población cubana no emplean técnicas moleculares para la identificación viral, por lo que las frecuencias de infección detectadas no son comparables con el presente estudio. Sin embargo, sí existe coincidencia con respecto a muchas de las variables asociadas a la presencia de infección. Un estudio publicado por Rodríguez González y cols. en el 2014, a partir del análisis de citologías y biopsias cervicales de 342 mujeres del municipio Cotorro, mostró que entre las variables estudiadas, la edad (menos de 30 años) y el número elevado de parejas sexuales (>5) estuvieron asociadas a la infección por PVH (175). Otros estudios realizados en diferentes provincias de Cuba a partir del análisis de las citologías y las biopsias cervicales, identifican como variables asociadas a la infección por PVH, el cambio frecuente de parejas sexuales, la leucorrea, la multiparidad y los antecedentes de patologías cervicales en algún momento de la vida (189-191).

El consumo de cigarrillos se ha relacionado con una mayor carga viral de PVH-AR (192). El humo contiene carcinógenos importantes como el Benzopireno, que se detecta en el moco cervical y también puede interactuar con el PVH. La exposición de las células del cuello uterino a altas concentraciones de esta sustancia puede aumentar varias veces la carga viral de PVH y la morfogénesis del virión. En general, se plantea que el Benzopireno puede modular el ciclo de vida del PVH y potenciar la persistencia viral, la carcinogénesis y la permisividad para la progresión del cáncer (193).

Existen otros factores que también se asocian con la presencia de infección por PVH (Tablas 9 y 10), entre los que se reportan, la historia ginecobstétrica y los antecedentes de patologías ginecológicas. En el presente trabajo el cambio frecuente de parejas sexuales y el uso de anticonceptivos orales, se asociaron a un incremento en la prevalencia de la infección por PVH. Asimismo, los antecedentes de patologías cervicales en algún momento de la vida, se asociaron a mayores frecuencias de infección viral.

Tabla 9. Historia ginecobstétrica e infección por Papilomavirus humanos en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis Univariado.

<i>Variable</i>		<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>RP (IC 95%)</i>
<i>Pacientes</i>		344 (100)		
<i>Edad de la menarquía</i>			0,382	
	<10	25 (7,3)		0,64 (0,28-1,45)
	10-14	282 (82,0)		0,99 (0,55-1,81)
	>14	37 (10,8)		Referencia
<i>Edad de las primeras relaciones sexuales</i>			0,246	
	<15	21 (6,1)		1,60 (0,65-3,99)
	15-20	289 (84,0)		1,59 (0,92-2,75)
	21-30	34 (9,9)		Referencia
<i>Ciclos menstruales irregulares</i>	Sí	60 (17,4)	0,562	1,16 (0,71-1,90)
<i>Menopausia</i>	Sí	47 (13,7)	0,596	1,16 (0,67-2,01)
<i>Metrorragia</i>	Sí	15 (4,4)	0,496	1,16 (0,67-2,01)
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>			0,001	
	≤2	304 (88,4)		Referencia
	>2	40 (11,6)		4,47 (1,73-11,55)
<i>Uso del condón</i>	No	497 (95,8)	0,513	0,73 (0,28-1,89)
<i>Uso de anticonceptivos orales (años)</i>			0,000	
	≤5	295 (85,8)		Referencia
	>5	49 (14,2)		14,37 (3,46-59,82)
<i>Partos</i>			0,377	
	0	68 (19,8)		Referencia
	≥1	276 (80,2)		0,80 (0,50-1,30)
<i>Leucorrea</i>	Sí	95 (27,6)	0,467	1,89 (0,62-2,95)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

Tabla 10. Antecedentes ginecológicos patológicos e infección por Papilomavirus humanos en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis Univariado

<i>Variable</i>		<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>RP IC (95%)</i>
<i>Pacientes</i>		344 (100)	-	-
<i>Antecedentes de alguna cirugía cervical</i>	Sí	48 (14,0)	0,005	2,68 (1,32-5,43)
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Sí	141 (41,3)	0,000	3,54 (2,25-5,57)
<i>Antecedentes de colposcopia positiva</i>	Sí	149 (43,4)	0,000	5,92 (3,55-9,88)
<i>Antecedentes de ITS</i>	Sí	194 (56,4)	0,198	0,78 (0,54-1,14)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

Se han publicado meta-análisis (194) donde se establece la asociación entre la infección por PVH y el uso de anticonceptivos orales por períodos prolongados de tiempo. Estos resultados, apoyan varias teorías relacionadas con los efectos carcinogénicos directos del estrógeno y la progesterona por ejercer una regulación positiva sobre la expresión de los oncogenes virales y la capacidad de los estrógenos para promover el crecimiento de tumores y la persistencia viral (195).

En este estudio, los antecedentes de citología o colposcopia positiva y de cirugías cervicales en algún momento de la vida, constituyeron variables asociadas a la infección viral. Aunque las mujeres incluidas en esta investigación tenían una citología negativa, en los 2 años previos, es evidente la posibilidad de reinfecciones virales, aspecto que se relaciona con una conducta sexual de alto riesgo para contraer infecciones de transmisión sexual. Tal es el caso del cambio frecuente de parejas sexuales que se mencionó anteriormente como una variable asociada a la presencia de infección por PVH.

IV.1.4 Variables predictivas para la infección con genotipos de PVH de alto riesgo oncogénico y para el desarrollo de las lesiones cervicales de alto grado en población femenina, entre 15 y 59 años

Para definir las variables predictivas de la infección con genotipos de alto riesgo oncogénico (Tabla 11) se compararon las mujeres infectadas con dichos genotipos, con respecto a las negativas y a las infectadas por otros genotipos de PVH (total 453 mujeres). En el caso de las variables predictivas para las lesiones de alto grado (NIC II/III) se analizaron las 344 mujeres positivas a PVH (Tabla 12).

Tabla 11. Variables predictivas de la infección por Papilomavirus humanos de alto riesgo oncogénico en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis multivariado

<i>Variable</i> <i>n=453</i>		<i>Valor de p</i>	<i>RP ajustada (IC 95%)</i>
<i>Edad</i>		0,000	
	15-20	Referencia	
	21-30	0,000	13,15 (3,48-49,61)
	31-40	0,038	3,83 (1,08-13,62)
	>40	0,401	1,67 (0,51-5,50)
<i>Primera relación sexual</i>		0,007	
	<15	0,004	6,11 (1,78-21,01)
	15-20	0,008	2,80 (1,30-6,02)
	21-30	Referencia	
<i>Uso de Anticonceptivos orales por más de 5 años</i>	Sí	0,013	7,54 (1,53-37,09)
<i>Menarquía</i>		0,040	
	<10	0,629	1,33 (0,41-4,22)
	10-14	0,025	2,76 (1,14-6,71)
	>14	Referencia	
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Sí	0,000	4,64 (2,50-8,62)
<i>Consumo de cigarrillos</i>	Sí	0,000	38,84 (16,46-91,62)
<i>Antecedentes de colposcopia positiva</i>	Sí	0,000	4,38 (1,98-9,72)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

Como se observa en la Tabla 11, el grupo de mujeres entre 21 y 30 años, presentaron la mayor prevalencia de infección con genotipos oncogénicos. El inicio de las relaciones sexuales antes de los 15 años, la primera menstruación entre los 10 y 14 años, el consumo de anticonceptivos orales por más de cinco años, el consumo de cigarrillos y los antecedentes de alteraciones citológicas también representaron variables predictivas para la infección con estos genotipos. La infección por PVH-AR se comporta de manera similar a lo que se ha descrito

en la literatura (108, 194). Las investigaciones sobre este tema destacan que los factores descritos anteriormente se asocian a las infecciones persistentes con genotipos oncogénicos, de las cuales, un 75% progresa a lesiones precursoras o a CC (108).

Las variables predictivas para la infección por PVH-AR, que se reportan en este trabajo, también se reportan en mujeres de diferentes orígenes geográficos. Estos hallazgos se demostraron por Vinodhini y cols. en el año 2012 mediante la compilación de 280 estudios en mujeres de diferentes continentes (194).

Confortini y cols. en el 2010 (196), realizaron una investigación en Italia donde incluyeron mujeres jóvenes, entre 18 y 24 años. Encontraron una alta prevalencia de infección por PVH, fundamentalmente de alto riesgo oncogénico. Las jóvenes fueron seguidas por un período de tres años y casi un 30% evolucionó hacia alguna lesión citológica. Este estudio demuestra la importancia de la detección de PVH-AR en mujeres jóvenes, y justifica la aplicación de la vacunación en edades tempranas. Se han obtenido resultados similares a partir de investigaciones realizadas en países tanto europeos (197), africanos (198) como latinoamericanos (180). Los datos obtenidos en diferentes latitudes demuestran que las conductas sexuales de riesgo y el inicio cada vez más temprano de las relaciones sexuales conllevan a la introducción de medidas de prevención más eficaces.

En esta investigación, se determinaron también como variables predictivas de la infección por PVH-AR, el uso de anticonceptivos orales por un período mayor de cinco años, el consumo de cigarrillos y los antecedentes de citologías y colposcopia positivas. Se han publicado numerosos estudios, incluso compilaciones de datos a escala global (194), donde se detecta un riesgo incrementado para adquirir la infección por PVH-AR y CC en las mujeres que usan anticonceptivos orales por períodos prolongados. Tales teorías se sustentan, como se ha dicho anteriormente, en los efectos carcinogénicos del estrógeno y la progesterona y en su capacidad para promover la persistencia viral (195, 199). El consumo de cigarrillos, como se discutió anteriormente, se relaciona con los valores elevados de la carga viral de PVH y aumenta el riesgo de progresión al cáncer cervicouterino (193).

Los antecedentes de citología y colposcopia positivas constituyeron variables predictivas de la infección con PVH-AR. Estas técnicas identifican los signos de la enfermedad, sin embargo, las mujeres incluidas en esta investigación no tenían citologías positivas, en un período de dos años previos a la toma de las muestras.

Existen evidencias de la relación directa entre los resultados de la citología y la colposcopia, tanto para lesiones de bajo grado como de alto grado (200). No obstante, el análisis de los resultados de la colposcopia es controversial en la literatura. Algunos investigadores consideran que este es un método muy sensible para la identificación de las infecciones por PVH-AR, de acuerdo a las características de las lesiones que provocan en la zona de transformación escamo-columnar (201). Sin embargo, otras investigaciones evidencian que si bien el

patrón colposcópico y el tamaño de la lesión no constituyen elementos que indiquen progresión, el incremento en la gravedad del patrón colposcópico en el tiempo, puede considerarse un indicador del incremento de la malignidad (202, 203).

En muchas regiones del planeta se ha analizado la edad a la que se detectan las infecciones virales, las lesiones de alto grado y el CC. Esta variable define la aplicación y el cronograma de los programas de pesquisa, prevención y control, establecidos por los ministerios de salud. El consenso general establece que existe un pico de prevalencia de la infección por PVH, posterior a las primeras exposiciones al virus durante el inicio de las relaciones sexuales. Como la gran parte de estas infecciones son transitorias, en un segundo momento se produce un decremento de la prevalencia, precedido por otro pico de prevalencia en la etapa perimenopáusicas. Solo las infecciones persistentes perduran en el tiempo, así que a partir de los 30 años se produce un incremento, casi exponencial, en la incidencia de las lesiones precursoras del CC precedido por una etapa de meseta. De ahí que los programas de pesquisa comiencen generalmente a partir de los 20 o 25 años (107, 108).

Como se observa en la Tabla 12, en la población estudiada, las lesiones de alto grado aparecen de manera significativa antes de los 30 años y principalmente antes de los 20 años. Estos resultados no se corresponden con lo que se ha descrito en la gran parte de los meta-análisis (108).

Tabla 12. Variables predictivas para las lesiones de alto grado en mujeres entre 15 y 59 años. Análisis multivariado.

<i>Variable n=344</i>		<i>Valor de p</i>	<i>RP ajustada (IC 95%)</i>
<i>Edad</i>		0,000	
	15-20	0,000	41,41 (16,49-104,02)
	21-30	0,000	16,48 (5,10-53,27)
	31-40	0,000	8,62 (4,03-18,63)
	>40	Referencia	
<i>Partos</i>	≥1	0,000	4,65 (2,02-10,71)
<i>Leucorrea</i>	Sí	0,004	2,64 (1,35-1,15)
<i>Consumo de cigarrillos</i>	Sí	0,000	8,44 (4,59-15,51)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

Las mujeres menores de 20 años no están incluidas en el universo del Programa de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello del Útero en Cuba (8), que comienza la pesquisa a partir de los 25 años.

Se conoce que aproximadamente entre un 80% y un 90% de las lesiones pueden ser resueltas por el sistema inmune en las mujeres jóvenes, pero resulta esencial conocer la prevalencia de los genotipos oncogénicos que desarrollan las infecciones persistentes. Estas infecciones son las que pueden conllevar a las lesiones de alto grado antes de los 25 años, que es donde ocurre la intervención del programa nacional de prevención del CC en Cuba.

En adolescentes cubanas se han realizado algunos estudios para identificar, mediante análisis citológicos, histológicos y colposcópicos, tanto lesiones cervicales como signos de infección por PVH. En estudios realizados por Tamayo Lien y cols. (204) en La Habana y por Puente Perpiñán y colaboradores (205) en Santiago de Cuba, se demostró que entre los factores de riesgo asociados con la infección por PVH, se encontró el inicio de las relaciones sexuales desprotegidas antes de los 16 años y tener dos o más parejas sexuales en los últimos 6 meses. La identificación de signos clínicos de infección viral tuvo una mayor incidencia en las pacientes de 18 a 20 años. Aunque en estos estudios no se identificaron los genotipos virales por técnicas moleculares, ni aparecieron lesiones de alto grado, sí se observó la presencia de lesiones de bajo grado. Sin embargo, en una investigación realizada por Montané Céspedes (206) en el municipio Boyeros durante el período 2004-2006 a 297 mujeres con más de 15 años de edad, se detectaron lesiones de alto grado y CIS en las mujeres menores de 25 años.

Es importante el análisis de estos hallazgos para profundizar en el estudio de estos grupos etarios. Sería oportuno realizar un estudio mucho más amplio en mujeres jóvenes, particularmente con edades entre 15 y 25 años, para definir la presencia de genotipos oncogénicos de PVH, las infecciones virales persistentes y cómo se comporta este fenómeno en la población femenina cubana entre estas edades.

En el presente estudio, la leucorrea resultó otra variable predictora para el desarrollo de las lesiones de alto grado. Este síntoma se considera, por varios autores, como un hallazgo ginecológico, asociado a la progresión de las lesiones intraepiteliales cervicales (207). La leucorrea puede deberse a los cambios que van ocurriendo en las células del epitelio cervical, debido tanto a la infección viral *per se*, como a los cambios morfológicos asociados a la transformación celular (207).

Otra variable predictora para el desarrollo de lesiones de alto grado fue el consumo de cigarrillos, que ya se discutió previamente, por ser uno de los agentes carcinogénicos más potentes; que se asocia con la aparición de las lesiones malignas y potencia el desarrollo de las mismas (208).

Finalmente, se identificó el número de partos como un factor para la aparición de alteraciones premalignas. Desde 1986 ya se había descrito, este factor de riesgo asociado con el desarrollo del CC, en la población cubana (209). Este mismo fenómeno se estudió en Estados Unidos (210) e Inglaterra (211) y también resultó un factor de riesgo para la aparición y el desarrollo de las lesiones precursoras del CC en poblaciones similares.

Durante el siglo XIX, los resultados obtenidos en varios estudios indican que los eventos reproductivos han estado involucrados en el desarrollo del CC. La infección por PVH es un requisito previo para el desarrollo de este tipo de cáncer, pero varios cofactores, entre ellos la acción de las hormonas esteroideas sexuales, pudieran ser desencadenantes en este proceso (212).

Es esencial la información sobre los genotipos de PVH circulantes en mujeres sexualmente activas, entre 15 y 59 años, pues abarca un amplio rango de edades. Esta investigación, realizada en mujeres entre estos grupos etarios, residentes en cuatro municipios de La Habana, permitió identificar la frecuencia de infección y los genotipos de PVH circulantes en mayor proporción, así como su asociación con los resultados de la citología cervical. Además, permitió identificar las variables predictoras para la infección viral y para el desarrollo de las lesiones precursoras del CC en esta población.

Estos resultados también promueven el desarrollo de investigaciones en otros grupos de riesgo, como es el caso de las mujeres donde las infecciones persistentes con genotipos oncogénicos de PVH, conducen a la aparición de las lesiones precursoras y CC con una frecuencia más elevada. Este es el caso de las mujeres mayores de 30 años, principalmente las que presentan antecedentes de citologías positivas.

IV.2 Frecuencia de genotipos de PVH, carga viral y factores de riesgo asociados con la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, bajo grado y cáncer en mujeres mayores de 30 años

En este estudio se utilizaron dos métodos combinados que se realizaron en paralelo a todas las muestras clínicas para identificar la frecuencia de infección por PVH y lograr el genotipado: la RCP-TR implementada en el Laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK y un protocolo de secuenciación nucleotídica. El segundo método se realizó a partir de fragmentos de ADN amplificados de mediante RCP cualitativa para la detección de los genotipos de PVH que no están incluidos en la RCP-TR y completar la tipificación viral.

IV.2.1 Implementación de la RCP-TR para la detección de PVH. Confección de las curvas estándares

Para la implementación de la RCP-TR se diseñaron y obtuvieron dos curvas estándares: una para PVH 16, donde se utilizó ADN_g de la línea celular SiHa y una para PVH 18, en la que se empleó ADN_g de la línea celular HeLa (Figuras 6 y 7).

Las curvas estándares mostraron una buena correlación lineal ($r=0,99$) con valores bajos de error a lo largo de cinco y seis magnitudes de concentración de ADN_g diana para PVH 16 y 18, respectivamente. Con esto se demuestra la confiabilidad de los dos ADN_g estándares obtenidos y su utilidad para emplearse en la cuantificación de PVH en diferentes muestras clínicas.

Cuando se evaluó el límite inferior de detección del sistema de RCP-TR normalizado, se detectaron hasta 10 copias de PVH 16 y PVH 18 en las tres réplicas de esta dilución. La RCP-TR implementada fue específica entre los diferentes genotipos de PVH, pues no se obtuvieron amplificaciones para otros genotipos que no coincidieran con los que se habían identificado mediante RCP cualitativa y la secuenciación nucleotídica.

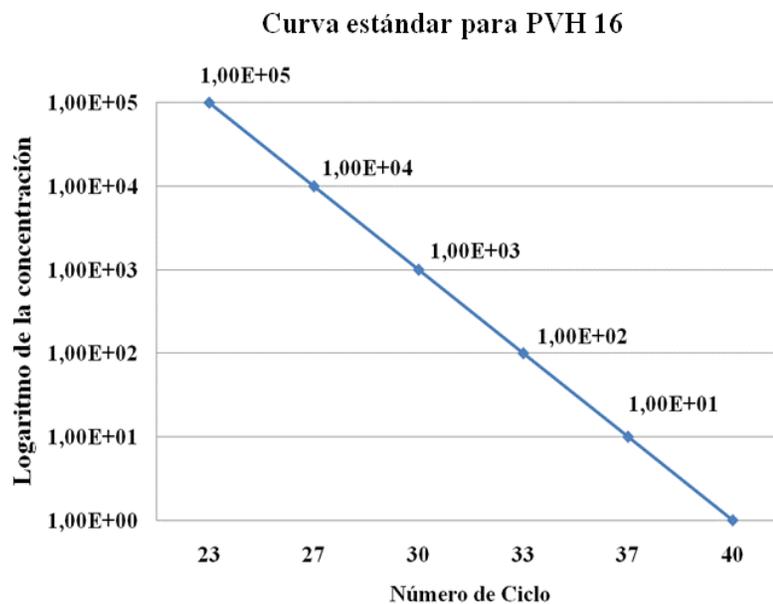


Figura 6. Curva estándar construida para PVH 16 a partir del ADN genómico de la línea celular SiHa donde se estableció un límite de detección de 10 copias en la dilución mínima.

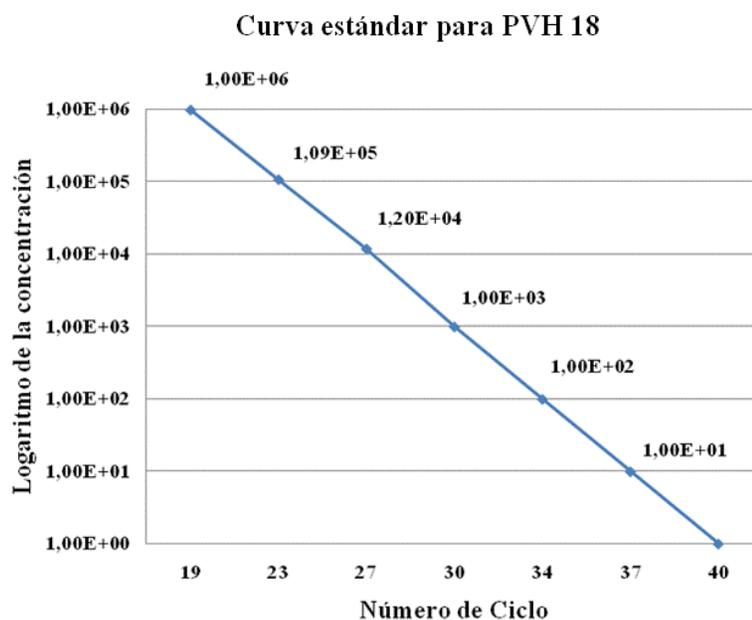


Figura 7. Curva estándar construida para PVH 18 a partir del ADN genómico de la línea celular HeLa donde se estableció un límite de detección de 10 copias en la dilución mínima.

Este método no mostró reactividad cruzada para PVH 16 y 18 entre las dos líneas celulares empleadas. Además, también fue específica pues no se detectó un incremento por encima del umbral de fluorescencia cuando se analizó frente a otros agentes virales no relacionados genéticamente.

En la presente investigación, la curva estándar obtenida para PVH 16 se utilizó para cuantificar los genotipos relacionados genéticamente como PVH 31, 33 y 58.

Por otra parte, la curva estándar de PVH 18 se extrapoló para cuantificar la carga viral de PVH 45, por la estrecha relación filogenética entre ambos genotipos. Aunque muchos autores plantean la necesidad de confeccionar curvas estándares para cada genotipo (168, 213), en algunas investigaciones se utilizan, con buenos resultados, las curvas de PVH 16 y 18 para cuantificar los genotipos relacionados filogenéticamente por la similitud de sus secuencias nucleotídicas (162).

Uno de los pasos fundamentales para lograr la puesta en marcha de la RCP-TR es la obtención de los productos estándares. Hasta el momento no se cuenta con ADN estándares universales que permitan normalizar este sistema. Es por ello que la inmensa mayoría de los ensayos que se han diseñado, se implementan en los laboratorios de diagnóstico con estándares producidos en ellos y se les reconoce en la literatura como RCP-TR caseros (214). De esta forma, los dos productos que se obtuvieron, representan una importante fuente reproducible de ADN estándar para la puesta en marcha de la RCP-TR en el laboratorio de ITS del IPK, en Cuba.

Al comparar los diferentes parámetros de las curvas estándares construidas, con los obtenidos por los autores del protocolo original (162) se encontró que los valores relacionados con la eficiencia de la reacción y el coeficiente de regresión alcanzados en este trabajo se encuentran dentro de los valores aceptables, teniendo en cuenta que se modificaron varios marcajes en las sondas y se introdujeron variaciones en la plataforma empleada. Se han publicado diversos métodos de RCP-TR en los que se normaliza el sistema para la detección y cuantificación de diferentes genotipos de PVH (168). Recientemente se reportó un estudio donde los límites mínimos de detección oscilan desde 44 hasta 700 copias para 15 genotipos de PVH-AR y cinco genotipos de PVH-BR, con la limitante de que este método solo discrimina en dos grupos de PVH de alto o bajo riesgo (213). En otro estudio para la detección y cuantificación de PVH 6, 11, 16 y 18 sí fue posible discriminar entre genotipos, aunque el límite mínimo de detección fue de 100 copias (168). En el presente estudio, las curvas estándares para PVH 16 y PVH 18, permitieron detectar un número mínimo de 10 copias de ADN de secuencias diana, para ambos genotipos.

La utilidad de las curvas estándares y del sistema de detección viral implementado para cuantificar PVH 16, 18, 31, 33, 45 y 58 se comprobó en las 40 muestras clínicas conocidas, previamente genotipadas por secuenciación nucleotídica, donde hubo una coincidencia del 100% en los genotipos identificados por ambos métodos.

IV.2.2 Aplicación de la RCP-TR a las muestras clínicas

Al aplicar esta metodología a las 322 muestras, se obtuvo un 69,8% de positividad (225/322) por este método que detecta seis de los genotipos de mayor relevancia clínica a nivel mundial (PVH 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58). Se pudo cuantificar la carga viral de todas las muestras clínicas positivas a PVH. Este aspecto será analizado más adelante.

La RCP cualitativa con cebadores degenerados ha constituido el sistema de referencia para la detección de PVH durante varias décadas. Esta técnica comúnmente se combina con diversos métodos de hibridación de los productos amplificados para lograr el genotipado, por lo que el procedimiento resulta laborioso y relativamente largo, aunque se consideran con un alto nivel de reproducibilidad y elevada sensibilidad (168). Sin embargo, los ensayos de RCP-TR son rápidos, sensibles y mucho menos laboriosos, además de que permiten no solo el genotipado, sino también la cuantificación de la carga viral. Un aspecto que limita el uso de la RCP-TR en su modalidad de ensayo múltiple es el hecho de que no resultan muy eficientes en la detección de coinfecciones con más de tres genotipos, pues los estudios inter-laboratorios reflejan estas diferencias (215). Este inconveniente se soluciona al diseñar ensayos múltiples, donde no se detecten más de tres genotipos en una misma mezcla de reacción, como se refiere en el protocolo original en el que se sustenta la presente investigación (162).

IV.2.3 Secuenciación nucleotídica y análisis filogenético

Los resultados obtenidos mediante el análisis filogenético de las secuencias de PVH a partir de las muestras clínicas (Figura 8), coincidieron con los resultados obtenidos por la RCP-TR implementada en todos los casos. Mediante la secuenciación nucleotídica se obtuvieron, por primera vez, secuencias de PVH a partir de muestras de origen cubano (números de acceso del KC991237 al KC991292) que se publicaron en la base de datos para genes GenBank ([www//ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Esta metodología permitió identificar los genotipos mayoritarios en un 30% de los casos analizados (97/322). Además, permitió tipificar gran parte de las muestras que no se detectaron mediante la RCP-TR implementada, así como confirmar otras por ambos métodos.

En algunos estudios que emplean la secuenciación nucleotídica para la tipificación de PVH se demuestra que el uso de esta metodología por sí sola, no constituye una técnica apropiada para este fin, porque no detecta infecciones múltiples y solo identifica adecuadamente los genotipos mayoritarios. Se sugiere combinarla o utilizarla como un complemento, en algoritmos diagnósticos o en estudios poblacionales. Se han realizado estudios comparativos entre la secuenciación nucleotídica y la RCP tipo-específica y se ha podido demostrar una serie de ventajas con el uso de ambas técnicas combinadas, lo que resulta una mejor estrategia (123, 216).

