

Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas de cuello uterino

JAIME LÓPEZ M.^{1,a,b,§}, CARMEN GLORIA ILI G.^{1,a,b,§}, PRISCILLA BREBI M.^{1,a},
PATRICIA GARCÍA M.^{1,a}, ITALO CAPURRO V.³, PABLO GUZMÁN G.^{1,2},
EUGENIO SUÁREZ P.⁴, JOSÉ MANUEL OJEDA F.⁵, JUAN CARLOS ROA S.^{1,2}

Human papillomavirus genotyping of cervical uterine preneoplastic lesions in a high risk area

Background: The relationship between human papillomavirus (HPV) and uterine cervical cancer (UCC) is widely known and accepted. **Aim:** To determine the frequency of genotypes of HPV in cervical preneoplastic lesions in a high risk area of UCC. **Material and Methods:** Using a combination of PCR and Reverse Line Blot technique, 235 formalin fixed paraffin embedded samples, with diagnosis of low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) or high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) were genotyped. **Results:** HPV was detected in 61.2% of LSIL and 78.1% of HSIL. The main genotypes found were HPV 16, 18, 31, 45, 56 y 58. HPV 16 was the most common in both LSIL (18.1%) and HSIL (36.9%). HPV 16 or 18 were present in 25.1% and 47.1% of the LSIL and HSIL respectively. In both LSIL and HSIL, the predominant viral genotypes were those types classified as with a high oncogenic risk. **Conclusions:** HPV genotypes 16, 18, 31, 45, 56 y 58 were the most common in our series. HPV 16 and 18, viral types with high oncogenic risk and included in commercial vaccines, were found in 25.1% and 47.1% of LSIL and HSIL, respectively. (Rev Med Chile 2010; 138: 1343-1350).

Key words: Alpha papilloma virus; Genotype; Uterine Cervical neoplasms.

El cáncer cervicouterino (CCU) constituye un importante problema de salud pública, correspondiendo a la segunda neoplasia más prevalente en mujeres a nivel mundial y a la quinta causa de muerte por cáncer en esta población¹⁻³. La incidencia del CCU y de sus etapas precursoras es elevada, principalmente en países en vías de desarrollo¹. Cada año, 470.000 nuevos casos de cáncer cervical son diagnosticados en todo el mundo, de los cuales aproximadamente la mitad morirá⁴. En Chile, ocupa el quinto lugar como causa de muerte por tumores malignos en la mujer. Se estima una

incidencia de 14,4 casos por 100.000 mujeres y una tasa de mortalidad de 6,6 casos en 100.000 mujeres, en el año 2006⁵. Según datos del Departamento de Estadísticas e Informaciones de Salud, la mortalidad en el año 2007 fue de 6,1 por 100.000 mujeres con 638 defunciones por esta causa^{3,6-8}. En la Región de La Araucanía, constituye la tercera causa de muerte por cáncer, desplazando al cáncer de mama al cuarto lugar^{3,9}. Aunque esta patología puede detectarse precozmente, continúa siendo la causa de muerte más frecuente en mujeres entre 35 y 54 años¹⁰. Se desconoce la incidencia de las

¹Laboratorio de Patología Molecular, Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Núcleo de Desarrollo Científico Tecnológico en Biorecursos (BIOREN), Temuco, Chile.

²Unidad de Anatomía Patológica-Citología, Hospital Dr. Hernán Henríquez Aravena, Temuco, Chile.

³Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁴Departamento de Ginecología Oncológica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁵Facultad de Medicina, Universidad Diego Portales, Santiago, Chile.

⁶Estudiante Programa de Doctorado en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular Aplicada y Becario CONICYT, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁷Tecnólogo Médico,

⁸Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Trabajo financiado por Proyecto DIUFRO D110-0055 y CORFO INNOVA 07CNI3PBT-222

Recibido el 19 de agosto de 2010, aceptado el 2 de noviembre de 2010.

Correspondencia a:
Dr. Juan Carlos Roa S.
Departamento de Patología,
Facultad de Medicina,
Universidad de La Frontera,
Manuel Montt 112.
Código Postal 478-1176.
Temuco, Chile.
Fono: 045-592148/09-8479697, Fax: 045-296530.
E-mail: jcroa@ufro.cl

lesiones preinvasoras (NIE/CIS), pero según estimaciones del Ministerio de Salud, se diagnostican anualmente alrededor de 11.000 casos¹¹.