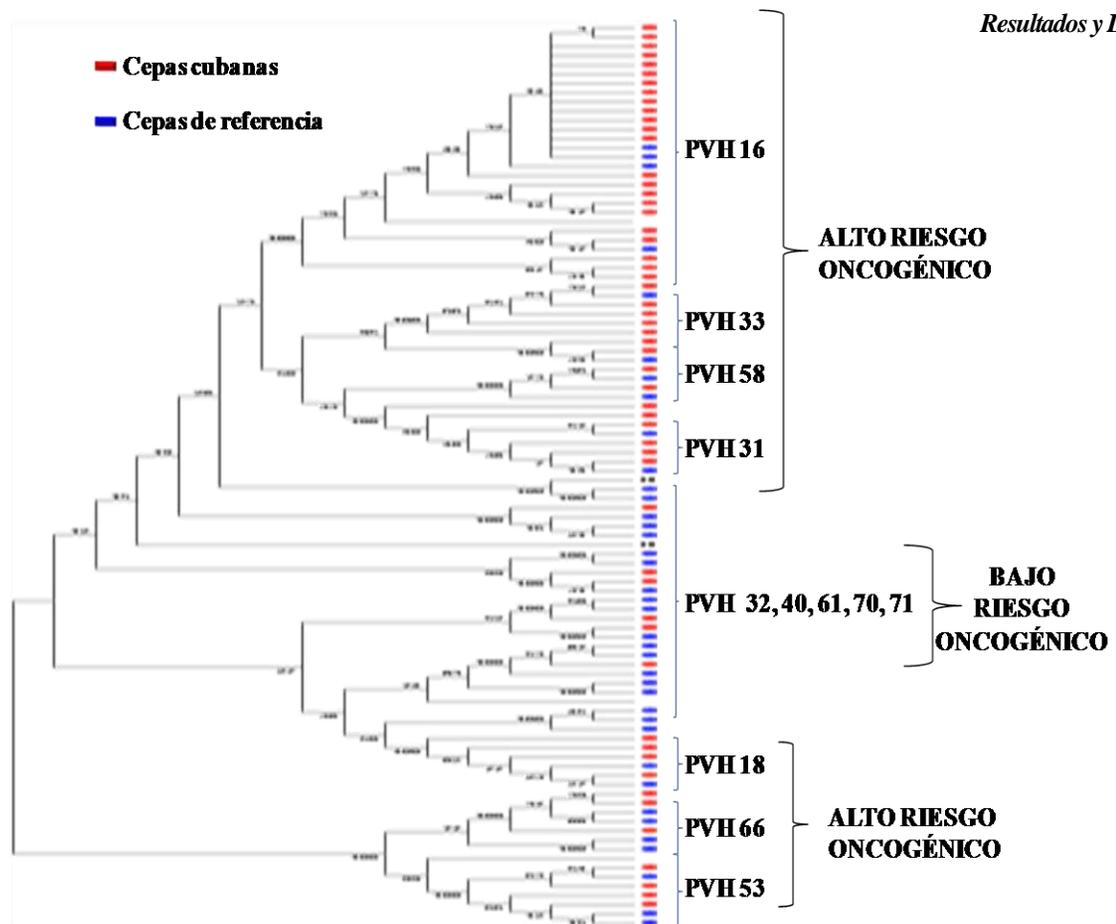


Figura 8. Árbol filogenético obtenido a partir de 54 secuencias nucleotídicas de la región V III del gen L1 de Papilomavirus humanos obtenidas de muestras cubanas.

IV.2.4 Frecuencia de infección por PVH en mujeres mayores de 30 años. Relación con el resultado de la citología confirmatoria

Empleando ambos métodos: RCP-TR y secuenciación nucleotídica, se obtuvo una positividad a PVH del 76,1% (245/322) y se identificaron 34 genotipos diferentes con un predominio de genotipos de alto riesgo oncológico. La infección viral se detectó en 94,3% (199/211) de las mujeres con citología positiva confirmada y en 41,4% (46/111) de los casos negativos (Figura 9) con diferencias altamente significativas entre los dos grupos. Los resultados mostraron una probabilidad 23 veces mayor de que las mujeres con citología positiva estuvieran infectadas con PVH ($p=0,0000$; $OR=23,43$ IC 95% 11,70-46,92).

El CC es la segunda causa de tumores malignos en el sexo femenino en todo el mundo y representa un problema de salud en algunos países de África como Zimbabue y Tanzania. También en América Latina, principalmente en Nicaragua y El Salvador (217, 218). Las tasas de incidencia máximas para estos dos

continentes oscilan desde 20 hasta 41,7 por 100,000. En el caso de países como Haití, Brasil, Ecuador y México las tasas de mortalidad más altas promedian 12 por 100,000 (217).

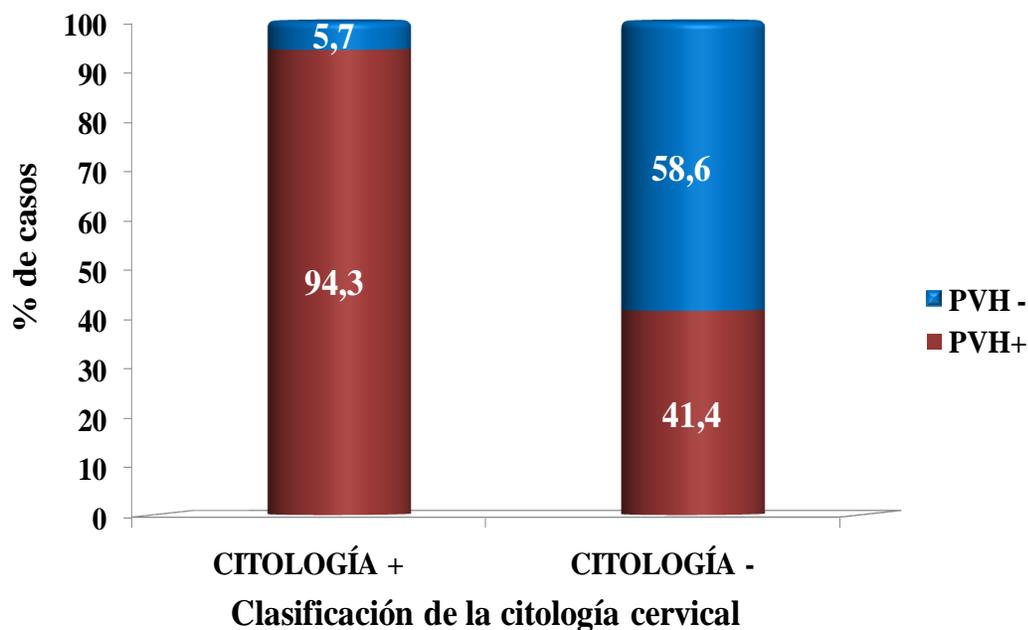


Figura 9. Relación entre la clasificación citológica y la infección por PVH en mujeres mayores de 30 años.

Aunque las frecuencias de infección por PVH como causantes del CC varían según las áreas geográficas y dependiendo de las características individuales de cada población, los resultados del presente trabajo son similares a los encontrados en poblaciones brasileñas y africanas. También son semejantes a los que se publican en algunos estudios realizados en poblaciones argentinas donde las frecuencias de infección por PVH que se observan en las lesiones de alto grado y en el CC sobrepasan un 90% (171, 174, 219).

En la Figura 10 pueden observarse las frecuencias de infección por PVH, según el tipo de lesión citológica. El porcentaje de infección por PVH, en los casos con lesiones de bajo grado, fue de 77,6%, mientras que en las citologías negativas la positividad fue de un 41,4%. Los valores obtenidos resultan elevados, según lo que se plantea en la literatura (8, 161, 220), donde la frecuencia de infección por PVH para las citologías negativas por lo general no sobrepasa un 20% y para las lesiones de bajo grado no supera un 50%. Este hallazgo pudiera tener varias explicaciones, entre ellas el hecho de que todas las citologías eran positivas antes de la confirmatoria y hay discordancia entre ambos resultados. Otro aspecto es que la elevada frecuencia de infección no se ajusta a los valores reportados y esté asociada a determinadas conductas sexuales de riesgo en esta población. Esto

también pudiera deberse al hecho de que en la clasificación citológica que se emplea en Cuba no se incluyen las citologías atípicas.

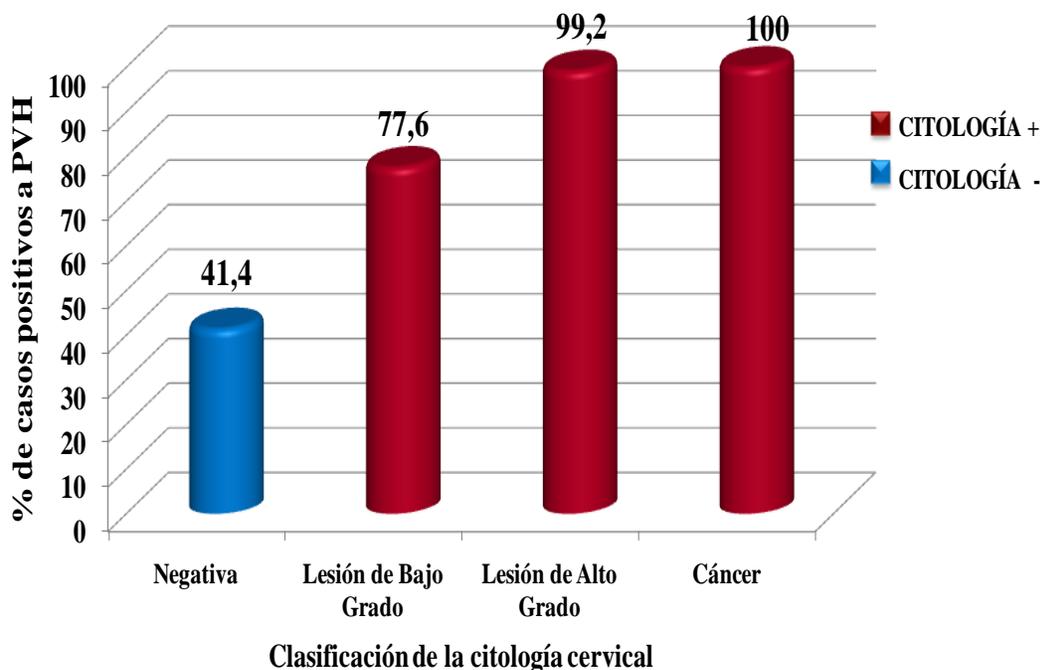


Figura 10. Frecuencias de infección por PVH en mujeres mayores de 30 años, según el tipo de lesión citológica.

Aunque este trabajo no tiene las evidencias de que las citologías atípicas hayan sido incluidas dentro de otras clasificaciones citológicas, los porcentajes de infección por PVH detectados por las técnicas moleculares empleadas conducen a hacer algunas reflexiones relacionadas con el sistema de clasificación.

En este estudio se hizo una reclasificación y se adoptó parcialmente el Sistema de Clasificación de Bethesda (161) que cataloga las NIC I como lesiones de bajo grado y las NIC II y III como lesiones de alto grado. Sin embargo, no se pudo incluir la clasificación de las citologías atípicas pues no se utiliza por los patólogos cubanos, al no estar concebida dentro del Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero (8). Según este programa, la presencia de coilocitos o disqueratosis en las citologías, ya son hallazgos suficientes para clasificarlas como NIC I. Aunque las atipias citológicas no deben informarse como negativas, pudiera inferirse que no se clasifican en una categoría independiente, posiblemente se incluyeron dentro de las negativas, cuando las alteraciones son mínimas o dentro de las NIC I, cuando los cambios citológicos son aparentemente compatibles con estos casos. Sin embargo, en este estudio, este elemento es solo un hallazgo que debe ser estudiado con mayor profundidad en futuras investigaciones, pues según la literatura en las citologías atípicas la frecuencia de infección por PVH es aproximadamente del 40%, mayoritariamente son casos con

infecciones persistentes por PVH-AR que pueden evolucionar a la malignidad en un período no mayor de 3 años (221).

IV.2.5 Genotipos de PVH más frecuentes en mujeres mayores de 30 años y su asociación con el grado de las lesiones citológicas

En la Figura 11 aparecen las frecuencias porcentuales de infección para cada genotipo de PVH en la población estudiada. Se detectó un predominio de los genotipos oncogénicos, ya que un 73,9% de la población (238/322) estuvo infectada con estos virus (Grupo 1). Se identificaron 34 genotipos diferentes y los más frecuentes fueron los tipos de PVH 16, 18, 31, 58 y 45. Las infecciones múltiples se detectaron en 27,6% de los casos positivos a PVH (89/322) y los genotipos de bajo riesgo oncogénico constituyeron una minoría con un 7,8% de positividad (25/322). De los casos positivos a PVH, un 97,1% (238/245) tuvo infección con, al menos, un genotipo de alto riesgo oncogénico.

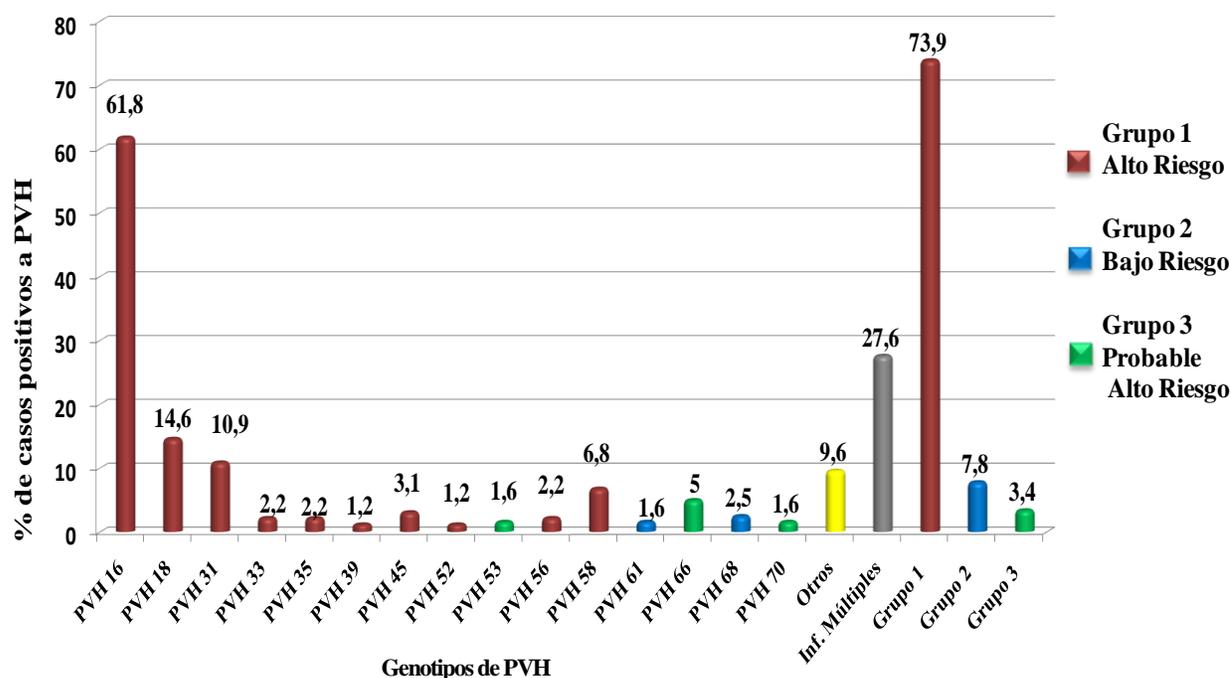


Figura 11. Genotipos de PVH identificados en mujeres mayores de 30 años.

Los cinco genotipos más frecuentes en esta población fueron oncogénicos y los que predominaron fueron PVH 16 y 18, los cuales se incluyen en todas las formulaciones vacunales contra PVH que están disponibles en el mercado internacional. Los otros genotipos identificados más frecuentemente están incluidos en la formulación vacunal más reciente contra PVH aprobada por la FDA (135-137). En diferentes regiones geográficas, los estudios poblacionales identifican estos genotipos como los más frecuentes en mujeres mayores de 30 años. Tal es el caso

de los estudios publicados en países de África y América Latina como Haití, Zimbabue, Bolivia, Ecuador, Nicaragua y México (80, 222, 223). Investigaciones realizadas por científicos mexicanos demostraron la circulación de los genotipos oncogénicos de PVH en un 80% de las lesiones de cuello uterino con colposcopia positiva y detectaron el genoma de PVH 16 en un 50% de los carcinomas cervicales, analizados en la población de ese país (80, 222). En Argentina (223), los valores de prevalencia obtenidos para PVH 16 demuestran el papel causal de este agente en el desarrollo del CC. Los genotipos de PVH 16, 18, 58, 33 y otros genotipos de alto riesgo oncogénico tienen una alta incidencia entre las mujeres con lesiones cervicales de alto grado y CC en Tailandia. Por lo tanto, la aplicación de la nueva generación de vacunas en ese país, resultaría de gran utilidad (80, 135-137, 222). En investigaciones similares realizadas en China, los estudios de prevalencia demuestran que las vacunas profilácticas contra PVH, incluyendo los genotipos 52 y 58, pueden ofrecer una mayor protección a las mujeres jóvenes en esa área geográfica (224).

Los genotipos de PVH-AR (PVH 16, 18, 31, 45 y 58) se asociaron con algún tipo de lesión citológica en el presente estudio, por lo que la infección con estos tipos de PVH representa un riesgo incrementado para la presencia de estas lesiones (Figura 12).

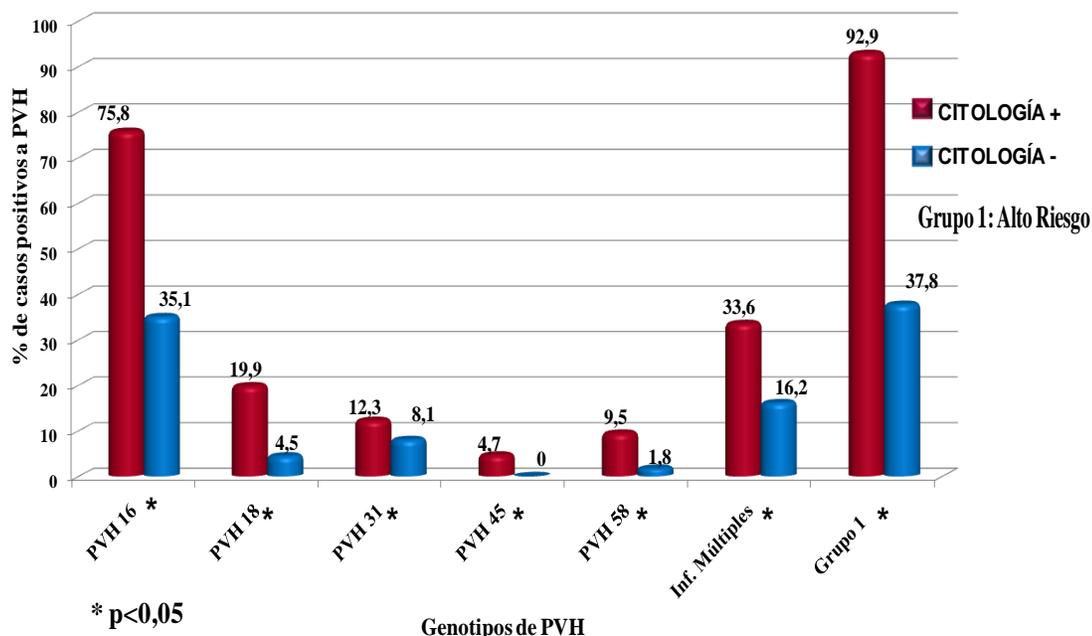


Figura 12. Genotipos de PVH asociados a la citología positiva en mujeres mayores de 30 años.

Todas las pacientes con CC fueron positivas a alguno de los siguientes genotipos de PVH: PVH 16 (61,0%; 25/41), PVH 18 (29,3%; 12/41), PVH 45 (14,6%; 6/41) y PVH 58 (12,2%; 5/41). La infección por PVH 16 se asoció con la presencia de lesiones cervicales de alto grado. La infección por PVH 18 estuvo relacionada con la

presencia de lesiones cervicales de alto grado y con el CC. El genotipo 45 se asoció sólo con la presencia de CC y el genotipo 31, con las lesiones cervicales de bajo grado (Tabla 13).

Tabla 13. Genotipos de PVH y resultado de la citología cervical en mujeres mayores de 30 años. Análisis Univariado.

<i>Genotipo viral</i>	<i>Citología Positiva</i>				<i>Valor de p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
	<i>Total</i> 211 (100) <i>n (%)</i>	<i>Bajo grado</i> 49 (23,2) <i>n (%)</i>	<i>Alto grado</i> 121 (57,3) <i>n (%)</i>	<i>Cáncer</i> 41 (19,4) <i>n (%)</i>		
Positivo a cualquier tipo de PVH	199 (94,3)	38 (77,6)	120 (99,2)	41 (100)	0,000 ^b 0,000 ^c 0,000 ^d	72,96 (9,99-533,02) ^b .
16	160 (75,8)	32 (65,3)	103 (85,1)	25 (61,0)	0,000 ^b 0,000 ^d	6,26 (3,53-11,09) ^b 5,79 (3,51-9,56) ^d
18	42 (19,9)	4 (8,2)	26 (21,5)	12 (29,3)	0,007 ^b 0,004 ^c 0,000 ^d	2,35 (1,25-4,39) ^b 2,91 (1,36-6,22) ^c 5,27 (2,02-13,74) ^d
31	26 (12,3)	10 (20,4)	13 (10,7)	3 (7,3)	0,020 ^a	2,54 (1,14-5,70) ^a
45	10 (4,7)	1 (2)	3 (2,5)	6 (14,6)	0,000 ^c 0,020 ^d	11,87 (3,19-44,13) ^c
58	20 (9,5)	3 (6,1)	12 (9,1)	5 (12,2)	0,000 ^d	5,71 (1,31-24,88) ^d
Grupo 1 Alto Riesgo	196 (92,9)	36 (73,5)	119 (98,3)	41 (100)	0,000 ^b 0,000 ^c 0,000 ^d	41,00 (9,86-170,56) ^b .
Grupo 2 Bajo Riesgo	16 (7,6)	3 (6,1)	10 (8,3)	3 (7,3)		21,47 (11,20-41,13) ^d
Grupo 3 Posible Alto Riesgo	8 (3,8)	2 (4,1)	3 (2,5)	3 (7,3)		
Grupo de Infecciones múltiples	71 (33,6)	11 (22,4)	44 (33,4)	16 (39,0)	0,007 ^b 0,001 ^d	1,98 (1,21-3,26) ^b 2,62 (1,47-4,68) ^d

Fuente: Modelo de recogida de información, resultados de la investigación de laboratorio y de la citología cervical.

a: con respecto a las lesiones de bajo grado; **b:** con respecto a las lesiones de alto grado; **c:** con respecto al cáncer cervicouterino; **d:** con respecto a tener citología positiva de cualquier grado.

Los resultados de 423 estudios realizados internacionalmente y basados en la metodología de RCP, demuestran que no hay diferencias significativas en la distribución de los genotipos oncogénicos en los casos con citología normal, atípica o de bajo grado. Sin embargo, la positividad a PVH 16 y a otros PVH-AR mostró un aumento en el análisis de las lesiones de alto grado NIC II/NIC III desde un 40% hasta 47% y en las lesiones de NIC III/CC desde un 58% hasta un 63%. Los genotipos de PVH 18 y 45, se comportaron de igual manera en varios países analizados (225). En la mayoría de los estudios, la contribución sustancial de los genotipos de PVH-AR al desarrollo de las lesiones de alto grado y al CC representan aproximadamente un 90% de los casos (135-137). En el presente trabajo, las infecciones múltiples con PVH se identificaron en 36,3% (89/245) de las mujeres infectadas. Todas las pacientes con infecciones múltiples tuvieron, al menos, un genotipo de alto riesgo oncogénico. De las pacientes con infecciones múltiples, un 55,1% (49/89) estuvo infectada con dos tipos, un

25,8% (23/89) con tres tipos, y un 19,1% (17/89) se infectó con más de tres tipos de PVH. La combinación más común de infecciones múltiples fue PVH 16 y 18 (13,9%; 34/245), seguido por la combinación PVH 16 y 31 (9%; 22/ 245). En este estudio se observó asociación entre las infecciones múltiples y las lesiones cervicales de alto grado ($p=0,007$). Algunos estudios proporcionan información acerca de que las mujeres con infecciones múltiples por PVH tienen un riesgo mayor de desarrollar lesiones precursoras del CC, específicamente en los casos donde se detectan genotipos que a la vez tienen cargas virales elevadas (>1000 copias/ μ L) (226, 227).

Los estudios de prevalencia de PVH utilizando métodos de genotipado de amplio espectro demuestran que las infecciones múltiples suelen ser muy comunes, especialmente en las mujeres más jóvenes, en el pico de su actividad sexual (228). Esto dificulta conocer la contribución de los genotipos individuales a los estadios de las lesiones cervicales. Hasta el momento, esta dificultad se ha abordado atribuyendo la contribución de cada genotipo al desarrollo de las lesiones de forma jerárquica, basándose en la prevalencia definida para cada genotipo en el CC.

IV.2.6 Variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas asociadas con la infección por PVH en mujeres mayores de 30 años

Existen varios factores que se asocian con el riesgo de tener una infección por PVH y con los diferentes grados de anomalías cervicales, sobre todo en mujeres mayores de 30 años, donde las infecciones persistentes evolucionan hacia las lesiones precursoras del CC. Entre ellos están: tener un número mayor de parejas sexuales en cortos períodos (52, 181), inicio temprano de la primera relación sexual, el tabaquismo y el uso de anticonceptivos orales. También se asocia el origen étnico con las variantes virales, según la región geográfica; el bajo nivel de escolaridad, el consumo de alcohol, tener antecedentes de infecciones de transmisión sexual; el hábito de no usar condón y el uso de dispositivos intrauterinos como método anticonceptivo, aunque este último no ha sido demostrado de manera categórica (181, 229).

Según los resultados obtenidos (Tabla 14), existe un mayor riesgo de infección por PVH en aquellas mujeres con un nivel de escolaridad por debajo del nivel universitario y consumidoras de cigarrillos y alcohol. Estos resultados están en concordancia con lo que se ha planteado en la mayoría de los estudios publicados a escala global (194). El bajo nivel de escolaridad se asocia a un incremento en el riesgo de infección por PVH. Esto se explica porque el bajo nivel de instrucción puede conducir a prácticas sexuales de riesgo, como el cambio frecuente de parejas y el rechazo al uso del condón (230).

Tabla 14. Datos sociodemográficos e infección por Papilomavirus humanos en mujeres mayores de 30 años. Análisis Univariado.

<i>Variable</i>		<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>Pacientes</i>		245 (100)		
<i>Edad, mediana en años (Cuartil)</i>	40,0 (35,0-45,0)	39,5 (35,0-45,0)		
<i>Edad (años)</i>			0,367	
	30-40	132 (53,9)		Referencia
	≥41	113 (46,1)		1,27 (0,76-2-14)
<i>Nivel de escolaridad</i>			0,000	
	Primaria y Secundaria Básica	56 (22,9)		9,24 (3,06-27,9)
	Preuniversitario y Técnico Medio	139 (56,7)		2,29 (1,31-4,03)
	Universitario	50 (20,4)		Referencia
<i>Estado Civil</i>			0,287	
	Casada	169 (69,0)		Referencia
	Divorciada, Soltera o Viuda	76 (31,0)		1,37 (0,77-2,5)
<i>Consumo de cigarrillos y/o alcohol</i>			0,026	
	Sí	69 (28,2)		2,12 (1,08-4,17)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

El alcoholismo y el tabaquismo son los hábitos tóxicos más ampliamente estudiados por su asociación con la infección por PVH, la persistencia viral y la evolución al cáncer cervicouterino (194). En este estudio, las mujeres que consumían alcohol y/o cigarrillos en el momento de la toma de las muestras presentaron un riesgo de infección por PVH significativamente mayor. Con respecto al consumo de alcohol, una explicación plausible es que el estado de embriaguez puede modificar el comportamiento del individuo y promover las prácticas sexuales de riesgo y el no uso del condón. Sin embargo, los datos de la literatura con respecto a la posible relación entre el consumo de alcohol y la infección por PVH son contradictorios. Estudios realizados previamente en Corea y en un grupo de países latinoamericanos mostraron que hay una asociación significativa entre el consumo de alcohol y un mayor riesgo de infección por PVH, NIC I y CC, mientras que en otros realizados en China no se encontró ninguna relación (231, 232).

El consumo de cigarrillos se relaciona con la presencia de mayor carga de ADN de PVH (192). Los meta-análisis a partir de varios estudios epidemiológicos sugieren que la exposición al humo del cigarrillo es capaz de aumentar el estrés oxidativo y podría ser responsable de un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino en las fumadoras, sobre todo en las que sobrepasan los 30 años y comenzaron con este hábito desde la adolescencia (208, 233). Las lesiones precursoras del CC, que son consecuencia de la infección persistente por PVH, en general se eliminan en ausencia de factores de riesgo como el tabaquismo (208).

Según los resultados de la Tabla 15, la menopausia y el uso de anticonceptivos orales por más de cinco años constituyeron factores de riesgo para la infección por PVH. Algunos autores han estudiado la menopausia como una variable asociada a la infección con genotipos persistentes de PVH (234, 235). Sin embargo, otros autores plantean que estos resultados pudieran estar sesgados por el empleo de terapias de remplazo hormonal, durante esta etapa de la vida. Como es conocido, las terapias de remplazo hormonal involucran hormonas sexuales esteroideas, que según varios estudios, se asocian a la carcinogénesis *in vitro* (236). No obstante, no está demostrado que la terapia hormonal de remplazo tenga un efecto de iniciación en la patogénesis del cáncer dependiente de estrógenos. Se plantea la necesidad de estudios *in vivo* que resulten concluyentes para asociar los cambios menopáusicos al riesgo de infección por PVH-AR y al desarrollo de los tumores inducidos por estos agentes.

Tabla 15. Datos ginecobstétricos e infección por Papilomavirus humanos en mujeres mayores de 30 años. Análisis Univariado.

<i>Variable</i>	<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>Pacientes</i>	245 (100)	-	-
<i>Edad de la menarquía</i>		0,164	
<10	26 (10,6)		0,24 (0,05-1,20)
10-14	197 (80,4)		0,28 (0,06-1,20)
>14	22 (9,0)		Referencia
<i>Edad de las primeras relaciones sexuales</i>		0,564	
<15	26 (10,6)		1,73 (0,51-5,86)
15-20	192 (78,4)		1,02 (0,45-2,28)
21-30	27 (11,0)		Referencia
<i>Menopausia</i>	Sí	0,042	2,64 (1,00-6,98)
<i>Metrorragia</i>	Sí	0,076	3,52 (0,81-15,35)
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>		0,109	
≤2	231 (94,3)		Referencia
>2	14 (5,7)		4,61 (0,60-35,61)
<i>Uso del condón</i>	No	0,904	0,91 (0,18-4,46)
<i>Uso de DIU</i>	No	0,687	1,11 (0,67-1,86)
<i>Uso de anticonceptivos orales (años)</i>		0,000	
0	150 (61,2)		Referencia
≤5	17 (6,9)		0,94 (0,56-1,59)
>5	78 (31,8)		6,53 (2,45-17,44)
<i>Embarazos</i>		0,427	
0	15 (6,1)		Referencia
1-2	84 (34,3)		0,76 (0,20-2,87)
≥3	146 (59,6)		0,56 (0,16-2,02)
<i>Partos</i>		0,307	
0	15 (6,1)		Referencia
1-2	84 (34,3)		0,74 (0,34-1,62)
≥3	146 (59,6)		1,49 (0,45-4,95)
<i>Leucorrea</i>	Sí	0,968	0,99 (0,59-1,67)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

El uso de anticonceptivos orales ya se ha discutido en la presente investigación, cuando se investigó el grupo de mujeres entre 15 y 59 años, como uno de los principales factores de riesgo para la adquisición de infecciones por genotipos oncogénicos de PVH. En este grupo de mujeres mayores de 30 años, esta variable también se comportó como un factor de riesgo para la infección viral.

Los antecedentes de citología positiva en algún momento anterior al estudio y una colposcopia positiva en el momento del mismo constituyeron factores de riesgo para la infección por PVH (Tabla 16). Estas son las técnicas que identifican los signos de la enfermedad y que evidencian la persistencia viral (237). De esta forma se pudiera considerar que en este grupo de mujeres mayores de 30 años, las infecciones persistentes ya han mostrado signos patológicos de una infección persistente, aunque no existen datos de una detección anterior del mismo genotipo de PVH.

Tabla 16. Antecedentes ginecológicos patológicos e infección por Papilomavirus humanos en mujeres mayores de 30 años. Análisis Univariado.

<i>Variable</i>		<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>Pacientes</i>		245 (100)	-	-
<i>Antecedentes de alguna cirugía cervical</i>	Sí	26 (10,6)	0,285	1,71 (0,63-4,62)
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Sí	189 (77,1)	0,000	5,91 (3,40-10,26)
<i>Colposcopia positiva</i>	Sí	142 (58)	0,000	8,90 (4,34-18,35)
<i>Antecedentes de ITS</i>	Sí	194 (56,4)	0,604	1,15 (0,68-1,92)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

IV.2.7 Predictores de riesgo para la infección viral y para la progresión de las lesiones cervicales en mujeres mayores de 30 años

En la Tabla 17, se muestran los predictores de la infección por PVH en este grupo de mujeres mayores de 30 años.

Tabla 17. Predictores de riesgo para la infección por Papilomavirus humanos en mujeres mayores de 30 años. Análisis Multivariado.

<i>Variable n=245</i>		<i>Valor de p</i>	<i>OR ajustado (IC 95%)</i>
<i>Nivel de escolaridad</i>		0,003	
	Primaria y Secundaria Básica	0,001	7,55 (2,32-24,60)
	Preuniversitario y Técnico Medio	0,108	1,72 (0,89-3,31)
	Universitario	Referencia	
<i>Colposcopia positiva</i>	Sí	0,000	6,20 (2,85-13,51)
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Sí	0,000	3,61 (1,90-6,93)
<i>Consumo de cigarrillos y/o alcohol</i>	Sí	0,026	2,44 (1,11-5,32)

Fuente: Modelo de recogida de información y resultados de la investigación de laboratorio.

A modo de conclusión, las mujeres estudiadas con bajo nivel de escolaridad, con hábito de consumir cigarrillos y/o alcohol y con antecedentes de citologías y colposcopias positivas, tuvieron el mayor riesgo de desarrollar

infecciones por PVH. Se investigaron también los predictores de riesgo para las lesiones de alto grado. En el análisis se incluyeron todos los casos con estas lesiones y que fueron positivos a PVH oncogénicos. Los predictores para estas lesiones fueron los antecedentes citológicos positivos ($p=0,000$; $OR=8,32$ IC 95% 3,49-19,83) y la colposcopia positiva en el momento del estudio ($p=0,000$; $OR=6,37$ IC 95% 3,12-13,01). Estas dos variables muestran los efectos citopáticos de las infecciones virales persistentes con genotipos oncogénicos. Es por ello que muchos autores plantean que la carga viral de los genotipos oncogénicos constituye un buen predictor del CC (238-240), fundamentalmente en las etapas premalignas (NIC II y NIC III).

IV.2.8 Valor de la carga viral de PVH oncogénicos en mujeres mayores de 30 años

Investigaciones realizadas en diferentes áreas geográficas, evidencian la relación entre los valores de la carga viral de PVH-AR y el grado de las lesiones. La carga viral se considera un marcador de progresión y severidad en la evolución de las mismas, lo cual aporta un criterio con valor pronóstico para la enfermedad (238). Los resultados de esta asociación en la población estudiada en la presente investigación pueden observarse en la Figura 13 y demuestran un mayor riesgo de padecer lesiones cervicales de alto grado y cáncer cuando es mayor el valor de la carga viral de PVH.

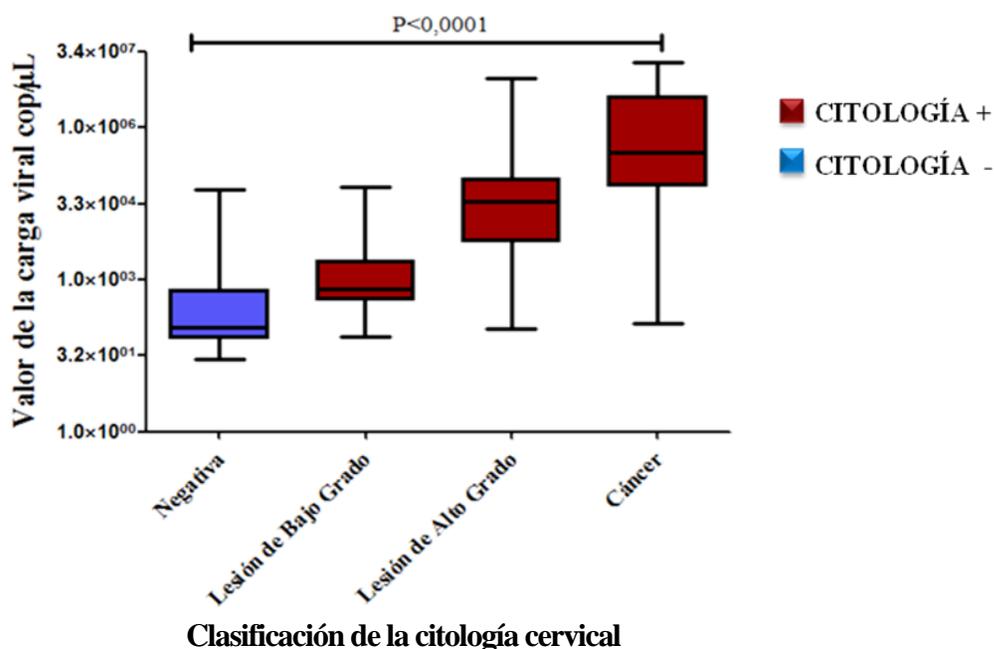


Figura 13. Asociación entre los valores de la carga viral y el grado de las lesiones citológicas en mujeres mayores de 30 años.

En poblaciones de diversos orígenes geográficos como China, Colombia, Estados Unidos e Italia se pudo definir que mediante la determinación de la carga viral de PVH, es posible pronosticar la progresión de las lesiones NIC II en mujeres mayores de 35 años, pues la colposcopia y la citología no constituyen métodos lo

suficientemente sensibles y objetivos para este propósito (238). Incluso se propone utilizar la carga viral como una posible alternativa dentro de los métodos de pesquisa del CC en China. Esta consideración es útil también para aplicarse a las mujeres más jóvenes ya que la carga viral de PVH-AR, con valores de moderados a altos (por encima de 1000 copias/ μ L de ADN), constituye uno de los factores virales que incrementa el riesgo para desarrollar CC en mujeres con NIC II y NIC III (238).

De acuerdo a los resultados del presente estudio, los mayores valores de carga viral de los genotipos de PVH 16, 18 y 58 se asociaron ($p \leq 0,01$) con un mayor grado de las lesiones citológicas (Figura 14 A, B y C).

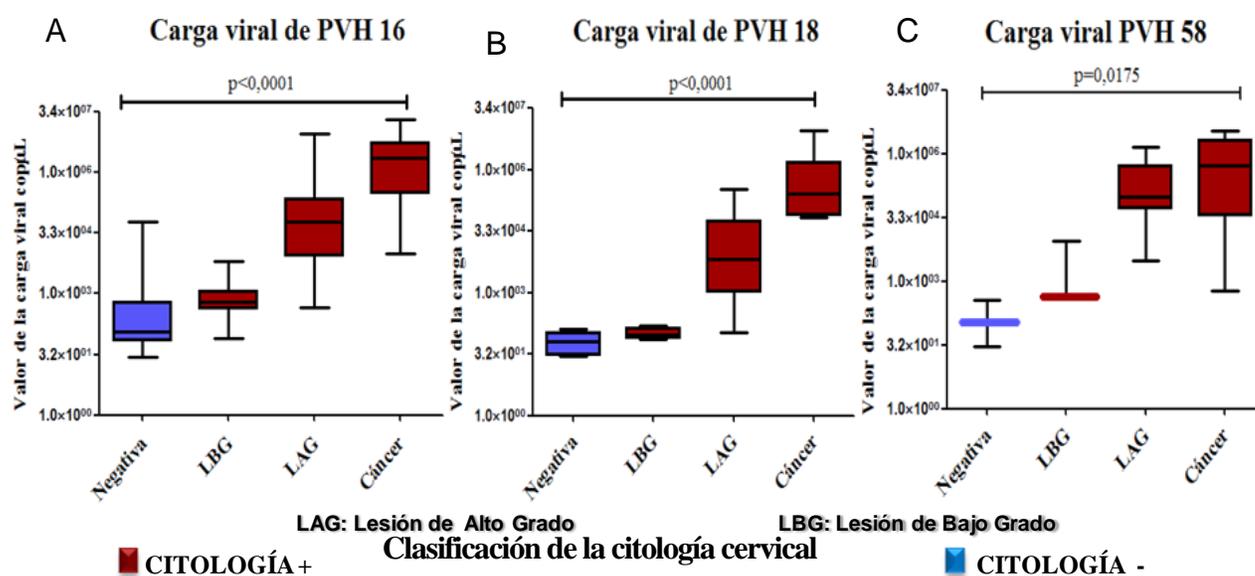


Figura 14. Relación entre los valores de la carga viral de PVH 16 (A), PVH 18 (B) y PVH 58 (C) y el grado de las lesiones citológicas.

Estudios realizados en Italia demostraron el valor pronóstico de los niveles de carga viral en los casos con citologías atípicas infectados con genotipos oncogénicos. Observaron que el incremento en el tiempo en los valores de carga viral constituyó un marcador de progresión a NIC II/NIC III. Este indicador les resultó aplicable también para los casos positivos a PVH-AR con citologías atípicas de bajo grado (241). Otro estudio reciente realizado en México también demostró el valor de la carga viral, como un marcador de progresión de las lesiones de alto grado NIC II/NIC III hacia el CC (242).

Se han publicado investigaciones realizadas en diversas áreas geográficas tales como España, Brasil y Kuwait, donde se evaluó el significado de los valores de la carga viral para los genotipos de PVH más frecuentes en esas poblaciones. Sus resultados mostraron evidencias del valor de este marcador en el pronóstico y seguimiento de

cada uno de los genotipos identificados, incluso en el seguimiento post conización de las pacientes tratadas por lesiones de alto grado y carcinoma *in situ* (243).

En el presente estudio, para el caso de PVH 16, se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) cuando se compararon las mujeres con citologías positivas e infectadas por el virus, con las que tenían citologías negativas. También se estableció asociación cuando se compararon las lesiones de bajo grado con las de alto grado y CC. Además, los casos con lesiones de alto grado mostraron estas mismas diferencias cuando se compararon con los casos de CC.

Algunos autores plantean que como el genotipo de PVH 16 tiene una prevalencia elevada en la mayor parte de las poblaciones de riesgo y predomina tanto en los casos con citologías de bajo grado como en las de alto grado, esto implica que no siempre la carga viral se identifica como un marcador de severidad o progresión (244). Sin embargo, en estudios prospectivos se ha podido determinar que la disminución en la carga viral de PVH 16 en más de dos logaritmos durante dos mediciones consecutivas es un fuerte indicador de eliminación viral para las mujeres con infección reciente y constituye un sinónimo de no recurrencia en las pacientes tratadas por presentar lesiones precursoras de CC (245). Se puede definir el valor de la carga viral de PVH 16 como un marcador de gran valor pronóstico y de severidad, siempre que el método de cuantificación tenga en cuenta en el diseño los genes que definen oncogenicidad (E6/E7) o la integración del ADN viral (E2) (246).

En esta investigación, los valores de la carga viral de PVH 18 se asociaron con determinadas lesiones cuando se compararon con las citologías negativas. Se encontraron diferencias significativas entre las cargas virales de los casos con lesiones de alto grado ($p = 0,0006$) y las mujeres con CC ($p = 0,0007$), cuando se compararon con las negativas. Se hallaron diferencias significativas entre las cargas virales de las mujeres con CC y aquellas con lesiones de bajo grado ($p = 0,0002$) o de alto grado ($p = 0,002$). También se observaron diferencias significativas entre los valores de la carga viral de PVH 18 entre las mujeres con lesiones de alto grado y de bajo grado ($p = 0,0002$). Sin embargo, la mayoría de otros estudios coinciden en que el valor de la carga viral pierde validez en las etapas más avanzadas del CC asociado a PVH 18. Este genotipo es el mayor causante de los adenocarcinomas, cuya evolución no se ha visto asociada con las variaciones en los valores de la carga viral, lo cual no ocurre cuando se analiza la infección por PVH 18 en los carcinomas de células escamosas (247).

Con respecto al genotipo 58, en esta investigación se obtuvieron diferencias significativas entre las cargas virales de las pacientes con CC ($p = 0,035$) y con lesiones de alto grado ($p = 0,007$), cuando se compararon con las negativas. También se encontraron diferencias significativas entre las cargas virales de las pacientes con lesiones de alto grado, cuando se compararon con las que presentaron lesiones de bajo grado ($p = 0,014$).

El valor de la carga viral de PVH 58 se ha evaluado en diversos estudios realizados en diferentes regiones como México, Amazonia y países asiáticos, donde se encuentra una prevalencia elevada de este genotipo, tanto en la población sana como en las mujeres con lesiones precursoras y CC. Se plantea que este genotipo ha sido uno de los candidatos más indicados para incluirse en la generación más reciente de vacunas contra PVH por ser uno de los más prevalentes luego de la inmunización contra PVH 16 y 18 (137). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones aseveran que no se han encontrado diferencias significativas entre los valores de la carga viral de PVH 58, cuando se comparan mujeres con lesiones cervicales de diferente grado o cuando se siguen por un período de dos años (248). Se ha podido constatar que tiene una mayor relevancia como marcador de severidad, la presencia de variantes genéticas de PVH 58, las cuales evolucionan de manera diferente y se asocian a la progresión al CC, con un mayor nivel de significación (249, 250).

En los resultados de las dos investigaciones descritas anteriormente se evidenció la elevada prevalencia de infección por PVH en mujeres cubanas y la importancia indiscutible de las pruebas de detección de PVH y el monitoreo de la carga viral.

En los dos grupos de mujeres analizadas anteriormente en el presente trabajo se investigó el papel de las infecciones por PVH en el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer en el cuello uterino. El ano es también un órgano donde la infección con PVH-AR puede conllevar al desarrollo de lesiones precursoras y cáncer anal (CA). La transmisión de la infección es muy frecuente a esta región anatómica, tanto en mujeres como en hombres (10). El CA en la población general no suele ser muy frecuente, aunque su incidencia se ha incrementado en los últimos años, sobre todo en grupos específicos de individuos con algún tipo de inmunocompromiso, como es el caso de aquellos que viven con VIH/sida (11, 13).

IV.3 Frecuencia de infección anal, genotipos de Papilomavirus humanos, valor de la carga viral y asociación con las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en hombres cubanos seropositivos a VIH con otras infecciones de transmisión sexual

IV.3.1 Frecuencia de infección por PVH en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH. Relación con el resultado de la citología anal

En 89,3% (50/56) de los individuos analizados se detectó infección por PVH en la mucosa anal. En 88% (44/50) de los casos positivos a PVH, se detectó infección con, al menos, un genotipo de alto riesgo oncogénico y en un 66% (33/50) se identificaron genotipos de bajo riesgo oncogénico. Las infecciones simples por PVH de bajo riesgo oncogénico solo se detectaron en un 10% (5/50) de los casos positivos a PVH (Figura 15).

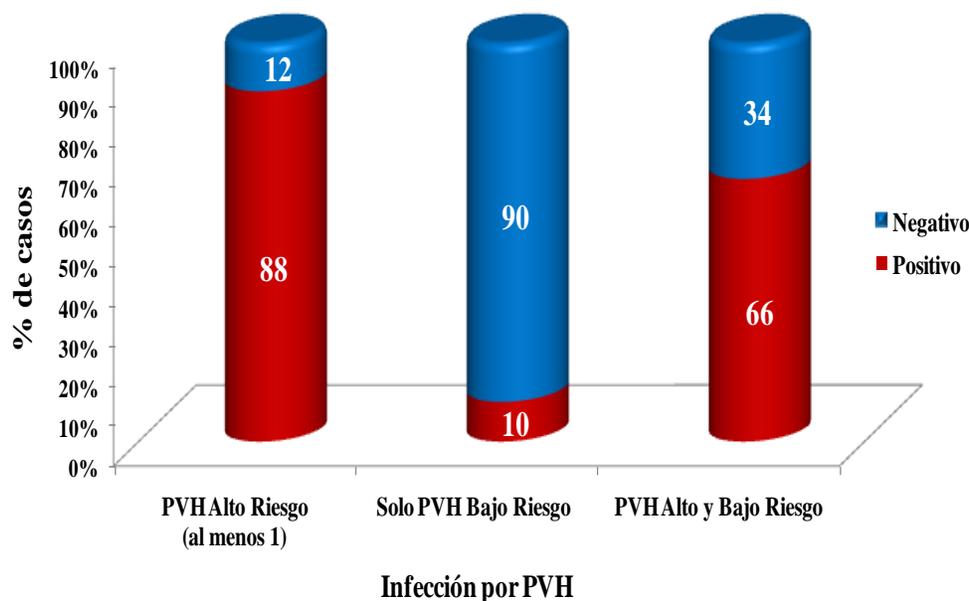


Figura 15. Frecuencias de infección por PVH de alto y bajo riesgo oncogénico en la mucosa anal de individuos cubanos seropositivos a VIH.

Estos resultados se corresponden con los hallazgos descritos en otros estudios donde se detectan porcentajes de infección anal por PVH con valores muy elevados. En un estudio realizado por Sahasrabuddhe y cols. en el 2013, los autores analizaron 363 HSH seropositivos a VIH y detectaron una prevalencia de un 94% para cualquier genotipo de PVH y de un 75,4% para genotipos de alto riesgo oncogénico (12). Tales hallazgos indican que la frecuencia de infección anal por PVH es particularmente elevada en la población seropositiva a VIH, especialmente en los HSH (12).

En países como España (251), China (252) y Canadá (66), las frecuencias de infección por PVH y PVH-AR superan las cifras encontradas en el presente trabajo, alcanzando hasta un 95,8% y 96%, respectivamente.

En un meta-análisis, que incluyó 53 investigaciones provenientes fundamentalmente de Norteamérica, se plantea que la prevalencia de PVH y de los genotipos de PVH-AR es significativamente mayor en los HSH seropositivos a VIH (91).

No existen investigaciones previas sobre la infección por PVH en la mucosa anal en individuos cubanos seropositivos a VIH. Solo existen datos publicados acerca de la presencia de la infección por PVH en lesiones condilomatosas de la región anogenital en un grupo de individuos seropositivos a VIH atendidos en la consulta de dermatología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (94). El estudio identificó un gran número de genotipos en las muestras de condilomas anogenitales. Los genotipos de PVH 6 y 11 fueron los más frecuentes,

detectándose en 63,3% y en 53,3% de los casos, respectivamente. Dicho análisis demostró además la detección de PVH de alto y bajo riesgo oncogénico en lesiones condilomatosas de pacientes cubanos seropositivos a VIH. A nivel internacional, se han realizado varias investigaciones con el objetivo de determinar el papel de la infección por PVH en el desarrollo y evolución de las lesiones precursoras del CA. El CA, a diferencia del CC, no es muy frecuente en la población general. Es por esto que, hasta la década de los años 1990, no se consideró como una neoplasia «preocupante» para la salud pública, por su escasa frecuencia y porque afecta fundamentalmente a personas de edad avanzada del sexo femenino (253). Posteriormente, se empezó a detectar un incremento en la incidencia de esta neoplasia en determinadas poblaciones, que hoy constituyen los grupos de riesgo para esta enfermedad. Entre ellos, los más afectados son los hombres seropositivos a VIH, particularmente los HSH (254).

De forma análoga a lo que ocurre en el carcinoma de cérvix, la aparición de un carcinoma en el canal anal va precedida de una neoplasia intraepitelial, la cual debe ser detectada y erradicada de forma precoz para prevenir la progresión hacia las lesiones invasivas. Para esto, se ha propuesto la citología del canal anal como método para la pesquisa inicial de las lesiones precursoras de CA (255).

En la Figura 16 pueden observarse las diferentes clasificaciones citológicas a partir de la citología anal realizada a los individuos estudiados.

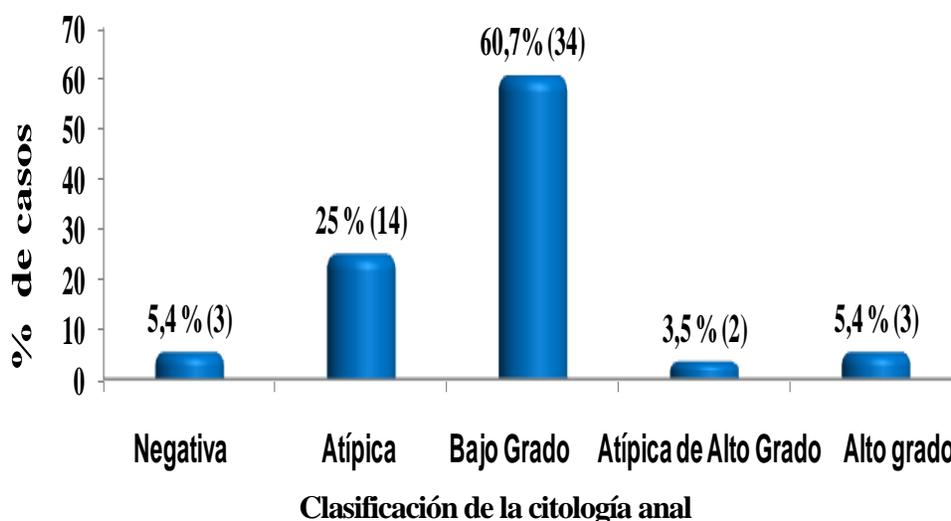


Figura 16. Frecuencias de las diferentes clasificaciones citológicas a partir de la citología anal realizada a los individuos cubanos seropositivos a VIH.

Solo se diagnosticaron tres casos con citología negativa, se observó una prevalencia elevada de lesiones precursoras del CA. Se reflejó un predominio de las lesiones de bajo grado (34/56) y en segundo lugar las citologías atípicas (14/56). Es de destacar que las lesiones de alto grado y las atípicas de alto grado se presentaron en un número menor de casos (3/56) y (2/56), respectivamente. Estos resultados coinciden con lo descrito por otros autores, como los estudios realizados por Yang y cols. en el 2012 y Salit y cols. en el 2010 (256, 257), los cuales encontraron frecuencias similares para cada una de las clasificaciones citológicas y un predominio de las lesiones de bajo grado. Se plantea que este predominio de lesiones de bajo grado puede deberse a que la citología anal, subestima el grado de displasia de la lesión, aunque es una técnica importante como primer eslabón en la pesquisa de las neoplasias anales en las poblaciones de riesgo (256, 257). En varios estudios se demuestra este hallazgo; uno de ellos es el publicado por Betancourt y cols. en el 2012 (166) en pacientes seropositivos a VIH. Los autores encontraron en una serie de 89 pacientes, que la mayoría presentaba lesiones de bajo grado (64%), mientras que detectaron un mayor porcentaje de lesiones de alto grado en los mismos pacientes mediante el diagnóstico histológico realizado a partir de la toma de una biopsia de la lesión. Debido a esto, en los países donde está establecida la pesquisa para la detección temprana de estas lesiones anales, todos aquellos casos que resulten positivos, incluidas las citologías atípicas de significado indeterminado, se remiten a biopsia y anoscopía de alta resolución (AAR). De la misma forma que la colposcopia es una técnica que aumenta la resolución en la detección de las lesiones en el cuello uterino, la AAR incrementa la sensibilidad y especificidad en la pesquisa de las lesiones anales (258, 259). No obstante, cuando la técnica citológica sigue los requisitos de calidad y pautas establecidas internacionalmente puede constituir un buen predictor de las neoplasias intraepiteliales anales (166, 258).

Debido a que la infección por PVH es el factor fundamental que determina el desarrollo de las lesiones precursoras del CA, en esta investigación se analizó la frecuencia de infección viral según las clasificaciones citológicas (Figura 17). La frecuencia de la infección por PVH en la mucosa anal de estos individuos, fue notablemente elevada, incluso en aquellos con citología negativa. En la Figura 17 se observa que todos los pacientes con LIEA de alto grado y con lesiones atípicas de alto grado fueron positivos a este agente viral. Lo mismo ocurrió con los tres casos que tenían citología anal negativa. Aquellos con lesiones de bajo grado y con lesiones atípicas, mostraron una positividad a PVH de 91,2% y 78,6%, respectivamente.

No se encontró asociación entre la infección por PVH y la presencia de las LIEA, lo cual pudo deberse al elevado porcentaje de positividad, tanto en los pacientes con lesiones anales como en los negativos y al bajo número de individuos estudiados.

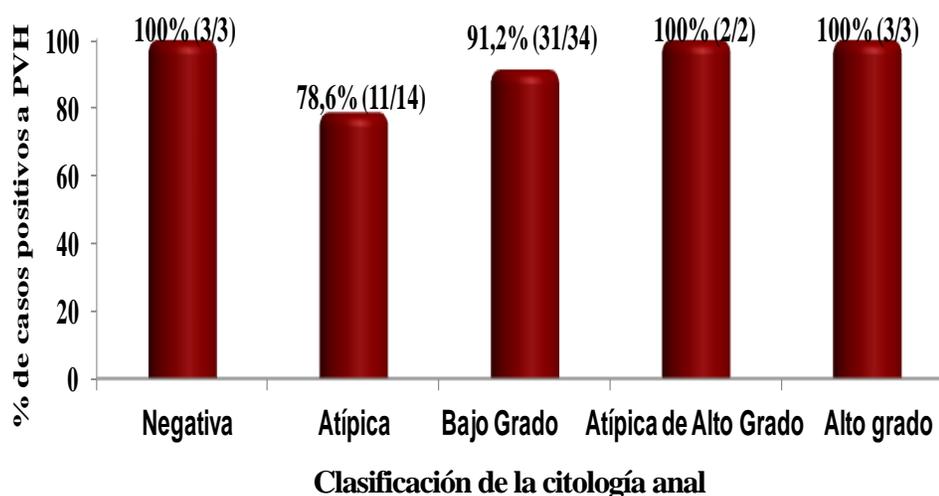


Figura 17. Frecuencias de infección por PVH según la clasificación citológica en la mucosa anal de los individuos cubanos seropositivos a VIH.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Fox y cols. en el 2005 (71), pues no encontraron diferencias significativas en la prevalencia de PVH entre las diferentes clasificaciones citológicas. Los autores concluyeron, que debido a esto la detección de PVH no es una herramienta útil para diferenciar infecciones transitorias asociadas a lesiones de bajo grado de infecciones persistentes relacionadas con lesiones de alto grado. No obstante, la frecuencia de la infección por PVH en la mucosa anal de los pacientes incluidos en dicho estudio fue notablemente elevada. Esto es debido a que la infección por VIH no sólo incrementa la persistencia de la infección por PVH sino que además, aumenta el riesgo de adquirir nuevas infecciones por estos virus, así como el riesgo de reactivación de la infección latente. Esto es debido al estado inmunológico y a las prácticas sexuales de riesgo en estos individuos (71).

Machalek y cols.; explican la alta positividad a PVH en la mucosa anal de estas poblaciones de riesgo debido a que la infección viral pudiera ser más persistente en la mucosa anal que en la mucosa cervical y que esta persistencia es mayor, además en individuos inmunocomprometidos (11).

Castle y cols. en el 2013 (260) plantean que es un reto poder diferenciar entre casos positivos con infecciones benignas y transitorias, de aquellas persistentes causantes de lesiones precancerosas, especialmente durante la pesquisa en los HSH seropositivos a VIH, donde la infección por PVH es tan elevada. Estos autores proponen, que además de la detección de PVH-AR, se necesitan biomarcadores que puedan evaluar con mayor precisión la severidad y progresión de la lesión, tales como la expresión de ARNm de las oncoproteínas virales E6 y E7 y la carga viral del PVH-AR.

IV.3.2 Genotipos de PVH más frecuentes en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH y su asociación con el grado de las lesiones citológicas anales

Se ha discutido por varios autores que la presencia de determinados genotipos de PVH entre los HSH seropositivos a VIH puede variar según las características de la población, la localización geográfica, los hallazgos patológicos y el empleo de diferentes técnicas moleculares para la detección de PVH (11, 261).

En la Figura 18, pueden observarse las frecuencias de infección por los diferentes genotipos de PVH identificados en la mucosa anal de los individuos estudiados.

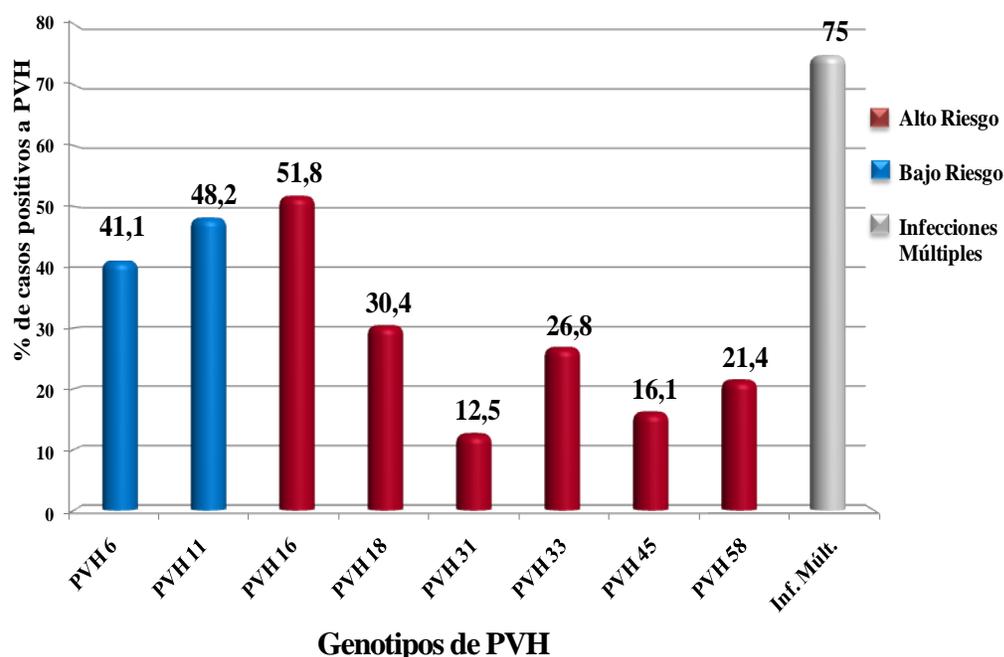


Figura 18. Frecuencias de diferentes genotipos de PVH identificados en la mucosa anal de individuos cubanos seropositivos a VIH.

El genotipo 16 fue el predominante, seguido de los genotipos de bajo riesgo 6 y 11, para un 51,8% (29/56), 41,1% (23/56) y 48,2% (27/56), respectivamente. Además, se observó la asociación entre la infección por PVH 6 y la presencia de condilomas. Esto indica que la probabilidad de detectar infección anal por PVH 6 en los casos con condilomas anogenitales es casi cinco veces mayor ($p=0,003$; $RP=4,92$ IC 95% 1,69-14,37). La infección por los genotipos 6 y 11 es muy frecuente en las lesiones de condiloma acuminado, pues son los más detectados como agentes causales de las verrugas anogenitales. Sin embargo existen otros genotipos de bajo riesgo (no investigados en este estudio), que se asocian a la aparición de estas lesiones como es el caso de los genotipos 10 y 70 (68, 94).

En esta población, también se identificaron otros genotipos de alto riesgo oncogénico como el PVH 18, 31, 33, 45 y 58, entre otros. Se ha descrito que el PVH 16 es el más frecuente en estas poblaciones, seguido por los genotipos 6 y 11. Se plantea, que los PVH-AR como el 16 y el 18 están asociados con la mayoría de las neoplasias genitales en el hombre y particularmente, en más del 90% de los casos de cáncer del canal anal (66, 87, 91). Estos genotipos están asociados tanto con las LIEA de alto grado como con las de bajo grado, pero son mucho más frecuentes en el grupo de alto grado. En varios estudios se ha descrito que la infección por los genotipos de bajo riesgo es también frecuente en el canal anal de los HSH seropositivos a VIH, pues se publican porcentajes de infección entre un 9% y un 39%. Las frecuencias detectadas en el presente trabajo están por encima del rango que se describe en la mayoría de los estudios (66, 87, 91).

Colón-López y cols. en el 2014 (262) detectaron en Puerto Rico una frecuencia mayor de los genotipos de alto riesgo 58, 31, 51. Los autores sugieren que estas diferencias en los genotipos encontrados, podrían reflejar distribuciones geográficas heterogéneas. Ello tiene crucial importancia para el establecimiento de las medidas de prevención.

Meta-análisis realizados por Sahasrabudde y cols. en el 2013 (12) y por Machalek y cols. en el 2012 (91) en poblaciones similares de diferentes regiones geográficas, demostraron que aún están por definirse todas las variables involucradas en la aparición y desarrollo de las LIEA asociadas a PVH. Sin embargo, hay una coincidencia absoluta en el hecho de que los HSH, esencialmente los individuos seropositivos a VIH, presentan una elevada prevalencia y diversidad de genotipos de PVH en la mucosa anal (12, 91).

En el presente estudio, las infecciones múltiples se encontraron en un 75% (42/56) de los individuos estudiados y en 84% de los casos positivos a PVH (42/50). Un 88% de los casos tuvo, al menos un genotipo de alto riesgo y 62% más de dos. En la literatura se describe que en los individuos seropositivos a VIH es frecuente la presencia de infecciones múltiples y una mayor proporción de genotipos oncogénicos (65, 66, 68, 263). Los resultados obtenidos en la presente investigación, coinciden con lo planteado anteriormente ya que existió un promedio de 3 genotipos de PVH en las muestras analizadas. El significado etiológico de las infecciones múltiples por genotipos oncogénicos de PVH en las LIEA de alto grado aún no ha podido definirse. Es probable que la presencia de infecciones transitorias con varios genotipos virales en la zona de transformación anal, no sea un factor de riesgo para el desarrollo de estas lesiones hacia el CA. Se describe en la literatura que las infecciones múltiples son muy frecuentes en las LIEA de bajo grado (35-54%) y en las LIEA de alto grado (61%). Sin embargo, la frecuencia disminuye sustancialmente en el CA (7%), lo que apoya la hipótesis de que la mayoría de las infecciones son transitorias y solo aquellos genotipos que producen infección persistente, o sea los PVH-AR, serán capaces de provocar el desarrollo de las lesiones precursoras a cáncer (91).

En la Figura 19 se observan las frecuencias porcentuales de infección por los genotipos de PVH-AR detectados, según la clasificación de la citología anal. En las lesiones atípicas, los genotipos más frecuentes fueron el 16, el 33 y el 45; en las lesiones de bajo grado predominaron los genotipos de PVH 16, 18 y 33.

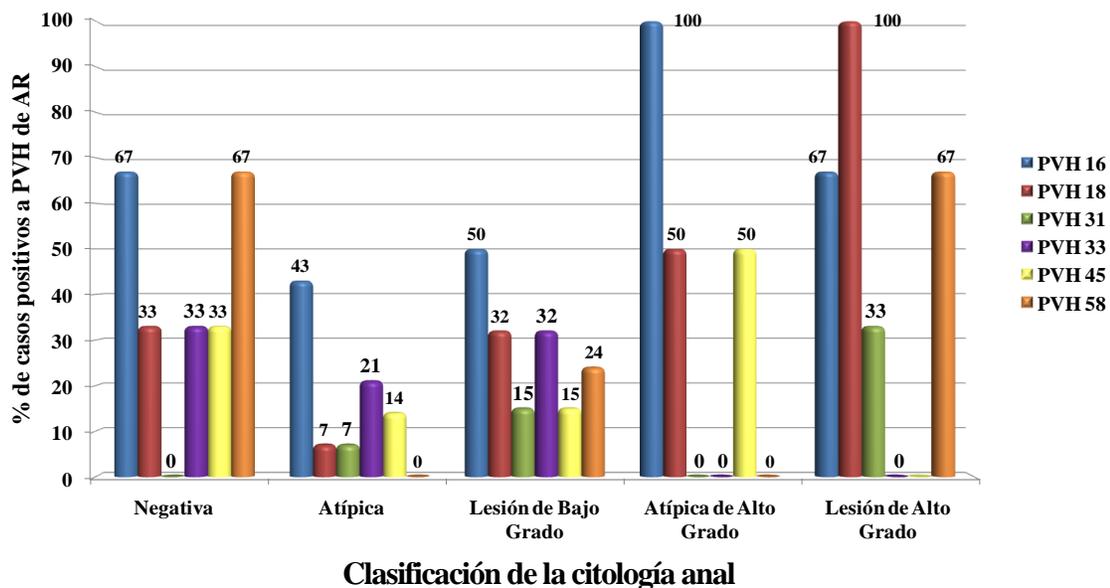


Figura 19. Relación entre los genotipos de PVH de alto riesgo oncogénico y las diferentes clasificaciones de la citología anal en individuos cubanos seropositivos a VIH.

En las lesiones atípicas de alto grado, se identificaron mayoritariamente los tipos 16, 18 y 45; mientras que en las citologías de alto grado, fueron los genotipos 16, 18, 31 y 58. Se puede observar que el PVH 16 fue el genotipo más frecuente en la mayoría de las clasificaciones citológicas, excepto en las lesiones de alto grado, donde se encontró una asociación entre la presencia de estas lesiones y PVH 18 ($p=0,020$).

Estos resultados indican que existe una probabilidad mayor de padecer una lesión de alto grado en el canal anal cuando se detecta infección con PVH 18. Dichos hallazgos coinciden parcialmente con lo obtenido por Yang y cols. en el 2012 (256), quienes detectaron PVH 16, 45, 52 y 18, como los genotipos más frecuentes, en las lesiones de alto grado de un grupo de HSH seropositivos a VIH. Se han publicado datos similares en España, donde los investigadores encontraron PVH 18 asociado a la presencia de LIEA de alto grado en la mucosa anal de HSH (251).

En otros estudios, se ha demostrado la asociación de los genotipos 16 y 18 con la presencia y desarrollo de lesiones de alto grado como precursoras del CA, en población masculina seropositiva a VIH (264, 265).

En meta-análisis realizados por Hoots y cols. en el 2009 (110) y Machalek y cols. en el 2012 (11) se plantea que los PVH-AR 16 y 18 son los genotipos más frecuentes en las lesiones anales de bajo y alto grado. Describen

además, que de los casos con CA positivos a PVH, la gran mayoría (85%), están asociados con la presencia de infecciones por PVH 16 seguido de PVH 18, con una frecuencia de un 90% para la combinación de ambos; independientemente de la localización geográfica de los individuos estudiados.

IV.3.3 Valor de la carga viral de PVH oncogénicos en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH y su asociación con el grado de las lesiones citológicas anales

Dentro de los factores virales que juegan un papel determinante en la evolución de infecciones persistentes con genotipos de PVH-AR, se considera el valor de la carga viral de estos genotipos. En el presente estudio se evaluó la asociación entre la carga viral y los resultados citológicos (Figura 20).

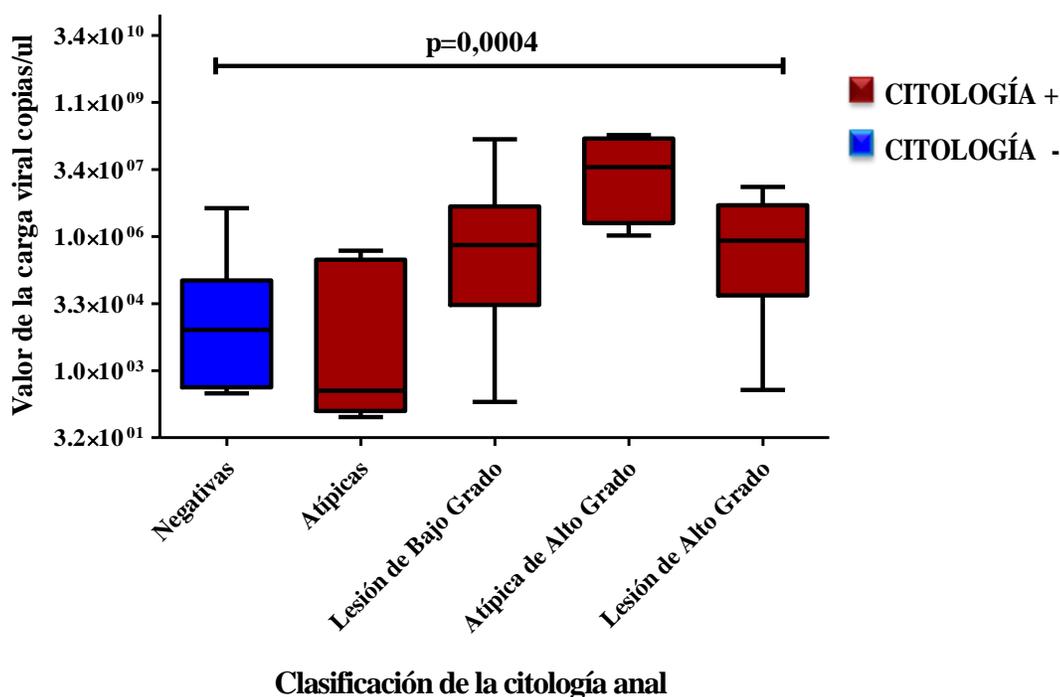


Figura 20. Asociaciones entre los valores de carga viral de Papilomavirus humanos oncogénicos y el grado de las lesiones intraepiteliales anales en individuos cubanos seropositivos a VIH.

Como se observa en el gráfico, los valores de carga viral mostraron diferencias significativas entre las diferentes clasificaciones citológicas ($p=0,0004$). Se encontraron los valores más elevados de carga viral en las lesiones de mayor severidad. Dicha asociación es dependiente, fundamentalmente de las lesiones de bajo y alto grado y de las lesiones atípicas de alto grado, lo que significa que los valores mayores de carga viral indican una mayor severidad de las lesiones precursoras del CA. En el presente estudio, los casos con citologías atípicas de alto grado fueron los que tuvieron los mayores niveles de carga viral de PVH. Existieron diferencias significativas

cuando se compararon estas lesiones con las de bajo grado ($p=0,0138$), las de alto grado ($p=0,036$), las lesiones atípicas ($p=0,0014$) y con las citologías negativas ($p=0,0061$). Existieron además diferencias significativas entre los valores de la carga viral de los individuos con LIEA de alto grado, cuando se compararon con los casos con citologías atípicas ($p=0,0056$) y con las citología negativas ($p=0,0469$). No se encontraron diferencias significativas al compararse con las lesiones de bajo grado ($p=0,4957$). En el caso de las citologías de bajo grado, las diferencias en los valores de la carga viral de PVH fueron significativas al ser comparados con los casos con citologías atípicas ($p=0,0006$) y con citologías negativas ($p=0,0113$). Existen muy pocos estudios donde se evalúa el papel de la carga viral de PVH en la evolución de las LIEA. Sin embargo, se plantea que los eventos moleculares que originan las diferentes categorías de las lesiones anales son similares a los que se establecen en la clasificación de la citología cervical (266). De esta manera, los biomarcadores que se evalúan para la pesquisa del CC también pueden utilizarse para la evaluación del CA, así como para decidir las conductas de tratamiento inmediato o seguimiento. Es por ello, que los valores de la carga viral de PVH podrían considerarse marcadores pronósticos del CA, al igual que para el CC, entre los cuales también se han identificado la expresión de ARNm de las proteínas E6 y E7 y p16/Ki-67 (266).

En un estudio realizado por Tamalet y cols. en el 2014 (264), se identificó la carga viral de PVH 16 como una variable independiente asociada con las citologías positivas. Por otro lado Poizot-Martin y cols. en el 2009 (267), no encontraron diferencias significativas entre los valores de la carga viral de PVH 16 y 18 con respecto a los resultados obtenidos mediante anoscopía. Estos autores plantean que se necesitan estudios de cohorte con un número mayor de individuos para evaluar la relación entre los valores elevados de la carga viral de PVH y la progresión de las lesiones anales.

IV.3.4 Relación entre los factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos y la infección por PVH detectada en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH

En la literatura científica se han analizado previamente algunas variables sociodemográficas, epidemiológicas y clínicas relacionadas con la infección por PVH en los hombres seropositivos a VIH. Entre estas variables está la edad, el nivel de escolaridad, el estado civil, los hábitos tóxicos, las conductas sexuales, la orientación sexual y el conteo de linfocitos T CD4+, entre otras (13, 268). La relación entre las variables analizadas en el presente trabajo y la infección por PVH puede apreciarse en las tablas siguientes: variables sociodemográficas (Tabla 18), epidemiológicas (Tabla 19) y clínicas (Tabla 20).

De manera particular, un factor sociodemográfico que se estudia en los HSH seropositivos a VIH, es la edad a la que se detecta la infección por PVH y a la que aparecen las lesiones anales de alto grado. Esta resulta una

variable que define la aplicación y el cronograma de los programas de pesquisa, prevención y control de esta enfermedad (64, 70, 251).

Tabla 18. Características sociodemográficas e infección por PVH en la mucosa anal de hombres seropositivos a VIH. Análisis Univariado.

<i>Variable</i>	<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>RP (IC 95%)</i>
<i>Pacientes</i>	50 (100)		
<i>Edad (años)</i>		0,668	
15-24	11 (22)		3,67 (0,17-77,55)
25-34	16 (32)		5,33 (0,26-110,80)
35-44	10 (20)		-
45-54	10 (20)		1,11 (0,08-15,04)
55 y más	3 (6)		Referencia
<i>Nivel de escolaridad</i>		0,713	
Primaria/ Secundaria	14 (28)		2,80 (0,22-35,29)
Preuniversitario/Técnico Medio	26 (52)		1,73 (0,25-11,97)
Universitario	10 (20)		Referencia
<i>Hábitos tóxicos</i>			
Hábito de Fumar	21 (42)	0,391	0,36 (0,06-2,16)
Ingestión de Alcohol	18 (36)	0,198	0,28 (0,05-1,69)

Fuente: Modelo de recogida de información.

En las mujeres, la infección por PVH está fuertemente relacionada con la edad, ya que la gran parte de estas infecciones son transitorias aproximadamente entre un 80% y 90% de las jóvenes (51). El patrón, que se produce poco después de la primera relación sexual, se atribuye generalmente a los elevados niveles de actividad sexual y a la falta de inmunidad frente al PVH (269).

Entre los HSH seropositivos a VIH, existen menos datos en cuanto a la relación entre la edad y la infección anal por el PVH. En estudios recientes (64, 70), donde se analizó la tendencia de la infección anal por PVH según la edad, se encontró una elevada prevalencia de infección por PVH en la mucosa anal que no disminuyó con la edad, independientemente del estado inmunológico de los pacientes. Los resultados del presente estudio coinciden con los hallazgos de las investigaciones descritas anteriormente. Esto muestra que la no asociación entre la edad y la infección anal por PVH, a diferencia de la infección en el cuello uterino, puede no deberse al estado inmunológico del paciente, sino que puede ser característico de las infecciones por PVH en el canal anal. Estos estudios ratifican que probablemente las infecciones por PVH tienen una mayor persistencia en el ano que en el cuello uterino (51).

El hábito de fumar también se asocia con la infección por PVH en la zona anogenital, fundamentalmente en mujeres y hombres heterosexuales. Sin embargo en los HSH, esta asociación aún carece de evidencias suficientes, lo que se atribuye principalmente a la elevada prevalencia de infección por PVH, independientemente de los hábitos tóxicos como el tabaquismo o el alcoholismo (90).

Tabla 19. Características epidemiológicas e infección por PVH en la mucosa anal de hombres seropositivos a VIH. Análisis Univariado.

<i>Variable</i>	<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>RP (IC 95%)</i>
<i>Pacientes</i>	50 (100)		
<i>Edad de las primeras relaciones sexuales</i>			
<15 años	18 (36)	0,362	2,81(0,30-24,98)
≥15 años	32 (64)		Referencia
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>		0,756	
1 pareja	16 (32)		Referencia
2-4	17 (34)		3,19 (0,30-33,89)
5-10	8 (16)		-
>10	9 (18)		0,84 (0,12-6,03)
<i>Orientación sexual</i>			
HSH	46 (92)	0,119	5,75 (0,79-41,69)
Heterosexual	4 (8)		Referencia
<i>Tipo de práctica de sexo</i>			
Oral/Genital	46 (92)	0,492	2,30 (0,21-24,80)
Genital	4 (8)		Referencia
<i>Historia de relaciones sexuales ano-receptivas</i>			
Si	45 (90)	0,032	9,00 (2,42-57,12)
No	5 (10)		Referencia

Fuente: Modelo de recogida de información.

Los análisis en el presente estudio (Tabla 19) mostraron una asociación entre la infección por PVH y la historia de relaciones sexuales anales con práctica ano-receptiva ($p=0,032$; $RP=9,00$ IC 95% 2,42-57,12). Tal relación indica una probabilidad 9 veces mayor de padecer infección anal por PVH, cuando el sexo anal receptivo es una práctica común. En la mayoría de los estudios epidemiológicos realizados en los HSH y particularmente en individuos seropositivos a VIH, los factores de riesgo para la infección por PVH que se identifican más frecuentemente son la práctica de relaciones sexuales ano-receptivas y un número elevado de parejas sexuales en los 6 meses previos a la toma de las muestras (90, 265).

En pacientes seropositivos a VIH el conteo de linfocitos T CD4+ es considerado un predictor de la infección anal por PVH (13). En esta investigación, no se observó asociación entre la infección por PVH y el conteo de linfocitos T CD4+. Definitivamente, las frecuencias de infección por PVH fueron muy elevadas en los pacientes estudiados, independientemente de su estado inmunológico. Otro factor de riesgo que se asocia a la infección por PVH es la historia reciente de lesiones condilomatosas. Se encontró asociación entre la presencia de condilomas y la infección por PVH ($p=0,005$; $RP= 6,89$ IC 95% 2,69-28,16). Este aspecto demostró una probabilidad casi 7 veces mayor de detectar infección por PVH en aquellos individuos con historia reciente de condilomas anogenitales. (Tabla 20). Además, un 80% de los individuos positivos a PVH (40/50) presentó infección con genotipos de PVH-BR que se asocian comúnmente con este tipo de lesiones (13, 270).

Tabla 20. Características clínicas e infección por PVH en la mucosa anal de hombres seropositivos a VIH. Análisis Univariado.

<i>Variable</i>	<i>Positivo a PVH n (%)</i>	<i>Valor de p</i>	<i>RP (IC 95%)</i>
<i>Pacientes</i>	50 (100)		
<i>Conteo de Linfocitos T CD4+ (células/mm³)</i>		0,451	
< 200	17 (34)		4,86 (0,38-62,63)
200-499	26 (52)		2,48 (0,34-17,83)
≥ 500	7 (14)		Referencia
<i>Presencia de condilomas</i>		0,005	
Sí	45 (90)		6,89 (2,69-28,16)
No	5 (10)		referencia

Fuente: Modelo de recogida de información.

IV.3.5 Relación entre los factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos y las lesiones detectadas en la mucosa anal de hombres cubanos seropositivos a VIH

Se analizó la relación entre las variables sociodemográficas, epidemiológicas y clínicas y la presencia de las lesiones intraepiteliales anales (13, 68). Los resultados pueden apreciarse en las tablas siguientes: variables sociodemográficas (Tabla 21), epidemiológicas (Tabla 22) y clínicas (Tabla 23).

En la Tabla 21 puede observarse que el mayor porcentaje de casos con LIEA se encontró en edades entre 25 y 34 años y los casos negativos se ubicaron con mayor frecuencia entre los 45 y 54 años. Aunque las lesiones precursoras y el CA es más frecuente en la población mayor de 50 años, los resultados del presente trabajo indican que las LIEA en pacientes seropositivos a VIH, pueden ser detectables en individuos más jóvenes (271, 272). Aunque en el presente estudio el número de casos es pequeño, los resultados obtenidos en este sentido se corresponden con los datos publicados en algunos estudios previos (271, 272), donde se plantea que la inmunosupresión y la infección anal persistente por PVH-AR puede conllevar a la aparición de LIEA en adultos jóvenes.

Varios autores han demostrado que no existe asociación del consumo de tabaco con estas lesiones (273, 274). En el presente estudio, se encontró un predominio de los casos con LIEA en individuos no fumadores (61%; 24/39). Estos resultados coinciden con otros autores que no asocian el hábito de fumar con la neoplasia intraepitelial anal (273, 274). Sin embargo, el número de casos analizados en esta investigación es pequeño y en cada estudio se debe tener en cuenta que existen sesgos asociados al tamaño de la muestra y a otros factores que deben ser analizados con mayor profundidad. El consumo de alcohol tampoco se identificó en el presente estudio, como una variable asociada a la presencia de LIEA (275).

Tabla 21. Características sociodemográficas y lesiones intraepiteliales anales en hombres seropositivos a VIH. Análisis Univariado.

Variables	Clasificación de las citologías anales			Valor de p	RP (IC 95%)
	Negativas n (%)	Atípicas n (%)	LIEA n (%)		
Total n=56	3 (5,4)	14 (25)	39 (69,6)		
Edad (años)				0,632 ^a 0,189 ^b	
15-24	0 (0)	4 (29)	8 (20)		1 (Referencia)
25-34	0 (0)	3 (21)	14 (36)		0,76 (0,12-4,70) ^a 1,32 (0,21-8,24) ^b
35-44	1 (33)	4 (29)	5 (13)		2,13 (0,48-9,50) ^a 0,25 (0,06-1,11) ^b
45-54	2 (67)	2 (14)	9 (23)		1,15 (0,56-8,53) ^a 0,39 (0,08-1,22) ^b
≥50	0 (0)	1(7)	3 (8)		0,85 (0,14-5,36) ^a 0,69 (0,13-3,68) ^b
Nivel de escolaridad				0,310 ^a 0,242 ^b	
Primaria/Secundaria	0 (0)	2 (14)	13 (33)		1 (Referencia)
Pre-Universitario /Técnico	3 (100)	7 (50)	18 (46)		0,25 (0,04-1,58) ^a 4,06 (0,63-26,13) ^b
Universidad	0 (0)	5 (36)	8 (21)		0,53 (0,13-2,18) ^a 1,13 (0,29-4,38) ^b
Hábito de fumar	Sí	2 (67)	7 (50)	0,533 ^a 0,314 ^b	1,47 (0,44-4,96) ^a 0,55 (0,18-1,76) ^b
Ingestión de alcohol	Sí	1 (33)	8 (57)	0,158 ^a 0,233 ^b	2,40 (0,70-8,23) ^a 0,50 (0,16-1,28) ^b

Fuente: Modelo de recogida de información.

a: con respecto a las citologías atípicas de significado indeterminado; **b:** con respecto a las LIEA que incluyen las lesiones de alto y bajo grado y las atípicas de alto grado.

La edad del comienzo las relaciones sexuales no constituyó una variable asociada al desarrollo de las LIEA. De los individuos con LIEA, los que comenzaron sus relaciones sexuales con 15 años o menos representaron el 41% (16/39). Un 92% (36/39) se describieron a sí mismos como HSH, 90% (35/39) tuvo historia de relaciones sexuales ano-receptivas y 97% (38/39) practicaban sexo oral/genital (Tabla 22).

El inicio temprano de las relaciones sexuales desprotegidas es un comportamiento sexual de riesgo para el desarrollo de las neoplasias intraepiteliales anales. En este estudio, un 66,7% de los casos con LIEA de alto grado, comenzaron sus relaciones sexuales antes de los 15 años. Esto se asocia a un período de tiempo más prolongado de vida sexual activa, al aumento del número de parejas sexuales y a la adquisición de ITS, como es el caso del VIH. En los pacientes con infección por VIH, este agente se reconoce también como un factor de riesgo para adquirir la infección por PVH y a su vez para la persistencia viral, lo cual se explica por la incapacidad de eliminar el virus del organismo. La interpretación antes mencionada, se corresponde con los

datos publicados y los análisis sobre el tema que han sido planteados por otros autores, fundamentalmente en estudios realizados en individuos seropositivos a VIH en Australia, Brasil, México y Estados Unidos (11, 91).

Tabla 22. Características epidemiológicas y lesiones intraepiteliales anales en hombres seropositivos a VIH. Análisis Univariado.

Variables	Clasificación de las citologías anales			Valor de p	RP (IC 95%)
	Negativas n (%)	Atípicas n (%)	LIEA n (%)		
Total n=56	3 (5,4)	14 (25)	39 (69,6)		
Primera relación sexual (años)				0,106 ^a 0,089 ^b	
<15	1 (33)	2 (14)	16 (41)		1 (Referencia)
≥15	2 (67)	12 (86)	23 (59)		4,08 (0,81-20,59) ^a 0,31 (0,08-1,25) ^b
Parejas sexuales referidas en los últimos dos años				0,573 ^a 0,287 ^b	
1	2 (67)	6 (43)	11 (28)		1 (Referencia)
2-4	1 (33)	5 (36)	12 (31)		0,83 (0,20-3,43) ^a 1,46 (0,38-5,54) ^b
5-10	0 (0)	2 (14)	6 (15)		0,72 (0,11-4,69) ^a 2,18 (0,35-13,76) ^b
>10	0 (0)	1 (7)	10 (26)		0,22 (0,02-2,10) ^a 7,27 (0,77-68,89) ^b
Orientación sexual				0,158 ^a 0,354 ^b	
HSH	3 (100)	11 (79)	36 (92)		0,28 (0,05-1,60) ^a 2,57 (0,46-14,29) ^b
Heterosexual	0 (0)	3 (21)	3 (8)		1 (Referencia)
Relaciones sexuales Ano-receptivas	Sí	3 (100)	9 (64)	35 (90)	0,035^a 0,112 ^b 3,65 (0,84-15,85) ^b
Tipo de práctica de sexo				0,094 ^a 0,026^b	
Oral y Genital	2 (67)	11 (79)	38 (97)		0,18 (0,3-1,24) ^a 11,69 (1,20-114,31)^b
Genital	1 (33)	3 (21)	1 (3)		1 (Referencia)

Fuente: Modelo de recogida de información.

a: con respecto a las citologías atípicas de significado indeterminado; **b:** con respecto a las LIEA que incluyen las lesiones de alto y bajo grado y las atípicas de alto grado.

El número de parejas sexuales se asocia con un mayor riesgo de adquirir ITS, entre ellas las infecciones por PVH-AR y a su vez con el desarrollo de lesiones causadas por estos virus (276). Sin embargo, en el presente estudio no se encontró este tipo de asociación entre el número de parejas sexuales y la presencia de LIEA.

La orientación sexual de los HSH seropositivos a VIH, las prácticas de sexo oral/genital y las relaciones sexuales ano-receptivas, son variables conductuales y epidemiológicas que tienen vinculación con comportamientos sexuales de alto riesgo asociados a la presencia de ITS, incluida la infección por PVH. En el

presente estudio, las lesiones anales de alto grado predominaron entre los individuos que mantenían relaciones sexuales ano-receptivas (90%; 35/39). Además, la práctica de sexo oral/genital se asoció con la presencia de lesiones anales de alto grado ($p=0,026$; $RP=11,69$ IC 95% 1,20-114,31).

Como es conocido, la práctica de sexo oral/genital se describe como un factor de riesgo para adquirir la infección con PVH, pues se ha comprobado la transmisión del virus mediante la saliva y otros fluidos. Estos resultados se han obtenido principalmente en grupos de individuos seropositivos a VIH, sobre todo en HSH y también en mujeres. En dichos grupos, el riesgo de padecer CA se puede incrementar desde 5 hasta 27 veces más que en la población seronegativa a VIH (277).

Por otra parte las relaciones sexuales ano-receptivas, se confirman como la mayor vía de transmisión de la infección por PVH en el canal anal de los HSH, seropositivos a VIH y también en seronegativos. Es reconocido el efecto abrasivo del coito sobre la mucosa anal, además de que en los HSH seropositivos a VIH se identifican factores asociados a la infección por PVH en ano, tales como: el cambio frecuente de parejas sexuales, la persistencia viral, que pudiera ser más prolongada y la inmunidad tipo específica que pudiera ser efímera, lo que aumenta la susceptibilidad a las reinfecciones, luego de nuevas exposiciones al virus (278).

Se encontró una asociación inversa entre las relaciones sexuales ano-receptivas y las citologías atípicas de significado indeterminado, por lo que esta variable constituyó un factor protector para el desarrollo de dichas lesiones. Este resultado no se corresponde con lo descrito en la literatura y carece de explicación biológica, puede ser atribuido a que, en este estudio, las asociaciones están limitadas por el pequeño número de individuos analizados.

Tabla 23. Características clínicas y lesiones intraepiteliales anales en hombres seropositivos a VIH. Análisis Univariado.

Variables	Clasificación de las citologías anales			Valor de p	RP (IC 95%)
	Negativas n (%)	Atípicas n (%)	LIEA n (%)		
Total n=56	3 (5,4)	14 (25)	39 (69,6)		
Conteo de CD4 en el momento del estudio (células/mm ³)				0,178 ^a 0,322 ^b	
	<200	1 (33)	15 (35)	14 (36)	0,17 (0,02-1,20)a 3,73 (0,61-22,86)b
	200-500	2 (67)	22 (52)	20 (51)	0,46 (0,10-2,13)a 1,60 (0,35-7,30)b
	>500	0 (0)	5 (12)	5 (13)	1 (Referencia)
Presencia de condilomas	Sí	1 (33)	10 (71)	36 (92)	0,206 ^a 0,012^b 6,13 (1,49-25,22)b

Fuente: Modelo de recogida de información.

a: con respecto a las citologías atípicas de significado indeterminado; **b:** con respecto a las LIEA que incluyen las lesiones de alto y bajo grado y las atípicas de alto grado.

El conteo de linfocitos T CD4+ y la presencia de condilomas, como ITS más frecuente en este grupo, se analizaron en las diferentes clasificaciones citológicas (Tabla 23).

En el presente estudio, las LIEA de alto grado predominaron en individuos con conteo de linfocitos T CD4+ en el rango de 200-500 células/mm³, lo que corresponde a una inmunodepresión moderada. La infección anal persistente por PVH, con genotipos de PVH-AR y la inmunosupresión severa son los factores de riesgo de mayor fortaleza en la aparición de la neoplasia intraepitelial anal.

La importancia de los linfocitos T CD4+ en el control de la infección por PVH se muestra por el incremento de la prevalencia de infección por PVH y de LIEA de alto grado en individuos inmunodeprimidos como una consecuencia de la infección por el VIH (279). La prolongada duración de la infección por PVH, se asocia con la evasión efectiva de la inmunidad innata, reflejada en la deficiente inflamación durante la replicación viral (279). Todas las lesiones atípicas de alto grado se identificaron en individuos con conteo de linfocitos T CD4+ menores de 200 células/mm³. Esta clasificación citológica es considerada como una citología anormal, con un riesgo elevado de progresión rápida a la neoplasia anal (279).

Aunque la presencia de condilomas se debe específicamente a la infección con genotipos de bajo riesgo oncogénico y dichos genotipos no se asociaron con ningún tipo de lesión en el presente estudio; la presencia de condilomas sí se asoció a la detección de citologías anales positivas (LIEA de bajo grado, de alto grado y atípicas de alto grado), en esta investigación ($p=0,012$; $RP=6,13$ IC 95% 1,49-25,22). Además, un 84,8% de los casos con condilomas acuminados anogenitales, estaban infectados con genotipos oncogénicos de PVH.

En la mayoría de los estudios sobre el tema, existe la observación de que en casi un 90% de los pacientes con lesiones anales de alto grado causadas por PVH-AR se detectan condilomas anogenitales. El mecanismo que pudiera explicar esta asociación no ha podido ser dilucidado. Esto pudiera explicarse por el hecho de que ambos genotipos comparten una vía de transmisión común y están sujetos a la influencia de comportamientos sexuales de riesgo que determinan la susceptibilidad a la adquisición y transmisibilidad de estas infecciones (280).

Esta investigación es la primera que, en Cuba, realiza la detección de PVH en la mucosa anal de hombres seropositivos a VIH. Además, se realizó un estudio citológico anal para establecer la presencia de lesiones precursoras de este tipo de neoplasia y su asociación con determinados genotipos de PVH, así como con otras variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas. La importancia de este estudio radica en que se evidencia la elevada frecuencia de infección por PVH en la mucosa anal de estos individuos, la presencia de genotipos de alto riesgo oncogénico y un gran número de coinfecciones.

CAPÍTULO V
DISCUSIÓN INTEGRADA

V DISCUSIÓN INTEGRADA

Los tumores malignos constituyen la primera causa de muerte en todo el planeta y en Cuba existe una tendencia similar (6, 7). La incidencia de los tumores del tracto genital inferior en mujeres y hombres, incluyendo aquellos localizados en la región anal y perianal, ha mostrado un incremento en los últimos 20 años (6, 7).

En Cuba, el cáncer cervicouterino (CC) constituye una de las primeras causas de muerte por cáncer en la mujer y el cáncer anal (CA) representa un 5% de las neoplasias gastrointestinales. Estas patologías son más frecuentes en determinados grupos de riesgo (9). El CC incrementa su incidencia en mujeres mayores de 30 años, en las que aparecen lesiones intraepiteliales cervicales precursoras de esta enfermedad (2, 3). Sin embargo, como es conocido la infección persistente con PVH-AR constituye el factor desencadenante de estas lesiones y dicha infección puede ser detectada y monitoreada incluso desde edades más tempranas (1). El CA está asociado a la infección con PVH-AR y es mucho más frecuente en individuos inmunocomprometidos, específicamente en hombres seropositivos a VIH. Este constituye otro grupo de riesgo donde la detección precoz de la infección viral persistente y de LIEA precursoras del CA contribuye a la prevención y el control de la enfermedad (11).

Hasta el momento, la información sobre los genotipos de PVH que circulan en diferentes grupos de la población cubana era muy limitada. No se conocían los predictores de la infección con PVH-AR ni existía información suficiente acerca de las variables asociadas a las enfermedades causadas por estos genotipos. Además, no se habían aplicado las técnicas de detección de ADN de PVH, genotipificación o monitoreo de la carga viral para su diagnóstico y seguimiento.

El uso de la vacunación contra PVH se ha definido actualmente como un elemento esencial en la estrategia para la prevención y el control del CC y de otros tipos de cáncer asociados a estos virus, como el cáncer anal. Es por ello que, los estudios moleculares para definir la prevalencia de los tipos oncogénicos de PVH y los factores asociados a las lesiones intraepiteliales cervicales y anales son fundamentales para determinar la factibilidad de la vacunación en la población cubana.

El presente estudio permitió conocer la prevalencia de los genotipos oncogénicos de Papilomavirus humanos en todos los grupos de individuos estudiados, así como la frecuencia de lesiones intraepiteliales cervicales y anales en dichos individuos, en el período analizado. Además permitió identificar las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas asociadas con el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino y anal en los grupos de riesgo analizados.

Dentro del programa de detección precoz del CC en Cuba, no se incluye la detección molecular de PVH. La detección viral constituye actualmente una herramienta de gran utilidad para la pesquisa de las lesiones precursoras del CC, para su prevención y monitoreo (281). Los resultados del presente trabajo indican la necesidad de inclusión de las técnicas moleculares para la detección de Papilomavirus humanos como herramienta en el diagnóstico temprano y seguimiento de las lesiones precursoras del CC, en los casos que así lo requieran y en la etapa del programa más oportuna.

En esta investigación se pudieron identificar los genotipos oncogénicos PVH-AR 16 y 18, cómo los más frecuentes, además de otros genotipos de alto riesgo oncogénico como PVH 31, 33, 45 y 58 que son los causantes de los mayores porcentajes de infecciones persistentes. Aunque las mujeres jóvenes se infectan con PVH de manera muy frecuente, generalmente en un período de 12 meses, esta infección es controlada por el sistema inmune, incluso puede cursar con la presencia de lesiones de bajo grado o de forma subclínica (108, 194). Cuando en este grupo de mujeres menores de 25 años, se identifican infecciones virales persistentes con PVH-AR y lesiones cervicales de alto grado, es necesario tener en cuenta que las mismas no están incluidas en el universo del programa para la detección precoz del CC que se lleva a cabo en Cuba (8). Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, las mujeres sexualmente activas, menores de 25 años, constituyen una población vulnerable para el desarrollo precoz de lesiones precursoras del cáncer cervical o lesiones de alto grado. En este estudio, dichas lesiones se asociaron al inicio temprano de las relaciones sexuales, antes de los 14 años. Las jóvenes que comienzan tempranamente las relaciones sexuales constituyen un grupo de riesgo identificado por el sistema de salud cubano (8). Sin embargo, ante los hallazgos del presente estudio, sería oportuna la realización de una investigación mucho más amplia en mujeres jóvenes, particularmente con edades entre 15 y 25 años. Esto permitiría identificar infecciones persistentes con genotipos de PVH-AR mediante técnicas moleculares y definir la problemática en este grupo etario. Además sería conveniente la realización de estudios de línea de base en la población femenina cubana.

Los resultados obtenidos en el grupo de mujeres entre 15 y 59 años aportan datos de interés y justifican, desde el punto de vista científico, el empleo de la vacuna profiláctica contra PVH en niñas cubanas, antes de los 10 años

de edad. Permiten además, confirmar la importancia de las pruebas de detección de PVH en el programa de detección precoz del CC, así como el fortalecimiento de los programas de educación sexual y de promoción de salud en la población sexualmente activa.

La edad media de las mujeres con lesiones de alto grado es de aproximadamente 30 años (77). Las mujeres con esta edad o mayores, que son positivas para PVH-AR, tienen una probabilidad incrementada de desarrollar infecciones persistentes y lesiones precursoras del cáncer invasivo. Los cánceres invasivos casi siempre se detectan alrededor de una década más tarde en las mujeres con lesiones de alto grado. Por lo tanto, la etapa premaligna puede ser prolongada y crucial en la aparición del CC (78). Su evolución depende, tanto de factores de riesgo externos, como de factores virales y del hospedero. En las mujeres mayores de 30 años con NIC estudiadas se identificaron genotipos oncogénicos en casi 98% de las muestras positivas a PVH, los genotipos 16, 18 y 45 se asociaron de manera significativa a la presencia de CC. Además, se demostró el valor de la carga viral de los genotipos oncogénicos 16, 18 y 58 como un marcador de severidad de las lesiones precursoras de CC. El valor de la carga viral se ha identificado en numerosos estudios como un marcador de severidad y progresión, útil para el seguimiento de las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino y anal, incluso se ha propuesto como un biomarcador viral en muchos algoritmos que se plantean para un cambio futuro en los programas de prevención y control del CC (238-240). Es por ello que dentro del fortalecimiento de los programas se incluyen medidas de prevención más eficaces, como la vacunación y el uso de los métodos moleculares para la detección de PVH y el monitoreo de la carga viral, lo cual no excluye a la citología como primer eslabón en la pesquisa de las lesiones precursoras y del CC, sino que sería un complemento para incidir de manera sustancial en su disminución (281).

En el presente estudio se encontró una elevada prevalencia de genotipos de Papilomavirus humanos de alto riesgo oncogénico en mujeres con citología negativa, un porcentaje mucho más elevado a lo que describe la literatura para las citologías negativas o con lesiones de bajo grado (220). Como es conocido, el Sistema de Clasificación Citológica de Bethesda, 2001 incluye las citologías con atipias celulares de significado indeterminado. Se ha demostrado que hasta un 40% de estas atipias pueden evolucionar hacia la malignidad cuando en ellas se detecta la infección persistente con PVH-AR. Aunque en el presente trabajo no se obtuvieron evidencias concluyentes, pudiera hacerse el razonamiento de que las citologías atípicas pudieran estar incluidas dentro de las negativas a células neoplásicas o pudieran haberse clasificado como NIC I. Debido a esto, la elevada frecuencia de infección por PVH-AR en estos grupos pudiera atribuirse a la presencia de lesiones atípicas que no se consideran en el sistema de clasificación citológica empleado en

Cuba. Este hallazgo permite recomendar al Programa Nacional para el Control del Cáncer Cervicouterino, realizar estudios comparativos prospectivos que permitieran reevaluar y actualizar el sistema de clasificación citológica según la Clasificación de Bethesda, 2001.

Es conocido el papel de las infecciones por PVH en el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer en otras localizaciones del tracto genital inferior, además del cuello uterino, como la vulva o la vagina. El ano es también un órgano donde la infección con PVH-AR puede conllevar al desarrollo de lesiones precursoras y cáncer anal (CA). La transmisión de la infección es muy frecuente a esta región anatómica, tanto en mujeres como en hombres, debido a la cercanía a la vagina o a las prácticas sexuales que incluyen sexo anal (10).

El CA en la población general no suele ser muy frecuente, aunque su incidencia se ha incrementado en los últimos años, sobre todo en grupos específicos de individuos con algún tipo de inmunocompromiso, como es el caso de aquellos que viven con VIH/sida (11, 13), fundamentalmente los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH). La relación causal entre la infección por PVH y el CA se ha establecido sobre la base de suficientes evidencias (11, 13). Sin embargo, aunque la mayoría de los HSH se infecta con algún genotipo de PVH por lo menos una vez en su vida, la mayoría no desarrollará el CA (11, 13).

En esta investigación se realiza por primera vez en Cuba, la detección de Papilomavirus humanos y de lesiones precursoras del cáncer anal en hombres seropositivos a VIH y los resultados evidencian la elevada prevalencia de genotipos oncogénicos y de coinfecciones. Además, se detecta un gran número de casos con algún tipo de anomalía citológica. Esta es una de las poblaciones de riesgo más propensa al desarrollo de lesiones anales causadas por PVH, fundamentalmente porque son individuos inmunocomprometidos y porque la infección por PVH en el ano se caracteriza por largos períodos de persistencia viral (278). La comunidad científica internacional ha unido sus esfuerzos e investigaciones para el desarrollo de un programa de detección precoz del CA en los grupos de riesgo más vulnerables (277). La elevada prevalencia de genotipos oncogénicos de PVH encontrada en esta población y su asociación con las lesiones intraepiteliales anales, constituye un hallazgo de interés clínico y epidemiológico. Esta información es de gran utilidad, para considerar la introducción en Cuba de la pesquisa y el seguimiento del CA y sus lesiones precursoras en HSH. Es importante destacar que en estos individuos se detectaron, de manera más frecuente los tipos de PVH que se incluyen en todas las formulaciones vacunales contra PVH aprobadas por la FDA.

En esta investigación se identifican, por primera vez en grupos de individuos cubanos, las variables predictivas para la infección por PVH detectado por técnicas moleculares. Fundamentalmente, el hábito de fumar y el uso de anticonceptivos orales en las mujeres; así como la práctica sexual oral-genital y ano-

receptiva en los hombres seropositivos a VIH. Esta información, aporta una herramienta valiosa en la prevención, el manejo clínico, tratamiento y seguimiento de las lesiones precursoras y la progresión al cáncer cervicouterino y anal. Los resultados obtenidos sobre la relación entre las variables clínicas y epidemiológicas predictivas de la infección viral y para desarrollar lesiones de alto grado o cáncer contribuyen al conocimiento de la interacción virus-hospedero en relación con la identificación de puntos vulnerables en la educación sexual de la población y en el papel de la atención primaria de salud.

Los estudios de epidemiología molecular realizados a escala global van un paso más allá en la etapa actual, pues han permitido identificar los genotipos de PVH que circulan en cada área geográfica y así demostrar la factibilidad de la aprobación de las vacunas profilácticas diseñadas contra PVH. La vacuna Gardasil ®9 incluye cinco genotipos de PVH-AR (PVH 31, 33, 45, 52 y 58), además de 16 y 18. Su uso permitía la prevención de aproximadamente 90% de los casos, lo cual sería el camino a la erradicación del CC (135-137).

Esta investigación, fue realizada en grupos de individuos residentes solo en La Habana y aunque los resultados no pueden ser extrapolados al resto de las provincias, aporta información importante y novedosa. La Habana tiene como particularidad, la de ser una capital cosmopolita, además de contar con el mayor porcentaje de migraciones desde otras provincias, por lo que los datos describen una situación a tener en cuenta.

La importancia de este estudio radica en aportar información, desde el punto de vista científico, para demostrar que no se cuenta actualmente con todas la herramientas para actuar de manera eficiente en la prevención, detección precoz y control de las neoplasias del tracto genital inferior. La citología cervicouterina no debe ser la única herramienta que tenga el sistema de salud pública para estos propósitos en la época actual.

Los resultados obtenidos en esta investigación han permitido identificar varios aspectos que podrían mejorar la prevención, detección precoz y el manejo de las lesiones precursoras de cáncer cervicouterino. Se debe valorar la inclusión de los métodos de detección de ADN de PVH, el empleo de la citología anal como un método de pesquisa y detección precoz del CA, la actualización del sistema de clasificación citológica empleado en Cuba según el Sistema de Clasificación Citológica Bethesda 2001 y la posibilidad de incluir dentro del programa nacional de inmunización la vacunación contra PVH para los grupos etarios establecidos en las normas internacionales.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

- La elevada prevalencia de genotipos de Papilomavirus humanos de alto riesgo oncogénico y la frecuencia de lesiones intraepiteliales cervicales y anales en los individuos estudiados, evidencia la necesidad de establecer un método de pesquisa virológica y seguimiento en estas poblaciones.
- Las mujeres sexualmente activas, menores de 25 años, constituyen una población vulnerable para el desarrollo precoz de lesiones precursoras del cáncer cervical, lo cual apoya la necesidad de realizar investigaciones más amplias en estos grupos etarios y estudios de línea de base en la población cubana.
- La elevada prevalencia de genotipos de Papilomavirus humanos de alto riesgo oncogénico en mujeres con citología negativa constituye un hallazgo sobre la posibilidad de atipias celulares asociadas a la infección y que deben ser estudiadas con mayor profundidad desde el punto de vista citológico.
- La determinación de las variables epidemiológicas predictoras de la infección con genotipos oncogénicos y de lesiones cervicales y anales, aporta una herramienta valiosa en el manejo clínico, tratamiento y monitoreo de la progresión al cáncer en estas localizaciones.
- La carga viral de Papilomavirus humanos constituye un marcador de severidad y progresión, útil para el seguimiento de las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino y anal.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

VII RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio con un mayor número de muestras y hacerlo extensivo a otras provincias del país.
- Recomendar al Programa Nacional para el Control del Cáncer Cervicouterino la introducción de las pruebas moleculares para la detección de Papilomavirus humanos, en los casos que así lo requieran y evaluar la actualización del sistema de clasificación citológica según el Sistema Bethesda, 2001; mediante un estudio comparativo prospectivo.
- Profundizar en los estudios de detección de Papilomavirus humanos de alto riesgo oncogénico y lesiones anogenitales en mujeres sexualmente activas, entre 15 y 25 años y en hombres.
- Proponer al MINSAP considerar la introducción de la vacunación contra Papilomavirus humanos en Cuba.

CAPÍTULO VIII
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.
2. Arbyn M, Simoens C, Van Damme P, Scharpantgen A, Meijer CJ, Beutels P. Introduction of human papillomavirus vaccination in Belgium, Luxembourg and the Netherlands. *Gynecol Obstet Invest*. 2010;70(4):224-32.
3. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Forman D, Lacey CJ, Soerjomataram I, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012;30 (5):F12-23.
4. Neimark AI, Shelkownikova NV, Neimark BA, Sizovv KA. The role of human papilloma virus in development of chronic urethritis and vulvodinia in females: perspectives of immunomodulating therapy. *Urology*. 2012(2):35-8.
5. Gheit T, Tommasino M. Detection of high-risk mucosal human papillomavirus DNA in human specimens by a novel and sensitive multiplex PCR method combined with DNA microarray. *Methods Mol Biol*. 2011;665:195-212.
6. Galán Y, Fernández L, Torres P, García M. Trends in Cuba's Cancer Incidence (1990 to 2003) and Mortality (1990 to 2007) MEDICC Review. 2009;11(3):19-26.
7. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. Cuba: ICO Information Centre on HPV and Cancer, 2014.
8. Cabezas E, Camacho T, Santana A, Borrajero I, Aguilar F, Romero T, et al. Programa Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello del Útero en Cuba. La Habana, Cuba: Ministerio de Salud Pública de Cuba; 2001.
9. Anuario Estadístico de Salud 2014. La Habana: Oficina Nacional de Estadísticas e Información de la Dirección Nacional de Registros Médicos del Ministerio de Salud Pública de Cuba; 2015. p. 66-83.
10. Driak D, Sehnal B. Significance of human papillomavirus infections. *Cas Lek Cesk*. 2013;152(1):15-9.
11. Machalek DA, Poynten M, Jin F, Fairley CK, Farnsworth A, Garland SM, et al. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2012;13(5):487-500.
12. Sahasrabudde VV, Castle PE, Follansbee S, Borgonovo S, Tokugawa D, Schwartz LM, et al. Human papillomavirus genotype attribution and estimation of preventable fraction of anal intraepithelial neoplasia cases among HIV-infected men who have sex with men. *J Infect Dis*. 2013;207(3):392-401.
13. Schwartz LM, Castle PE, Follansbee S, Borgonovo S, Fetterman B, Tokugawa D, et al. Risk factors for anal HPV infection and anal precancer in HIV-infected men who have sex with men. *J Infect Dis*. 2013;208(11):1768-75.
14. Ríos MA, Hernández M, Aguilar FO, Silveira M, Amigó M, Aguilar K. Tipos de papilomavirus humanos más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical. *Rev Cubana Obst Ginecol*. 2010;36(2):104-11.
15. Ciuffo G. Innesso positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol*. 1907;48:12-7.
16. Sundberg JP. Papillomaviruses and Human Diseases. In: Syrjanen K, Gissmann LL, Koss LG, editors. *Papillomavirus infections in animals*. Berlin: Springer-Verlag; 1987. p. 40-103.

17. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med.* 1933;58:607-24.
18. Onon TS. History of human papillomavirus, warts and cancer: what do we know today? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(5):565-74.
19. Meyers C, Frattini MG, Hudson JB, Laimins LA. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science.* 1992;257(5072):971-3.
20. Danos O, Engel LW, Chen EY, Yaniv M, Howley PM. Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J Virol.* 1983;46(2):557-66.
21. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974;13(5):650-6.
22. zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol.* 1975(43):569-71.
23. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(12):3812-5.
24. Pecoraro G, Lee M, Morgan D, Defendi V. Evolution of in vitro transformation and tumorigenesis of HPV16 and HPV18 immortalized primary cervical epithelial cells. *Am J Pathol.* 1991;138(1):1-8.
25. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
26. Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: an update. *J Cancer Res Ther.* 2011;7(2):120-7.
27. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
28. Bernard HU. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect Genet Evol.* 2013;18:357-61.
29. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-9.
30. Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol.* 2005;79(11):7014-23.
31. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology.* 2013;445(1-2):232-43.
32. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 2005;337(1):76-84.
33. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology. II.* 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2300-54.
34. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286-302.
35. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 2009;19(2):97-113.
36. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, 3rd, Durst M, et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral

- E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*. 1987;6(12):3745-53.
37. Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol*. 2008;82(11):5190-7.
 38. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30 (5):55-70.
 39. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013;445(1-2):115-37.
 40. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-60.
 41. Rautava J, Syrjanen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol*. 2012;6 (1):3-15.
 42. Letian T, Tianyu Z. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Virol J*. 2010;7:2.
 43. Smith JL, Campos SK, Ozbun MA. Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol*. 2007;81(18):9922-31.
 44. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*. 2004;117(3):349-60.
 45. Ozbun MA. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes and the onset of early transcription. *J Virol*. 2002;76(22):291-300.
 46. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11-22.
 47. Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(10):1700-17.
 48. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*. 2002;76(19):109-14.
 49. Pagliusi SR. HPV technologies advancing public health: discussion of recent evidence. *Coll Antropol*. 2007;31 (2):55-60.
 50. Mougin C, Nicolier M, Mo L. Mechanisms in the carcinogenesis of the papillomavirus. *Rev Prat*. 2006;56(17):1890-2.
 51. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006;24 (3):42-51.
 52. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24 (1):1-15.
 53. Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(1):21-31.
 54. Giuliano AR, Lu B, Nielson CM, Flores R, Papenfuss MR, Lee JH, et al. Age-specific prevalence, incidence, and duration of human papillomavirus infections in a cohort of 290 US men. *J Infect Dis*. 2008;198(6):827-35.
 55. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*. 2011;19(1):33-9.
 56. Diaz D, Santander MA, Chavez JA. HPV-16 E6 and E7 oncogene expression is downregulated as a result of Mdm2 knockdown. *Int J Oncol*. 2012;41(1):141-6.
 57. Perez-Plasencia C, Duenas-Gonzalez A, Alatorre-Tavera B. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *Int Arch Med*. 2008;1(1):10.

58. Vaccarella S, Soderlund-Strand A, Franceschi S, Plummer M, Dillner J. Patterns of human papillomavirus types in multiple infections: an analysis in women and men of the high throughput human papillomavirus monitoring study. *PLoS One*. 2013;8(8):716-17.
59. Giambi C, Donati S, Carozzi F, Salmaso S, Declich S, Atti ML, et al. A cross-sectional study to estimate high-risk human papillomavirus prevalence and type distribution in Italian women aged 18-26 years. *BMC Infect Dis*. 2013;13:74.
60. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011;128(4):927-35.
61. Trottier H, Ferreira S, Thomann P, Costa MC, Sobrinho JS, Prado JC, et al. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Res*. 2010;70(21):869-77.
62. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005;191(11):1808-16.
63. Watson AJ, Smith BB, Whitehead MR, Sykes PH, Frizelle FA. Malignant progression of anal intraepithelial neoplasia. *ANZ J Surg*. 2006;76(8):715-7.
64. Chin-Hong PV, Vittinghoff E, Cranston RD, Buchbinder S, Cohen D, Colfax G, et al. Age-Specific prevalence of anal human papillomavirus infection in HIV-negative sexually active men who have sex with men: the EXPLORE study. *J Infect Dis*. 2004;190(12):2070-6.
65. Palefsky JM, Holly EA, Efirdc JT, Da Costa M, Jay N, Berry JM, et al. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. *AIDS*. 2005;19(13):1407-14.
66. de Pokomandy A, Rouleau D, Ghattas G, Vezina S, Cote P, Macleod J, et al. Prevalence, clearance, and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *J Infect Dis*. 2009;199(7):965-73.
67. Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res*. 2014;24(2):185-99.
68. del Amo J, Gonzalez C, Geskus RB, Torres M, Del Romero J, Viciano P, et al. What drives the number of high-risk human papillomavirus types in the anal canal in HIV-positive men who have sex with men? *J Infect Dis*. 2013;207(8):1235-41.
69. Chin-Hong PV, Vittinghoff E, Cranston RD, Browne L, Buchbinder S, Colfax G, et al. Age-related prevalence of anal cancer precursors in homosexual men: the EXPLORE study. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(12):896-905.
70. Vajdic CM, van Leeuwen MT, Jin F, Prestage G, Medley G, Hillman RJ, et al. Anal human papillomavirus genotype diversity and co-infection in a community-based sample of homosexual men. *Sex Transm Infect*. 2009;85(5):330-5.
71. Fox PA, Seet JE, Stebbing J, Francis N, Barton SE, Strauss S, et al. The value of anal cytology and human papillomavirus typing in the detection of anal intraepithelial neoplasia: a review of cases from an anoscopy clinic. *Sex Transm Infect*. 2005;81(2):142-6.
72. Van Doorslaer K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology*. 2013;445(2):11-20.

73. Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(3):792-800.
74. Nyitray AG, Iannacone MR. The epidemiology of human papillomaviruses. *Curr Probl Dermatol.* 2014;45(2):75-91.
75. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA.* 2007;297(8):813-9.
76. Weinstock H, Berman S, Cates W, Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health.* 2004;36(1):6-10.
77. Howell-Jones R, de Silva N, Akpan M, Oakeshott P, Carder C, Coupland L, et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) infections in sexually active adolescents and young women in England, prior to widespread HPV immunisation. *Vaccine.* 2012;30(26):3867-75.
78. Baldauf JJ, Fender M, Akladios CY, Velten M. Is early cervical cancer screening justified? *Gynecol Obstet Fertil.* 2011;39(6):358-63.
79. Burchell AN, Coutlee F, Tellier PP, Hanley J, Franco EL. Genital transmission of human papillomavirus in recently formed heterosexual couples. *J Infect Dis.* 2012;204(11):1723-9.
80. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1789-99.
81. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Ning L, et al. Acquisition of anal human papillomavirus (HPV) infection in women: the Hawaii HPV Cohort study. *J Infect Dis.* 2008;197(7):957-66.
82. Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X, Wilkens LR, Killeen J, Kessel B, et al. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(11):2550-6.
83. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 2006;354(25):2645-54.
84. Bedford S. Cervical cancer: physiology, risk factors, vaccination and treatment. *Br J Nurs.* 2009;18(2):80-4.
85. Smith JS, Gilbert PA, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of human papillomavirus infection in males: a global review. *J Adolesc Health.* 2011;48(6):540-52.
86. Dona MG, Palamara G, Di Carlo A, Latini A, Vocaturo A, Benevolo M, et al. Prevalence, genotype diversity and determinants of anal HPV infection in HIV-uninfected men having sex with men. *J Clin Virol.* 2012;54(2):185-9.
87. Damay A, Fabre J, Costes V, Didelot JM, Didelot MN, Boulle N, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and type distribution, and HPV-associated cytological abnormalities in anal specimens from men infected with HIV who have sex with men. *J Med Virol.* 2010;82(4):592-6.
88. Nyitray AG, Smith D, Villa L, Lazcano-Ponce E, Abrahamsen M, Papenfuss M, et al. Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection in men who have sex with women: a cross-national study. *J Infect Dis.* 2010;201(10):1498-508.
89. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis.* 2006;194(8):1044-57.

90. Goldstone S, Palefsky JM, Giuliano AR, Moreira ED, Jr., Aranda C, Jessen H, et al. Prevalence of and risk factors for human papillomavirus (HPV) infection among HIV-seronegative men who have sex with men. *J Infect Dis.* 2011;203(1):66-74.
91. Machalek DA, Grulich AE, Jin F, Templeton DJ, Poynten IM. The epidemiology and natural history of anal human papillomavirus infection in men who have sex with men. *Sex Health.* 2012;9(6):527-37.
92. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine.* 2013;31 (7):1-31.
93. Guimaraes MD, Grinsztejn B, Melo VH, Rocha GM, Campos LN, Pilotto JH, et al. Anal HPV prevalence and associated factors among HIV-seropositive men under antiretroviral treatment in Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;57 Suppl 3:S217-24.
94. Blanco OA, Soto Y, Blanco B, Acosta S, Capó de Paz V, Toledo ME. Detección y tipificación de papilomavirus humano en lesiones condilomatosas anogenitales de hombres cubanos seropositivos al VIH-1. *Rev Invest Biomed.* 2011; 22(1): 21-30.
95. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005;32 (1):16-24.
96. Chang GJ, Welton ML. Human papillomavirus, condylomata acuminata, and anal neoplasia. *Clin Colon Rectal Surg.* 2004;17(4):221-30.
97. Hernandez-Suarez G, Pineros M, Vargas JC, Orjuela L, Hernandez F, Peroza C, et al. Human papillomavirus genotypes in genital warts in Latin America: a cross-sectional study in Bogota, Colombia. *Int J STD AIDS.* 2013;24(7):567-72.
98. Ball SL, Winder DM, Vaughan K, Hanna N, Levy J, Sterling JC, et al. Analyses of human papillomavirus genotypes and viral loads in anogenital warts. *J Med Virol.* 2011;83(8):1345-50.
99. Kargi E, Gungor E, Tuncel A, Alli N, Erdogan B. Bowenoid papulosis. *Ann Plast Surg.* 2003;50(1):109-10.
100. Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(7):1611-22.
101. Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsague X, Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol.* 2009;62(10):870-8.
102. Chao A, Chen TC, Hsueh C, Huang CC, Yang JE, Hsueh S, et al. Human papillomavirus in vaginal intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2012;131(3):259-68.
103. Arrabal-Polo MA, Girón-Prieto MS, Orgaz-Molina J, , Merino-Salas S, Lopez-Carmona F, Arrabal-Martin M. Clinical Manifestations of the Human Papillomavirus. In: Broeck DV, editor. *Human Papillomavirus and Related Diseases From Bench to Bedside A Diagnostic and Preventive Perspective: InTech*; 2013.
104. Berek JS. Simplification of the new Bethesda 2001 classification system. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(3):2-7.
105. Nelson JH, Jr., Averette HE, Richart RM. Dysplasia, carcinoma in situ, and early invasive cervical carcinoma. *CA Cancer J Clin.* 1984;34(6):306-27.
106. Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer.* 2006;106(5):1054-64.

107. Franceschi S, Clifford GM. Re: A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(12):939-41.
108. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2677-84.
109. Wu DW, Lee MC, Wang J, Chen CY, Cheng YW, Lee H. DDX3 loss by p53 inactivation promotes tumor malignancy via the MDM2/Slug/E-cadherin pathway and poor patient outcome in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2014;33(12):1515-26.
110. Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, Smith JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer.* 2009;124(10):2375-83.
111. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer.* 2004;101(2):270-80.
112. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(18):1500-10.
113. Bean SM, Chhieng DC. Anal-rectal cytology: a review. *Diagn Cytopathol.* 2010;38(7):538-46.
114. van der Loeff MF, Mooij SH, Richel O, de Vries HJ, Prins JM. HPV and Anal Cancer in HIV-Infected Individuals: A Review. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2014;11(3):250-62.
115. Darragh TM, Winkler B. Anal cancer and cervical cancer screening: key differences. *Cancer Cytopathol.* 2011;119:5-19.
116. Gross G. Genitoanal human papillomavirus infection and associated neoplasias. *Curr Probl Dermatol.* 2014;45(2):98-122.
117. Chattopadhyay K. A comprehensive review on host genetic susceptibility to human papillomavirus infection and progression to cervical cancer. *Indian J Hum Genet.* 2011;17(3):132-44.
118. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J.* 2012;9(3):262.
119. Safaeian M, Kemp TJ, Pan DY, Porras C, Rodriguez AC, Schiffman M, et al. Cross-protective vaccine efficacy of the bivalent HPV vaccine against HPV31 is associated with humoral immune responses: results from the Costa Rica Vaccine Trial. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(7):1399-406.
120. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995;33(4):901-5.
121. Camargo M, Soto-De Leon S, Sanchez R, Munoz M, Vega E, Beltran M, et al. Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: Comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets. *J Virol Methods.* 2011;178(2):68-74.
122. Roberts I, Ng G, Foster N, Stanley M, Herdman MT, Pett MR, et al. Critical evaluation of HPV16 gene copy number quantification by SYBR green PCR. *BMC Biotechnol.* 2008;8(3):57.
123. Carvalho Nde O, del Castillo DM, Perone C, Janeiro JN, Melo VH, Brasileiro Filho G. Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(1):73-8.
124. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human

- papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(1):121-7.
125. Chan PK, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012;49(4):117-36.
 126. Aggarwal P. Cervical cancer: Can it be prevented? *World journal of clinical oncology*. 2014;5(4):775-80.
 127. Barroso LF. The role of Human Papilloma Virus (HPV) vaccination in the prevention of anal cancer in individuals with Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) infection. *Ther Adv Vaccines*. 2013;1(2):81-92.
 128. Kim KS, Park SA, Ko KN, Yi S, Cho YJ. Current status of human papillomavirus vaccines. *Clinical and experimental vaccine research*. 2014;3(2):168-75.
 129. Bharadwaj M, Hussain S, Nasare V, Das BC. HPV & HPV vaccination: issues in developing countries. *Indian J Med Res*. 2009;130(3):327-33.
 130. Villa LL. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. *Int J Infect Dis*. 2007;11 (2):17-25.
 131. Crosbie EJ, Kitchener HC. Cervarix--a bivalent L1 virus-like particle vaccine for prevention of human papillomavirus type 16- and 18-associated cervical cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7(3):391-6.
 132. Gissmann L, Muller M. Development of prophylactic HPV vaccines. *Coll Antropol*. 2007;31 (2):113-5.
 133. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine*. 2006;24(27-28):5571-83.
 134. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006;367(9518):1247-55.
 135. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, et al. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *N Engl J Med*. 2015;372(8):711-23.
 136. Serrano B, Alemany L, Tous S, Bruni L, Clifford GM, Weiss T, et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*. 2012;7(1):38-40.
 137. Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, et al. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(10):1997-2008.
 138. Tamiolakis D, Kalloniadou M, Lambropoulou M, Kambanieris M, Tsopeles A, Daskalakis G, et al. Contribution of combined colposcopy and cytology in cervical pathology. *Arch Gynecol Obstet*. 2005;273(1):39-42.
 139. Chin-Hong PV, Palefsky JM. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2002;35(9):1127-34.
 140. Palefsky JM, Holly EA, Hogeboom CJ, Berry JM, Jay N, Darragh TM. Anal cytology as a screening tool for anal squamous intraepithelial lesions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;14(5):415-22.

141. Salit IE, Lytwyn A, Raboud J, Sano M, Chong S, Diong C, et al. The role of cytology (Pap tests) and human papillomavirus testing in anal cancer screening. *AIDS*. 2010;24(9):1307-13.
142. Goldstone SE. High-resolution anoscopy is a crucial component of anal dysplasia screening. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(3):364-5.
143. Chiao EY, Giordano TP, Palefsky JM, Tyring S, El Serag H. Screening HIV-infected individuals for anal cancer precursor lesions: a systematic review. *Clin Infect Dis*. 2006;43(2):223-33.
144. von Krogh G, Lacey CJ, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect*. 2000;76(3):162-8.
145. Sonnex C, Lacey CJ. The treatment of human papillomavirus lesions of the lower genital tract. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2001;15(5):801-16.
146. Maw R. Critical appraisal of commonly used treatment for genital warts. *Int J STD AIDS*. 2014;15(3):357-64.
147. Viera MH, Amini S, Huo R, Konda S, Block S, Berman B. Herpes simplex virus and human papillomavirus genital infections: new and investigational therapeutic options. *Int J Dermatol*. 2010;49(7):733-49.
148. Stanley MA. Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *J Gen Virol*. 2012;93(4):681-91.
149. Damin AP, Agnes G, Tarta C, Contu PC, Ghezzi TL, Kliemann LM, et al. Human papillomavirus detected in a colonic metastasis of cervical adenocarcinoma. *Tech Coloproctol*. 2014;18(5):515-6.
150. Beutner KR, Spruance SL, Hougham AJ, Fox TL, Owens ML, Douglas JM, Jr. Treatment of genital warts with an immune-response modifier (imiquimod). *J Am Acad Dermatol*. 1998;38(2):230-9.
151. Herdman MT, Pett MR, Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang XY, et al. Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis*. 2006;27(11):2341-53.
152. Donne AJ, Hampson L, He XT, Day PJ, Salway F, Rothera MP, et al. Potential risk factors associated with the use of cidofovir to treat benign human papillomavirus-related disease. *Antivir Ther*. 2009;14(7):939-52.
153. Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. *Science*. 1942;95(2469):438-9.
154. Anuario Demográfico de Cuba 2007. In: Estadísticas Dd, editor. La Habana: Oficina Nacional de Estadísticas (ONE). Dirección Nacional de Registros Estadísticos de la República de Cuba; 2008.
155. Gravitt PE, van Doorn LJ, Quint W, Schiffman M, Hildesheim A, Glass AG, et al. Human papillomavirus (HPV) genotyping using paired exfoliated cervicovaginal cells and paraffin-embedded tissues to highlight difficulties in attributing HPV types to specific lesions. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3245-50.
156. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(3):226-36.
157. Gravitt PE, Manos MM. Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. *IARC Sci Publ*. 1992;1(119):121-33.
158. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-61.

159. Tham KM, Chow VT, Singh P, Tock EP, Ching KC, Lim-Tan SK, et al. Diagnostic sensitivity of polymerase chain reaction and Southern blot hybridization for the detection of human papillomavirus DNA in biopsy specimens from cervical lesions. *Am J Clin Pathol.* 1991;95(5):638-46.
160. World-Medical-Association. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects 2008. Available from: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/7c.pdf>.
161. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA.* 2002;287(16):2114-19.
162. Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajda M, Runnebaum IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol.* 2009;44(4):302-7.
163. Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital human papillomavirus infection using consensus PCR. In: Herrington CS, McGee JOD, editors. *Diagnostic molecular pathology: a practical approach.* Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 1992. p. 132-52.
164. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19(12):1572-74.
165. Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol.* 2006;6:29.
166. Betancourt EM, Wahbah MM, Been LC, Chiao EY, Citron DR, Laucirica R. Anal Cytology as a Predictor of Anal Intraepithelial Neoplasia in HIV-Positive Men and Women. *Diagn Cytopathol* 2013;41(8):697-702.
167. Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC, Jr. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician.* 2003;68(10):1992-8.
168. Seaman WT, Andrews E, Couch M, Kojic EM, Cu-Uvin S, Palefsky J, et al. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Viol J.* 2010;7(2):194.
169. Dlugonska H. Harald zur Hausen--a scientist with passion. Vaccine against cervical cancer. *Wiad Parazytol.* 2009;55(3):191-4.
170. Lee SJ, Yeo SG, Park DC. High-risk human papillomavirus infection in low risk women: incidence, patient characteristics, and clinical meaning for cervical cancer. *Int J Med Sci.* 2012;9(1):103-7.
171. Deluca GD, Marin HM, Blanco NS, Basiletti JA, Gonzalez JV, Merino AL, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical alterations from north Argentina. *Indian J Med Microbiol.* 2013;31(2):138-41.
172. Oliveira FA, Ehrig V, Lang K, Heukelbach J, Stoffler-Meilicke M, Ignatius R, et al. Human papillomavirus genotype distribution and risk factors for infection in women from a small municipality in north east Brazil. *Int J STD AIDS.* 2012;23(9):e5-10.
173. Fernandes JV, Meissner Rde V, Carvalho MG, Fernandes TA, Azevedo PR, de Azevedo JW, et al. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. *Mol Med Report.* 2011;4(6):1321-6.
174. de Mendonca VG, Guimaraes MJ, de Lima Filho JL, de Mendonca CG, Martins DB, Crovella S, et al. Human papillomavirus cervical infection: viral genotyping and risk factors for high-grade squamous intraepithelial lesion and cervix cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2011;32(10):476-85.

175. Rodríguez González D, Pérez Piñero J, Sarduy Nápoles M. Infección por el virus del papiloma humano en mujeres de edad mediana y factores asociados. *Rev Cubana Obst Ginecol.* 2014;40(2):218-32.
176. Prieto Herrera ME, Pérez Rivero JL, Camacho Vázquez M, Ordán Áreas M, Rodríguez Sánchez N. Comportamiento de las citologías orgánicas alteradas en un área de salud. *Rev Cubana Obst Ginecol.* 2012;38(4):510-20.
177. Franco Argote O, Valladares Vallín J, Pérez Ramos G. Neoplasia intraepitelial cervical en un área de salud. *Rev Cubana Obst Ginecol.* 2011;37(2):193-203.
178. Sarduy Nápoles M. Correlación citohistológica en las neoplasias intraepiteliales cervicales y en la identificación del VPH en esas lesiones *Rev Cubana Obst Ginecol.* 2009;35(2):180-90.
179. Pierre Joseph N, Belizaire M, Porter CL, Walsh JP, Esang M, Goff G, et al. Ethnic differences in perceived benefits and barriers to HPV vaccine acceptance: a qualitative analysis of young African American, Haitian, Caucasian, and Latino men. *Clinical pediatrics.* 2014;53(2):177-85.
180. Lang Kuhs KA, Gonzalez P, Struijk L, Castro F, Hildesheim A, van Doorn LJ, et al. Prevalence of and risk factors for oral human papillomavirus among young women in Costa Rica. *J Infect Dis.* 2013;208(10):1643-52.
181. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15(5):727-46.
182. Basu P, Mittal S, Bhaumik S, Mandal SS, Samaddar A, Ray C, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasias in a previously unscreened population--a pooled analysis from three studies. *Int J Cancer.* 2013;132(7):1693-9.
183. Anderson L, O'Rorke M, Jamison J, Wilson R, Gavin A. Prevalence of human papillomavirus in women attending cervical screening in the UK and Ireland: new data from northern Ireland and a systematic review and meta-analysis. *J Med Virol.* 2013;85(2):295-308.
184. Quek SC, Lim BK, Domingo E, Soon R, Park JS, Vu TN, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical intraepithelial neoplasia across 5 countries in Asia. *Int J Gynecol Cancer.* 2013;23(1):148-56.
185. Demers AA, Shearer B, Severini A, Lotocki R, Kliewer EV, Stopera S, et al. Distribution of human papillomavirus types, cervical cancer screening history, and risk factors for infection in Manitoba. *Chronic Dis Inj Can.* 2012;32(4):177-85.
186. Badano I, Pedrozo RW, Ruiz Diaz LS, Galuppo JA, Picconi MA, Campos RH, et al. Detección del virus papiloma humano (HPV) y citología de Papanicolaou en mujeres de bajos recursos de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43(4):263-7.
187. Tran NP, Hung CF, Roden R, Wu TC. Control of HPV Infection and Related Cancer Through Vaccination. *Recent Results Cancer Res.* 2014;193(4):149-71.
188. Asiaf A, Ahmad ST, Mohammad SO, Zargar MA. Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(3):206-24.
189. Salvent Tames A, Rodríguez Lara O, Leyva Lambert M, Gamboa Rodríguez M, Columbié Gámez M. Comportamiento del cáncer cérvicouterino en el municipio San Antonio del Sur de Guantánamo. *Revista Cubana Obst Ginecol.* 2012;38(2):190-8.
190. Dávila Gómez HL, García Valdés A, Álvarez Castillo F. Cáncer de cuello uterino. *Revista Cubana Obst Ginecol.* 2010;36(4):603-12.

191. Dávila Gómez HL, Álvarez Castillo F, Peña Martínez ML, García Valdés A, Matos Rodríguez Z. Lesiones epiteliales asociadas al virus del papiloma humano. *Rev Cubana Obst Ginecol.* 2014;40(4):388-98.
192. Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Meyers C, Ho J, et al. Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(12):3490-6.
193. Alam S, Conway MJ, Chen HS, Meyers C. The cigarette smoke carcinogen benzoapyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol.* 2008;82(2):1053-8.
194. Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, Natarajaseenivasan K. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(3):771-7.
195. Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Kim E, Tadesse A, et al. The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. *Int J Cancer.* 2011;128(12):2962-70.
196. Confortini M, Carozzi F, Zappa M, Ventura L, Iossa A, Cariaggi P, et al. Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort of Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. *BMC Infect Dis.* 2010;10:157.
197. Heard I, Tondeur L, Arowas L, Falguieres M, Demazoin MC, Favre M. Human papillomavirus types distribution in organised cervical cancer screening in France. *PLoS One.* 2013;8(11):793-102.
198. Watson-Jones D, Baisley K, Brown J, Kavishe B, Andreasen A, Changalucha J, et al. High prevalence and incidence of human papillomavirus in a cohort of healthy young African female subjects. *Sex Transm Infect.* 2013;89(5):358-65.
199. Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(7):2490-5.
200. van der Marel J, van Baars R, Quint WG, Berkhof J, del Pino M, Torne A, et al. The impact of human papillomavirus genotype on colposcopic appearance: a cross-sectional analysis. *BJOG.* 2014;121(9):1117-26.
201. Jovanovic AM, Dikic SD, Jovanovic V, Zamurovic M, Nikolic B, Krsic V, et al. Correlation of human papilloma virus infection with cytology, colposcopy and histopathological examination of the bioptic tissue in low- and high-grade intraepithelial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2012;33(5):512-6.
202. Del Pino M, Torne A, Alonso I, Mula R, Masoller N, Fuste V, et al. Colposcopy prediction of progression in human papillomavirus infections with minor cervical lesions. *Obstet Gynecol.* 2010;116(6):1324-31.
203. Nessa A, Wistrand C, Begum SA, Thuresson M, Shemer I, Thorsell M, et al. Evaluation of stationary colposcope and the Gynocular, by the Swede score systematic colposcopic system in VIA positive women: a crossover randomized trial. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24(2):339-45.
204. Tamayo Lien T, Varona Sánchez J. Infección por papiloma virus humano en adolescentes. *Rev Cubana Obst Ginecol.* 2006;32(2).
205. Puente Perpiñán M, Haber Reyes MP, de los Reyes Losada A, Salas Palacios SR. Adolescentes e infección por virus del papiloma humano. *MEDISAN.* 2014;18(6):769-75.
206. Montané Céspedes IA. Papiloma virus humano. Asociación a neoplasia intraepitelial cervical en mujeres del municipio Boyeros. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 2010;9(4):553-9.

207. Misra JS, Das V, Srivastava AN, Singh U. Role of different etiological factors in progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Diagn Cytopathol.* 2006;34(10):682-5.
208. Moktar A, Singh R, Vadhanam MV, Ravoori S, Lillard JW, Gairola CG, et al. Cigarette smoke condensate-induced oxidative DNA damage and its removal in human cervical cancer cells. *Int J Oncol.* 2011;39(4):941-7.
209. Fernandez L, Buch ML, Molina A, Carabelloso M, Gausioso R, Lage A. Risk factors in mass screening for breast cancer, multivariate analysis of data from the Cuban diagnosis pilot study. *Neoplasma.* 1986;33(4):535-41.
210. Belinson S, Smith JS, Myers E, Olshan A, Belinson J, Pretorius R, et al. Descriptive evidence that risk profiles for cervical intraepithelial neoplasia 1, 2, and 3 are unique. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(9):2350-5.
211. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer.* 2013;108(1):234-9.
212. Hellberg D. Sex steroids and cervical cancer. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3045-54.
213. Takacs T, Jeney C, Kovacs L, Mozes J, Benczik M, Sebe A. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods.* 2008;149(1):153-62.
214. Speers DJ. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin Biochem Rev.* 2006;27(1):39-51.
215. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Dillner J. Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):449-59.
216. Menton JF, Cremin SM, Canier L, Horgan M, Fanning LJ. Molecular epidemiology of sexually transmitted human papillomavirus in a self-referred group of women in Ireland. *Virol J.* 2009;6:112.
217. Vaccarella S, Lortet-Tieulent J, Plummer M, Franceschi S, Bray F. Worldwide trends in cervical cancer incidence: impact of screening against changes in disease risk factors. *Eur J Cancer.* 2013;49(15):3262-73.
218. Pierre Joseph N, Clark JA, Mercilus G, Wilbur M, Figaro J, Perkins R. Racial and ethnic differences in HPV knowledge, attitudes, and vaccination rates among low-income African-American, Haitian, Latina, and Caucasian young adult women. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2014;27(2):83-92.
219. Coser J, da Rocha Boeira T, Simon D, Kazantzi Fonseca AS, Ikuta N, Lunge VR. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. *Genet Mol Res.* 2013;12(4):4276-85.
220. Silverloo I, Andrae B, Wilander E. Value of high-risk HPV-DNA testing in the triage of ASCUS. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009;88(9):1006-10.
221. Elfstrom KM, Smelov V, Johansson AL, Eklund C, Naucler P, Arnheim-Dahlstrom L, et al. Long-term HPV type-specific risks for ASCUS and LSIL: A 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial. *Int J Cancer.* 2015;136(2):350-9.
222. Sukasem C, Pairoj W, Saekang N, Pombubpha H, Srichunrasami C, Pongtippan A, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus genotype in women with high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer: will a quadrivalent vaccine be necessary in Thailand? *J Med Virol.* 2011;83(1):119-26.

223. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(10):254-93.
224. Lu-Lu S, Qiong J, Hui L, Xian-Rong Z, Zhi-Qin S, Xue-Mei C, et al. Population-based study on the prevalence of and risk factors for human papillomavirus infection in Qujing of Yunnan province, Southwest China. *Virology*. 2012;9:153.
225. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(10):2349-59.
226. Munagala R, Dona MG, Rai SN, Jenson AB, Bala N, Ghim SJ, et al. Significance of multiple HPV infection in cervical cancer patients and its impact on treatment response. *Int J Oncol*. 2009;34(1):263-71.
227. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, et al. Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *J Clin Microbiol*. 2013;51(5):1458-64.
228. Wentzensen N, Schiffman M, Dunn T, Zuna RE, Gold MA, Allen RA, et al. Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Int J Cancer*. 2009;125(9):2151-8.
229. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*. 2003;168(4):421-5.
230. Zhang R, Shi TY, Ren Y, Lu H, Wei ZH, Hou WJ, et al. Risk factors for human papillomavirus infection in Shanghai suburbs: A population-based study with 10,000 women. *J Clin Virol*. 2013;58(1):144-8.
231. Min KJ, Lee JK, Lee S, Kim MK. Alcohol Consumption and Viral Load Are Synergistically Associated with CIN1. *PLoS One*. 2013;8(8):721-42.
232. Oh HY, Seo SS, Kim MK, Lee DO, Chung YK, Lim MC, et al. Synergistic effect of viral load and alcohol consumption on the risk of persistent high-risk human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2014;9(8):1043-74.
233. Roura E, Castellsague X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2014;135(2):453-66.
234. Althoff KN, Paul P, Burke AE, Viscidi R, Sangaramoorthy M, Gravitt PE. Correlates of cervicovaginal human papillomavirus detection in perimenopausal women. *J Womens Health* 2009;18(9):1341-6.
235. Vetrano G, Aleandri V, Ciolli P, Scardamaglia P, Pacchiarotti A, Verrico M, et al. Conservative approach to preneoplastic cervical lesions in postmenopause. *Anticancer Res*. 2010;28(6):3941-4.
236. Boonyanurak P, Panichakul S, Wilawan K. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection (HPV) and correlation with postmenopausal hormonal therapy in Thai women aged more than 45 years old. *J Med Assoc Thai*. 2010;93(1):9-16.
237. Luyten A, Buttmann-Schweiger N, Luyten K, Mauritz C, Reinecke-Luthge A, Pietralla M, et al. Early detection of CIN3 and cervical cancer during long-term follow-up using HPV/Pap smear co-testing and risk-adapted follow-up in a locally organised screening programme. *Int J Cancer*. 2014;134(11):2674-82.

238. Wang SM, Colombara D, Shi JF, Zhao FH, Li J, Chen F, et al. Six-year regression and progression of cervical lesions of different human papillomavirus viral loads in varied histological diagnoses. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(4):716-23.
239. Gosvig CF, Huusom LD, Andersen KK, Iftner A, Cederkvist L, Svare E, et al. Persistence and reappearance of high-risk human papillomavirus after conization. *Gynecol Oncol*. 2013;131(3):661-6.
240. Soto-De Leon SC, Del Rio-Ospina L, Camargo M, Sanchez R, Moreno-Perez DA, Perez-Prados A, et al. Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):395.
241. Origoni M, Carminati G, Sideri M, Clementi M, Rolla S, Candiani M. "Low-grade positivity" of HPV viral load after atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) cytology identifies women at low-risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and 3. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012;33(3):261-4.
242. Bencomo-Alvarez AE, Limones-Perches I, Suarez-Rincon AE, Ramirez-Jirano LJ, Borraro-Carbajal E, Sanchez-Corona J, et al. Human papillomavirus viral load in cervical intraepithelial neoplasia as a prognostic factor in a Mexican population. *Genet Mol Res*. 2013;11(4):4720-7.
243. Rodriguez-Manfredi A, Alonso I, del Pino M, Fuste P, Torne A, Ordi J. Predictors of absence of cervical intraepithelial neoplasia in the conization specimen. *Gynecol Oncol*. 2013;128(2):271-6.
244. Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boubli L, Olive D, et al. Two years outcome of women infected with high risk HPV having normal colposcopy following low-grade or equivocal cytological abnormalities: are HPV16 and 18 viral load clinically useful predictive markers? *J Med Virol*. 2012;84(6):964-72.
245. Marks M, Gravitt PE, Utaipat U, Gupta SB, Liaw K, Kim E, et al. Kinetics of DNA load predict HPV 16 viral clearance. *J Clin Virol*. 2011;51(1):44-9.
246. Chang L, He X, Yu G, Wu Y. Effectiveness of HPV 16 viral load and the E2/E6 ratio for the prediction of cervical cancer risk among Chinese women. *J Med Virol*. 2013;85(4):646-54.
247. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Pawlita M, et al. Viral load of high-risk human papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(3):406-14.
248. Lai HC, Peng MY, Nieh S, Yu CP, Chang CC, Lin YW, et al. Differential viral loads of human papillomavirus 16 and 58 infections in the spectrum of cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;16(2):730-5.
249. Fernandes J, Carvalho M, de Fernandes T, Araujo J, Azevedo P, Azevedo J, et al. Prevalence of human papillomavirus type 58 in women with or without cervical lesions in northeast Brazil. *Annals of medical and health sciences research*. 2013;3(4):504-10.
250. Canche JC, Lopez IR, Suarez NG, Acosta GC, Conde-Ferraz L, Cetina TC, et al. High prevalence and low E6 genetic variability of human papillomavirus 58 in women with cervical cancer and precursor lesions in Southeast Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(2):144-8.
251. Torres M, Gonzalez C, del Romero J, Viciano P, Ocampo A, Rodriguez-Fortunez P, et al. Anal human papillomavirus genotype distribution in HIV-infected men who have sex with men by geographical origin, age, and cytological status in a Spanish cohort. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3512-20.
252. Chow EP, Tucker JD, Wong FY, Nehl EJ, Wang Y, Zhuang X, et al. Disparities and Risks of Sexually Transmissible Infections among Men Who Have Sex with Men in China: A Meta-Analysis and Data Synthesis. *PLoS One*. 2014;9(2):859-69.

253. Johnson LG, Madeleine MM, Newcomer LM, Schwartz SM, Daling JR. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. *Cancer*. 2004;101(2):281-8.
254. Habbous S, Harland LT, La Delfa A, Fadhel E, Xu W, Liu FF, et al. Comorbidity and prognosis in head and neck cancers: Differences by subsite, stage, and human papillomavirus status. *Head Neck*. 2014;36(6):802-10.
255. Friedlander MA, Stier E, Lin O. Anorectal cytology as a screening tool for anal squamous lesions: cytologic, anoscopic, and histologic correlation. *Cancer*. 2004;102(1):19-26.
256. Yang Y, Li X, Zhang Z, Qian HZ, Ruan Y, Zhou F, et al. Association of human papillomavirus infection and abnormal anal cytology among HIV-infected MSM in Beijing, China. *PLoS One*. 2012;7(4):379-83.
257. Salit IE, Lytwyn A, Raboud J, Sano M, Chong S, Diong C, et al. The role of cytology (Pap tests) and human papillomavirus testing in anal cancer screening. *AIDS*. 2010;14(5):742-45.
258. Palefsky J, Berry JM, Jay N. Anal cancer screening. *Lancet Oncol*. 2012;13(7):279-80.
259. Palefsky JM. Practising high-resolution anoscopy. *Sex Health*. 2013;9(6):580-6.
260. Castle PE, Follansbee S, Borgonovo S, Tokugawa D, Schwartz LM, Lorey TS, et al. A comparison of human papillomavirus genotype-specific DNA and E6/E7 mRNA detection to identify anal precancer among HIV-infected men who have sex with men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(1):42-9.
261. Wentzensen N. Screening for anal cancer: endpoints needed. *Lancet Oncol*. 2012;13(5):438-40.
262. Colon-Lopez V, Ortiz AP, Del Toro-Mejias L, Clatts MC, Palefsky JM. Epidemiology of anal HPV infection in high-risk men attending a sexually transmitted infection clinic in Puerto Rico. *PLoS One*. 2014;9(1):e83209.
263. Parisi SG, Cruciani M, Scaggianti R, Boldrin C, Andreis S, Dal Bello F, et al. Anal and oral human papillomavirus (HPV) infection in HIV-infected subjects in northern Italy: a longitudinal cohort study among men who have sex with men. *BMC Infect Dis*. 2011;11:150.
264. Tamalet C, Obry-Roguet V, Ressiot E, Bregigeon S, Del Grande J, Poizot-Martin I. Distribution of human papillomavirus genotypes, assessment of HPV 16 and 18 viral load and anal related lesions in HIV positive patients: a cross-sectional analysis. *J Med Virol*. 2014;86(3):419-25.
265. Nyitray AG, da Silva RJ, Baggio ML, Lu B, Smith D, Abrahamsen M, et al. The prevalence of genital HPV and factors associated with oncogenic HPV among men having sex with men and men having sex with women and men: the HIM study. *Sex Transm Dis*. 2011;38(10):932-40.
266. Wentzensen N, Follansbee S, Borgonovo S, Tokugawa D, Schwartz L, Lorey TS, et al. Human papillomavirus genotyping, human papillomavirus mRNA expression, and p16/Ki-67 cytology to detect anal cancer precursors in HIV-infected MSM. *AIDS*. 2012;26(17):2185-92.
267. Poizot-Martin I, Henry M, Benhaim S, Obry-Roguet V, Figarella D, Tamalet C. High level of HPV 16 and 18 DNA load in anal swabs from male and female HIV-1 infected patients. *J Clin Virol*. 2009;44(4):314-7.
268. Hernández AL, Efrid JT, Holly EA, Berry JM, Jay N, Palefsky JM. Risk factors for anal human papillomavirus infection type 16 among HIV-positive men who have sex with men in San Francisco. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;63(4):532-9.

269. Chan PK, Chang AR, Yu MY, Li WH, Chan MY, Yeung AC, et al. Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies. *Int J Cancer*. 2010;126(1):297-301.
270. Del Amo J, Gonzalez C, Geskus RB, Torres M, Del Romero J, Vinciana P, et al. What drives the number of High Risk Human papillomavirus types in the anal canal in HIV-positive Men who have sex with Men? *J Infect Dis*.
271. Kjaer SK, Munk C, Winther JF, Jorgensen HO, Meijer CJ, van den Brule AJ. Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(6):1528-33.
272. Chaturvedi AK, Madeleine MM, Biggar RJ, Engels EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(16):1120-30.
273. Sharma R, Efird JT, Chein A, Holly EA, Kraiden M, Berry JM, et al. Prevalence and risk factors for neutralizing antibodies to human papillomavirus types 16 and 18 in HIV-positive men who have sex with men. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;64(5):479-87.
274. Phanuphak N, Teeratakulpisarn N, Pankam T, Kerr SJ, Barisri J, Deesua A, et al. Anal human papillomavirus infection among Thai men who have sex with men with and without HIV infection: prevalence, incidence, and persistence. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;63(4):472-9.
275. Videla S, Darwich L, Canadas MP, Coll J, Pinol M, Garcia-Cuyas F, et al. Natural history of human papillomavirus infections involving anal, penile, and oral sites among HIV-positive men. *Sex Transm Dis*. 2013;40(1):3-10.
276. Yu CT, Chao SC, Lee HC, Chou CY, Ko WC, Liu HY, et al. High prevalence of anal human papillomavirus infection and associated risky behaviors in men infected with human immunodeficiency virus in Taiwan. *AIDS Behav*. 2013;17(3):1211-8.
277. Palefsky J. Biology of HPV in HIV infection. *Adv Dent Res*. 2006;19(1):99-105.
278. Fox PA. Human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(1):62-6.
279. Gonzalez C, Torres M, Benito A, Del Romero J, Rodriguez C, Fontillon M, et al. Anal squamous intraepithelial lesions are frequent among young HIV-infected men who have sex with men followed up at the Spanish AIDS Research Network Cohort (CoRIS-HPV). *Int J Cancer*. 2013;133(5):1164-72.
280. Schlecht HP, Fugelso DK, Murphy RK, Wagner KT, Doweiko JP, Proper J, et al. Frequency of Occult High-Grade Squamous Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cancer within Anal Condylomata in Men Who Have Sex with Men. *Clin Infect Dis*. 2010;51(1):107-10.
281. Panatto D, Amicizia D, Tanzi E, Bianchi S, Frati ER, Zotti CM, et al. Prevalence of human papillomavirus in young Italian women with normal cytology: how should we adapt the national vaccination policy?. *BMC Infect Dis*. 2013;13:575.

IX ANEXOS

ANEXO 1

Datos generales de la población femenina entre 15 y 59 años residentes en 4 municipios de La Habana, analizadas entre enero de 2007 y diciembre de 2009.

<i>Variable</i>		<i>Pacientes n=519</i>	<i>Por ciento (%) 100</i>
<i>Edad, mediana en años (Cuartil)</i>		34 (27,0-42,0)	-
<i>Rangos</i>	15-20	44	8,5
	21-30	145	27,9
	31-40	180	34,7
	>40	150	28,9
<i>Nivel de escolaridad</i>	Primaria y Secundaria Básica	148	28,5
	Preuniversitario y Técnico Medio	263	50,7
	Universitario	108	20,8
<i>Situación Laboral</i>	Profesional	91	17,5
	Otras	428	82,5
<i>Estado Civil</i>	Casada	335	64,4
	Divorciada, Soltera o Viuda	164	31,6
<i>Consumo de cigarrillos</i>	Sí	269	51,8
<i>Edad de la menarquía</i>	<10	44	8,5
<i>Rangos</i>	10-14	420	80,9
	>14	55	10,6
<i>Edad de las primeras relaciones sexuales</i>	<15	31	6,0
<i>Rangos</i>	15-20	428	82,5
	21-30	60	11,6
<i>Ciclos menstruales irregulares</i>	Sí	87	16,8
<i>Menopausia</i>	Sí	68	13,1
<i>Metrorragia</i>	Sí	25	4,8
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>	≤2	474	91,3
	>2	45	8,7
<i>Uso del condón</i>	Sí	22	4,2
<i>Uso de anticonceptivos orales</i>	≤5	468	90,2
<i>Rango(años)</i>	>5	51	9,8
<i>Partos</i>	0	97	18,7
	≥1	422	81,3
<i>Leucorrea</i>	Sí	165	31,8
<i>Antecedentes de alguna cirugía cervical</i>	Sí	58	11,2
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Sí	171	32,9
<i>Antecedentes de colposcopia positiva</i>	Sí	169	32,6
<i>Otras ITS</i>	Sí	303	58,4

Fuente: Modelo de recogida de información. **Abreviaturas:** ITS: infecciones de transmisión sexual.

ANEXO 2

Operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH y las lesiones intraepiteliales cervicales en mujeres entre 15 y 59 años residentes en 4 municipios de La Habana. Enero 2007-diciembre 2009.

<i>Variable</i>	<i>Tipo</i>	<i>Operacionalización Escala</i>	<i>Descripción</i>
<i>Infección por PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia del PVH en cuello uterino (determinado a través de RCP cualitativa).
<i>Infección por PVH 6, 11, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 69, 70, 73, 155, 291</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia del PVH 6, 11, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 69, 70, 73, 155, 291 en cuello uterino (determinado a través de RCP-cualitativa e hibridación Dot Blot con sonda específica)
<i>Mezcla 1 de PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia de una mezcla de PVH de mediano o desconocido riesgo oncogénico (62, 71, 74, 84 y 90) (determinado a través de RCP-cualitativa e hibridación Dot Blot con sonda específica)
<i>Mezcla 2 de PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia de una mezcla de PVH de alto riesgo oncogénico (67, 68, 82 y 85) (determinado a través de RCP-cualitativa e hibridación Dot Blot con sonda específica)
<i>Resultados de la citología cervicouterina</i>	Cualitativa nominal	- Insatisfactorias - Satisfactorias	Interpretación de los resultados de la citología cervical, para evaluar si existen o no lesiones intraepiteliales cervicales. Según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero
<i>Resultados de la citología cervicouterina</i>	Cualitativa ordinal	-Negativas -NIC I -NIC II -NIC III	Interpretación de los resultados de la citología cervicouterina, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero

Abreviaturas: PVH: Papilomavirus humanos; RCP-TR: Reacción en Cadena de la Polimerasa; NIC I, II y III: Neoplasias Intraepiteliales Cervicales de grados I, II y III.

ANEXO 3

Operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH, las lesiones intraepiteliales cervicales y los factores sociodemográficos, epidemiológicos y clínicos en mujeres entre 15 y 59 años residentes en 4 municipios de La Habana. Enero 2007-diciembre 2009.

<i>Variable</i>	<i>Tipo</i>	<i>Operacionalización</i> <i>Escala</i>	<i>Descripción</i>
<i>Edad</i>	Cuantitativa continua	15-20 21-30 31-40 >40	Edad en años cumplidos. Dato tomado de la encuesta.
<i>Nivel de escolaridad</i>	Cualitativa ordinal	Primaria/Secundaria Pre-Universitario/ Técnico Medio Universitario	Nivel educacional máximo alcanzado. Dato tomado de la encuesta.
<i>Situación laboral</i>	Cualitativa ordinal	Profesional Otras	Ocupación remunerada a la que se dedica habitualmente.
<i>Estado civil</i>	Cualitativa ordinal	Casada Divorciada, Soltera o Viuda	Situación legal o no legal que conlleve a la convivencia y práctica o no de relaciones sexuales con una pareja masculina. Dato tomado de la encuesta.
<i>Consumo de cigarrillos</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Costumbre o conducta de fumar cigarrillos. Dato tomado de la encuesta.
<i>Edad de la menarquía</i>	Cuantitativa continua	<10 10-14 >14	Edad en años cumplidos cuando tuvo su primera menstruación. Dato tomado de la encuesta.
<i>Edad de las primeras relaciones sexuales</i>	Cuantitativa continua	<15 15-20 21-30	Edad en años cumplidos cuando tuvo su primera relación sexual. Dato tomado de la encuesta.
<i>Ciclos menstruales irregulares</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Variaciones en la fórmula menstrual o ciclos anovulatorios. Dato tomado de la encuesta.
<i>Menopausia</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Cambios en los ciclos menstruales, hormonales o anímicos asociados al climaterio. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Metrorragia</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Sangrado fuera del ciclo menstrual. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>	Cuantitativa discreta	1 2-4 5-10 >10	Cantidad de parejas con las que mantuvo relaciones en los dos años previos al estudio y en el momento del estudio. Dato tomado de la encuesta.
<i>Uso de condón</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Disposición o conducta habitual de mantener relaciones sexuales utilizando condón. Dato tomado de la encuesta.
<i>Uso de anticonceptivos orales</i>	Cuantitativa continua	≤5 >5	Tiempo en años consumiendo tabletas anticonceptivas con o sin prescripción médica. Dato tomado de la encuesta.
<i>Partos</i>	Cuantitativa discreta	0 ≥1	Número de partos fisiológicos o mediante cesárea. Dato tomado de la encuesta.

<i>Leucorrea</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Expulsión de secreciones vaginales en el momento del estudio. Dato tomado de la encuesta.
<i>Antecedentes de alguna cirugía cervical</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Historia anterior de haber sido sometida a alguna intervención quirúrgica en el cuello uterino. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Historia anterior de haber sido diagnosticada con alguna citología positiva, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Antecedentes de colposcopia positiva</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Historia anterior de haber sido diagnosticada con alguna colposcopia positiva, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Antecedentes de ITS</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Haber padecido alguna infección de transmisión sexual en algún momento anterior al estudio. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.

Abreviaturas: ITS: infecciones de transmisión sexual.

ANEXO 4

Modelo de recogida de la información (cuestionario)

Fecha de toma de muestra _____ Tipo de Muestra _____ Muestra tomada por _____ Hospital _____

I- DATOS PERSONALES.

Nombre y Apellidos: _____

Fecha de nacimiento: _____ Edad: _____ Número de HC: _____

CI: _____ Dirección: _____

Centro de Trabajo: _____ Teléfono: _____

II-ULTIMO GRADO DE ESCOLARIDAD ALCANZADO.

Elemental _____ Primario _____ Secundaria _____ Pre o tecnológico _____ Universitario _____

III-SITUACIÓN LABORAL.

Ama de casa _____ Estudiante _____ Obrera _____ Técnica _____ Profesional _____ Cuenta propia _____

IV-ESTADO CIVIL.

Soltera _____ Casada _____ Viuda _____ Divorciada _____

V-HISTORIA ANTICONCEPTIVA.

a: (actual)

DIU _____ Progesten +Estradiol _____ P _____ Control _____ Tiempo de uso _____

b: (anterior a la actual)

DIU _____ P+E _____ P _____ Condón _____ Tiempo de uso _____

VI-HISTORIA OBSTÉTRICA.

Edad de la primera menstruación _____

Última menstruación (fecha) _____

Trastornos Menstruales _____ Metrorragia _____ Leucorrea _____

Menopausia _____ Espontánea _____
Quirúrgica _____ Total _____
Parcial _____

Edad de inicio de las primeras relaciones sexuales _____

Embarazos _____ Primer parto _____ Total _____ Abortos Espontáneos _____
Normales _____ Provocados _____
Patológicos _____

Número de parejas sexuales referidas en los últimos dos años _____

VII-HISTORIA GINECOLÓGICA y de ITS.

a) Antecedentes de enfermedades ginecológicas de naturaleza infecciosa:

Condiloma _____ Gonorrea _____ Monilias _____ Sífilis _____ Trichomonas _____ Herpes Genital _____
Herpes Oral _____

Otras _____

Actuales ITS _____

b) Antecedentes de prueba citológica alterada: Si _____ No _____

c) Antecedentes de cirugía cervical: Si _____ No _____

d) Antecedentes de colposcopia positiva Sí _____ No _____

VIII-HABITOS TÓXICOS (en los últimos 10 años): a) Cigarro _____ b) Alcohol _____

IX-RESULTADOS:

Prueba citológica _____ Colposcopia _____ Biopsia _____ PVH-RCP _____

ANEXO 5

Forma de Consentimiento informado

La que suscribe: _____.

Se me ha explicado que los Papilomavirus humanos están asociados con alteraciones en células del cuello del útero y puede provocar cáncer cervicouterino. Resulta muy importante entonces reconocer la presencia o no del virus en las pacientes sin antecedentes de patologías de cuello o en la citología anterior realizada según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Es esencial esta información en la población de diferentes grupos de edades, es por ello que este estudio incluye mujeres desde 15 hasta 59 años que tienen una vida sexualmente activa. Se me dicho que esta investigación se titula: *Detección y tipificación de Papilomavirus humanos en mujeres entre 15 y 59 años residentes en 4 municipios de La Habana, presencia de lesiones intraepiteliales cervicales y variables clínicas y epidemiológicas asociadas.*

Se me ha informado que seré incluida en un estudio y me someteré a una prueba citológica con el personal calificado y entrenado para tales tareas del hospital donde se realizará la toma de las muestras para el estudio. Igualmente se me ha informado que puedo aceptar o no. La información obtenida será del conocimiento de los médicos e investigadores participantes en la investigación y los datos personales de los pacientes no serán divulgados. Mi identidad no puede ser revelada y los datos clínicos y microbiológicos permanecerán en forma confidencial, a menos que sean solicitados por Ley. Los resultados de este estudio pueden ser publicados.

El posible beneficio que tendré de este estudio es que se podrá establecer un mejor diagnóstico de la enfermedad o de la infección viral, si la tuviera, lo que permitirá un seguimiento adecuado.

De acuerdo a las informaciones recibidas, se me ha solicitado el consentimiento de participación y se han respondido mis preguntas y aclarado mis dudas. Además queda claro que puedo ser excluida del estudio en el momento que lo desee y estime conveniente. Por tanto he aceptado mi inclusión y para que así conste firmo conjuntamente con los investigadores principales en el estudio.

Nombre y Apellidos del paciente y/o padre o tutor participante en el estudio:

Firma del paciente y/o padre o tutor participante en el estudio: _____

Nombre y Apellidos del testigo: _____ Firma: _____

Yo, _____ médico especialista en Medicina General Integral y/o Ginecología y Obstetricia, por medio de la presente declaro haberle explicado a la paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que la misma ha participado de forma absolutamente voluntaria.

Firmo la presente: _____

Fecha: _____

Investigador Principal

Firma

ANEXO 6

Datos generales de la población mayor de 30 años atendida en las consultas de Patología de Cuello Uterino de dos hospitales ginecobstétricos de La Habana entre enero de 2009 y diciembre de 2011.

<i>Variable</i>		<i>Pacientes n=322</i>	<i>Por ciento (%)100</i>
<i>Edad, mediana en años (Cuartil)</i>		40,0 (35,0-45,0)	
<i>Rangos</i>	30-40	178	5,5
	>41	144	44,7
<i>Nivel de escolaridad</i>	Primaria/Secundaria	60	18,6
	Pre-Universitario/ Técnico	179	55,6
	Medio	83	25,8
	Universitario		
<i>Estado civil</i>	Casada	227	70,5
	Divorciada, Soltera o Viuda	95	29,5
<i>Consumo de cigarrillos y/o alcohol</i>	Sí	81	25,2
	No	241	74,8
<i>Edad de la menarquía</i>	<10	36	11,2
	10-14	262	81,4
	>14	24	7,5
<i>Edad de las primeras relaciones sexuales</i>	<15	31	9,6
	15-20	255	79,2
	21-30	36	11,2
<i>Menopausia</i>	Sí	43	13,4
	No	279	86,6
<i>Metrorragia</i>	Sí	23	7,1
	No	299	92,9
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>	≤ 2	307	95,3
	> 2	15	4,7
<i>Uso de condón</i>	Sí	9	2,8
	No	313	97,2
<i>Uso de DIU</i>	Sí	157	48,8
	No	165	51,2
<i>Uso de anticonceptivos orales</i>	0	196	60,9
	≤ 5	42	13
	> 5	84	26,1
<i>Embarazos</i>	0	18	5,6
	1-2	106	32,9
	≥ 3	198	61,5
<i>Partos</i>	0	44	13,7
	1-2	244	75,8
	≥ 3	34	10,6
<i>Leucorrea</i>	Sí	129	40,1
	No	193	59,9

<i>Antecedentes de alguna cirugía cervical</i>	Sí	31	9,6
	No	291	90,4
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Sí	217	67,4
	No	105	32,6
<i>Colposcopia positiva</i>	Sí	152	47,2
	No	160	49,7
	SD	10	3,1
<i>Antecedentes de ITS</i>	Sí	188	58,4
	No	134	41,6

Fuente: Modelo de recogida de la información. **Abreviaturas:** DIU: dispositivo intrauterino; SD: sin datos disponibles; ITS: infecciones de transmisión sexual.

ANEXO 7

Operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH y las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, bajo grado y cáncer cervicouterino en mujeres mayores de 30 años atendidas en las consultas de Patología de Cuello Uterino de dos hospitales ginecobstétricos de La Habana. Enero 2009-diciembre 2011.

<i>Variable</i>	<i>Tipo</i>	<i>Operacionalización</i>		<i>Descripción</i>
		<i>Escala</i>		
<i>Infección por PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No		Presencia del PVH en cuello uterino (determinado a través de RCP cualitativa).
<i>Infección por PVH 6, PVH 11</i>	Cualitativa nominal	Sí No		Presencia del PVH 6, PVH 11 en cuello uterino (determinado a través de RCP-cualitativa tipo específica)
<i>Infección por PVH 16, 18, 31, 33, 45, 58</i>	Cualitativa nominal	Sí No		Presencia del PVH 16, 18, 31, 33, 45, 58 en cuello uterino (determinado a través de RCP-TR)
<i>Infecciones múltiples por PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No		Presencia de infección por varios genotipos de PVH.
<i>Infecciones con genotipos mayoritarios de PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No		Presencia de infección por un genotipo mayoritario de PVH a través del método de secuenciación nucleotídica.
<i>Resultados de la citología cervicouterina</i>	Cualitativa nominal	- Insatisfactorias - Satisfactorias		Interpretación de los resultados de la citología cervical, para evaluar si existen o no lesiones intraepiteliales cervicales.
<i>Resultados de la citología cervicouterina</i>	Cualitativa ordinal	-Negativas -Lesiones de Bajo Grado (NIC I) -Lesiones de Alto Grado (NIC II y NIC III) -Cáncer cervicouterino		Interpretación de los resultados de la citología cervicouterina, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero, incluyendo los criterios del Sistema Bethesda, 2001 para las citologías cervicouterinas que agrupa las lesiones en alto y bajo grado.

Abreviaturas: PVH: Papilomavirus humanos; RCP-TR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real; NIC I, II y III: Neoplasias Intraepiteliales Cervicales de grados I, II y III.

ANEXO 8

Operacionalización de las variables para definir la asociación entre la infección por PVH, las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, bajo grado y cáncer cervicouterino y los factores sociodemográficos, epidemiológicos y clínicos en mujeres mayores de 30 años atendidas en las consultas de patología de cuello uterino de dos hospitales ginecobstétricos de La Habana. Enero 2009-diciembre 2011.

<i>Variable</i>	<i>Tipo</i>	<i>Operacionalización Escala</i>	<i>Descripción</i>
<i>Edad</i>	Cuantitativa continua	30-40 >41	Edad en años cumplidos. Dato tomado de la encuesta.
<i>Nivel de escolaridad</i>	Cualitativa ordinal	Primaria/Secundaria Pre-Universitario/ Técnico Medio Universitario	Nivel educacional máximo alcanzado. Dato tomado de la encuesta.
<i>Estado civil</i>	Cualitativa ordinal	Casada Divorciada, Soltera o Viuda	Situación legal o no legal que conlleve a la convivencia y práctica o no de relaciones sexuales con una pareja masculina. Dato tomado de la encuesta.
<i>Consumo de cigarrillos y/o alcohol</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Costumbre o conducta de fumar cigarrillos y/o consumir bebidas alcohólicas. Dato tomado de la encuesta.
<i>Edad de la menarquía</i>	Cuantitativa continua	<10 10-14 >14	Edad en años cumplidos cuando tuvo su primera menstruación. Dato tomado de la encuesta.
<i>Edad de las primeras relaciones sexuales</i>	Cuantitativa continua	<15 15-20 21-30	Edad en años cumplidos cuando tuvo su primera relación sexual. Dato tomado de la encuesta.
<i>Menopausia</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Cambios en los ciclos menstruales, hormonales o anímicos asociados al climaterio. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Metrorragia</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Sangrado fuera del ciclo menstrual. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>	Cuantitativa discreta	≤2 >2	Cantidad de parejas con las que mantuvo relaciones en los dos años previos al estudio y en el momento del estudio. Dato tomado de la encuesta.
<i>Uso de condón</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Disposición o conducta habitual de mantener relaciones sexuales utilizando condón. Dato tomado de la encuesta.
<i>Uso de DIU</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Conducta habitual de utilizar algún tipo de dispositivo intrauterino como método anticonceptivo. Dato tomado de la encuesta.
<i>Uso de anticonceptivos orales</i>	Cuantitativa continua	0 ≤5 >5	Tiempo en años consumiendo tabletas anticonceptivas con o sin prescripción médica. Dato tomado de la encuesta.

<i>Embarazos</i>	Cuantitativa discreta	0 1-2 ≥3	Número de embarazos que haya llegado a su término o que hayan sido interrumpidos de forma provocada o espontánea. Dato tomado de la encuesta.
<i>Partos</i>	Cuantitativa discreta	0 1-2 ≥3	Número de partos fisiológicos o mediante cesárea. Dato tomado de la encuesta.
<i>Leucorrea</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Expulsión de secreciones vaginales en el momento del estudio. Dato tomado de la encuesta.
<i>Antecedentes de alguna cirugía cervical</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Historia anterior de haber sido sometida a alguna intervención quirúrgica en el cuello uterino. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Antecedentes de citología positiva</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Historia anterior de haber sido diagnosticada con alguna citología positiva, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Colposcopia positiva</i>	Cualitativa nominal	Sí No SD	Colposcopia positiva en el momento del estudio, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.
<i>Antecedentes de ITS</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Haber padecido alguna infección de transmisión sexual en algún momento anterior al estudio. Dato tomado de la historia clínica y de la encuesta.

Abreviaturas: DIU: dispositivo intrauterino; SD: sin datos disponibles; ITS: infecciones de transmisión sexual.

Otras _____

Actuales ITS _____

b) Antecedentes de prueba citológica alterada: Si _____ No _____

c) Antecedentes de cirugía cervical: Si _____ No _____

d) Antecedentes de colposcopia positiva Sí _____ No _____

VIII-HABITOS TÓXICOS (en los últimos 10 años): a) Cigarro _____ b) Alcohol _____

IX-RESULTADOS:

Prueba citológica Colposcopia Biopsia PVH-RCP

PVH-RCP-TR PVH-secuencia

Datos de la carga viral

ANEXO 10

Forma de Consentimiento informado

La que suscribe: _____.

He sido informada: Los Papilomavirus humanos que causan infecciones del tracto anogenital son transmitidos por vía sexual y están asociados a una serie de manifestaciones clínicas que pueden variar desde lesiones y condilomas benignos hasta alteraciones cervicouterinas displásicas de diferente grado (leves, moderadas y severas) y cáncer cervicouterino. Muchas infecciones pueden ser inaparentes o asintomáticas sin embargo el virus puede estar presente en las mucosas cervicouterinas y causar lesiones a largo plazo. Este agente viral se ha detectado en un 20% de mujeres con prueba citológica normal, en más de un 50% de mujeres con citología alterada y en casi 100% de los casos de cáncer cervicouterino. Existen ciertos factores de riesgo que pueden estar relacionados con esta enfermedad tales como las conductas sexuales de riesgo, el consumo de tabletas anticonceptivas, el tabaquismo, entre otras.

Hago costar, por este medio, mi disposición y consentimiento informado para participar en el estudio: *Detección de Papilomavirus humanos, carga viral y factores de riesgo asociados a la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, bajo grado y cáncer cervicouterino en mujeres mayores de 30 años atendidas en las consultas de Patología de Cuello Uterino de dos hospitales ginecobstétricos de La Habana, analizadas entre enero de 2009 y diciembre de 2011.*

Declaro que he sido informada del objetivo del estudio, que consiste en conocer la presencia de Papilomavirus humano, genotipos y posibles causas e implicaciones en mujeres cubanas mayores de 30 años residentes en Ciudad de la Habana que han sido diagnosticadas como NIC de diferente grado o cáncer cervicouterino.

Así mismo que se me han explicado las ventajas que para nuestro país y la salud pública significa conocer como se está comportando esta enfermedad en nuestra población femenina, para poner en práctica medidas de control y terapéutica eficientes.

Dejo constancia así mismo que conozco que se realizará una toma de muestras de células o de tejido endocervical, utilizando instrumental desechable para eliminar posibles riesgos de contaminación. Además queda claro que puedo ser excluida del estudio en el momento que lo desee y estime conveniente.

Nombre y Apellidos de la paciente participante en el estudio:

Firma de la paciente participante en el estudio: _____

Nombre y Apellidos del testigo: _____ Firma: _____

Yo, _____ médico especialista en ginecología y obstetricia, por medio de la presente declaro haberle explicado a la paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que la misma ha participado de forma absolutamente voluntaria.

Firmo la presente: _____

Fecha: _____

Investigador Principal

Firma

ANEXO 11

Datos generales de la población de individuos cubanos seropositivos a VIH con otras infecciones de transmisión sexual analizados entre abril y agosto de 2012.

<i>Variable</i>	<i>Pacientes n=56</i>	<i>Por ciento (%)100</i>
<i>Edad, mediana en años (Cuartil)</i>	35,0 (27,0-46,0)	
<i>Rangos</i>		
15-24	12	21,4
25-34	17	30,4
35-44	10	17,9
45-54	13	23,2
55 y más	4	7,1
<i>Nivel de escolaridad</i>		
Primaria/ Secundaria	15	26,8
Preuniversitario/Técnico Medio	29	51,8
Universitario	12	21,4
<i>Hábitos tóxicos</i>		
Hábito de Fumar	25	44,6
Ingerir Alcohol	22	33,3
<i>Edad de la primera relación sexual (años)</i>		
<15	19	33,9
≥15	37	66,1
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>		
1	19	33,9
2-4	18	32,2
5-10	8	14,3
>10	11	19,6
<i>Orientación sexual</i>		
HSH	50	89,3
Heterosexual	6	10,7
<i>Tipo de Práctica de sexo</i>		
Oral/Genital	51	91,1
Genital	5	8,9
<i>Historia de relaciones Sexuales ano-receptivas</i>		
Sí	48	85,7
No	8	14,3
<i>Número de parejas sexuales en los últimos dos años</i>		
1 pareja	19	34,0
2-4	18	32,1
5-10	8	14,3
>10	11	19,6
<i>Conteo de Linfocitos T CD4+ (células/mm³)</i>		
< 200	18	32,1
200-499	29	51,8
≥ 500	9	16,1
<i>Presencia de condilomas</i>		
Sí	47	84,0
No	9	16,1

Fuente: Modelo de recogida de la información. **Abreviaturas:** HSH: hombres que tienen sexo con otros hombres.

ANEXO 12

Operacionalización de las variables para definir la asociación entre infección por PVH y las lesiones intraepiteliales escamosas anales en hombres cubanos seropositivos a VIH con otras infecciones de transmisión sexual. Abril-agosto 2012.

<i>Variable</i>	<i>Tipo</i>	<i>Operacionalización Escala</i>	<i>Descripción</i>
<i>Infección por PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia del PVH en ano (determinado a través de RCP cualitativa).
<i>Infección por PVH 6, PVH 11</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia del PVH 6, PVH 11 en cuello uterino (determinado a través de RCP-cualitativa tipo específica)
<i>Infección por PVH 16, 18, 31, 33, 45, 58</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia del PVH 16, 18, 31, 33, 45, 58 en cuello uterino (determinado a través de RCP-TR)
<i>Infecciones múltiples por PVH</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia de infección por varios genotipos de PVH.
<i>Resultados de la citología anal</i>	Cualitativa nominal	- Insatisfactorias - Satisfactorias	Interpretación de los resultados de la citología anal, para evaluar si existen o no LIEA, según Clasificación de Bethesda, 2001 para las citologías cervicales y anales.
<i>Resultados de la citología anal</i>	Cualitativa ordinal	Negativas Atípicas Lesiones de Bajo Grado Atípicas de Alto Grado Lesiones de Alto Grado LIEA	Interpretación de los resultados de la citología anal, según la Clasificación de Bethesda, 2001 para las citologías cervicales y anales.

Abreviaturas: PVH: Papilomavirus humanos; RCP-TR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; LIEA: lesiones intraepiteliales escamosas anales que incluyen lesiones de bajo grado, lesiones de alto grado y citologías atípicas de alto grado; excluyen las citologías atípicas.

ANEXO 13

Operacionalización de las variables para definir la asociación entre infección por PVH, las lesiones intraepiteliales escamosas anales y los factores sociodemográficos, epidemiológicos y clínicos en hombres cubanos seropositivos a VIH con otras infecciones de transmisión sexual. Abril-agosto 2012.

<i>Variable</i>	<i>Tipo</i>	<i>Operacionalización Escala</i>	<i>Descripción</i>
<i>Edad</i>	Cuantitativa continua	20-29 30-39 40-49 55 y más	Edad en años cumplidos. Dato tomado de la encuesta.
<i>Nivel de escolaridad</i>	Cualitativa ordinal	Primaria/Secundaria Pre-Universitario/ Técnico Medio Universitario	Nivel educacional máximo alcanzado. Dato tomado de la encuesta.
<i>Hábito de fumar</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Costumbre o conducta de fumar cigarrillos. Dato tomado de la encuesta.
<i>Ingestión de Alcohol</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Costumbre o conducta de ingerir bebidas que contienen alcohol. Dato tomado de la encuesta.
<i>Edad de la primera relación sexual</i>	Cuantitativa continua	< 15 años ≥ 15 años	Edad en años cumplidos cuando tuvo su primera relación sexual. Dato tomado de la encuesta.
<i>Parejas sexuales referidas en los últimos dos años</i>	Cuantitativa discreta	1 2-4 5-10 >10	Cantidad de parejas con las que mantuvo relaciones en los dos años previos al estudio y en el momento del estudio. Dato tomado de la encuesta.
<i>Orientación sexual</i>	Cualitativa nominal	HSH HT	Disposición o conducta de mantener relaciones sexuales con personas de su propio sexo y/o del sexo opuesto. Dato tomado de la encuesta.
<i>Tipo de práctica de sexo</i>	Cualitativa nominal	Oral/Genital Genital	Formas o vías de ejecutar el sexo o las relaciones sexuales. Dato tomado de la encuesta.
<i>Historia de relaciones sexuales ano-receptivas</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Antecedentes de haber realizado práctica sexual ano-receptiva. Dato tomado de la encuesta.
<i>Conteo de CD4+ en el momento del estudio (células/mm³)</i>	Cuantitativa discreta	≤ 200 200-500 > 500	Conteo de linfocitos CD4+ (células/mm ³). Dato recogido de la historia clínica.
<i>Presencia de condilomas</i>	Cualitativa nominal	Sí No	Infección transmitida a través del contacto sexual fundamentalmente, causada por PVH de bajo riesgo oncogénico. Dato recogido de la encuesta y la historia clínica.

Abreviaturas: PVH: Papilomavirus humanos; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; HSH: hombres que tienen sexo con hombres; HT: heterosexuales.

ANEXO 14

Modelo de recogida de la información (cuestionario)

Nombre y apellidos: _____

Carnet de identidad: _____ Fecha de consulta: _____

No. _____ HC: _____ Sexo: _____ Edad: _____ Raza: _____

Escolaridad: _____ Ocupación: _____ Fecha nacimiento: _____

Hábitos tóxicos: Cigarrillos __ Alcohol __ Drogas no legales __

APP: _____

Edad de las primeras relaciones sexuales (incluye anales): _____

Orientación sexual: HSH: (Homosexual __ Bisexual __) Heterosexual __

Número de parejas sexuales referidas (últimos 2 años previos a la consulta): _____

Tipo de sexo: oral__ genital __ oral/genital __

Historia de relaciones sexuales anales: si__ no __ Receptor de sexo anal: si__ no__

Fecha de diagnóstico de VIH: _____

ITS actualmente: si __ no __ ¿Cuál (es)? _____ fecha: _____

Manifestaciones cutáneas y/o mucosas de lesiones asociadas a ITS: (Descripción) _____

Complementarios: VDRL _____ o RPR _____ TPHA _____

HBsAg: _____

Conteo de CD4+ _____ Carga viral VIH _____

Anticuerpos séricos anti-VHC: _____

Tratamiento antirretroviral: si __ no __

Resultados de la citología anal (Descripción): _____

Insatisfactoria: __ Satisfactoria para evaluación: __

Lesión intraepitelial anal de alto grado (Lesión de alto grado) __

Células de significado indeterminado en las que no se puede descartar lesión de alto grado (Atípica de alto grado) __

Lesión intraepitelial anal de bajo grado (Lesión de bajo grado) __

Células de significado indeterminado (Atípicas) __

Negativa para lesiones intraepiteliales anales o malignidad (Negativa) __

Tipo de PVH (RCP cualitativa) _____

Tipo de PVH (RCP-TR): _____

Datos de la carga viral de

PVH _____

ANEXO 15

Forma de Consentimiento informado

El que suscribe: _____.

Por medio de la presente se ha solicitado mi colaboración completamente voluntaria, para formar parte de esta investigación titulada: *Detección y tipificación de Papilomavirus humanos, valor de la carga viral y su posible asociación con las variables clínicas y epidemiológicas en hombres cubanos seropositivos al VIH con otras infecciones de transmisión sexual.*

Con el advenimiento de la epidemia de VIH se han incrementado un grupo de infecciones y otras afecciones que han suscitado innumerables esfuerzos para esclarecer sus causas y otros aspectos. Entre las mencionadas afecciones encontramos las Infecciones de Transmisión Sexual en pacientes seropositivos al VIH y algunas neoplasias que han aumentado su aparición después del advenimiento de la terapia antirretroviral, como el cáncer anal en hombres.

El propósito fundamental de nuestro estudio es determinar las infecciones por Papilomavirus humanos (PVH) e identificar lesiones precursoras del cáncer anal, además de los factores que influyen en las mismas. Para esto, necesitamos obtener una muestra del canal anal, a través de un hisopado, para realizar citología anal e identificar los genotipos de PVH con que está infectando.

Se recogerán datos que serán llevados a un modelo de recogida de información, Ud. debe responder a las preguntas, de forma voluntaria.

Los resultados obtenidos serán estrictamente confidenciales, serán del dominio de los investigadores principales del estudio.

La finalidad del trabajo es elevar la calidad de vida de los pacientes con VIH/sida, a través de los resultados del mismo.

Respetando los principios de voluntariedad, los participantes están en todo su derecho de decidir si desean o no formar parte de la investigación, y una vez, si Ud. lo desea puede solicitar su exclusión. Esta decisión será respetada y no conlleva a ninguna penalidad o pérdida de los beneficios, a los cuales tiene derecho, por disposición del Sistema Nacional de Salud Cubano, como ciudadano de este país.

A cada participante se le informará el resultado de los estudios que se les realizó. Con su aprobación, los resultados de la investigación, en la cual Ud. tiene la posibilidad de participar, serán publicados en instancias nacionales e internacionales de forma anónima.

De acuerdo con lo planteado en este documento, yo _____ estando en pleno uso de mis facultades, accedo a participar en este estudio.

Del mismo modo certifico que participaré en dicho estudio de una forma absolutamente voluntaria, teniendo derecho a conocer los resultados de los exámenes que me fueron realizados. Certifico por la presente que autorizo a las entidades sanitarias nacionales y/o extranjeras, al comité ético a consultar los informes hospitalarios que poseen mi nombre, sin que por ello pierdan su carácter confidencial.

Nombre y Apellidos del paciente y/o padre o tutor participante en el estudio:

Firma del paciente y/o padre o tutor participante en el estudio: _____

Nombre y Apellidos del testigo: _____ Firma: _____

Yo, _____ médico especialista en dermatología por medio de la presente declaro haberle explicado al paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que el mismo ha participado de forma absolutamente voluntaria.

Firmo la presente: _____

Fecha: _____

Investigador Principal

Firma