La patogenia del cáncer de cuello uterino comienza como un lento proceso que interrumpe la diferenciación normal del epitelio escamoso cervical, lo que produce cambios en su estructura y fisiología¹². Como consecuencia de la infección por virus papiloma humano (HPV), se desarrollan displasias en las células cervicales, lo que se manifiesta por alteraciones en la forma, tamaño y organización del epitelio¹²⁻¹⁷. Actualmente, estas lesiones han sido clasificadas como neoplasias intraepiteliales (NIE) tipo I, II y III. Las NIE y el carcinoma *in situ* (CIS), que se limita al epitelio sin traspasar la lámina basal, constituyen las lesiones precursoras del CCU^{12,14,15,17}. Cuando la lesión traspasa la lámina basal hacia el estroma del tejido se denomina carcinoma invasor¹². Las lesiones intraepiteliales también se pueden clasificar de acuerdo al grado de progresión y regresión que presenten. Se describen como lesiones de alto grado (LAG) correspondientes a las NIE II, NIE III y carcinoma *in situ* (CIS) y lesiones de bajo grado (LBG), correspondiente a NIE I y/o infección con HPV. Aproximadamente 11% de las NIE I progresan a CIS y 1% a cáncer invasivo^{13,14,16}, presentando alrededor de 57% de regresión a citología normal. Las LAG tienen una mayor progresión a CCU con tasas desde 43% a 70%^{14,16,18,19}. Los diferentes porcentajes de progresión y regresión de las lesiones varían según la ubicación geográfica, dependiendo del nivel de educación de las personas afectadas, así como también de los programas de prevención y pesquisa que estén instaurados en cada país²⁰.

El rol del HPV se encuentra bien establecido en el desarrollo del CCU¹³, presentándose en 99,7% de los casos^{3,8,14,21}. Por ello, la detección de HPV se considera un complemento del diagnóstico clínico de pacientes con CCU o durante el desarrollo de lesiones preneoplásicas⁸. Otros cánceres también han sido relacionados con HPV, dentro de los cuales destacan cáncer de vulva, vagina, pene, región perianal, ovario, piel, amígdala, orofaríngeo, laríngeo, esófago, uretra y próstata^{21,22}.

En nuestro país, existen escasos estudios publicados sobre detección de HPV en lesiones preneoplásicas del cuello uterino⁷. La prevalencia de HPV en las LAG, LBG y en casos de ASCUS es variable, siendo más de 80%, entre 59% y 82% y entre 25% y 47%, respectivamente²³⁻²⁵.

Se han descrito más de 200 genotipos virales, de los cuales aproximadamente 40 presentan tropismo por el área anogenital y mucosas, los que pueden ser agrupados en HPV de alto riesgo (AR) y bajo riesgo oncogénico (BR), dependiendo de su asociación con lesiones de alto grado o carcinomas invasores^{12,26}. Los HPV de BR incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, entre los más frecuentes. De ellos los más importantes son los tipos 6 y 11, asociados principalmente al desarrollo de condilomas en hombres y en mujeres^{14,26}. Los HPV de AR que se consideran potencialmente oncogénicos por su presencia en LAG y carcinomas, son los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82¹. Los HPV más frecuentes en los CCU son HPV 16 que está asociado a 50%-60% de todos los cánceres y HPV 18 que es observado en 15%-20%²⁷. Existen diferentes metodologías para la detección y tipificación de HPV, entre las cuales se encuentran *Reverse Line Blot* (RLB) Enzimainmunoensayo (EIA), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), *Dot Blot* o PCR *real time*. RLB es la metodología más económica y eficiente, ya que permite en un ensayo, detectar y tipificar más de 30 genotipos de HPV en aproximadamente 40 muestras de forma simultánea, además es más sensible y específica que las técnicas realizadas mediante restricción enzimática y *Dot-Blot*^{28,29}.

Actualmente, existen en el mercado dos vacunas para el control de HPV que cubren los tipos virales de AR más frecuentes a nivel mundial, HPV16 y 18³⁰ y por lo menos una de éstas presenta reacción cruzada para otros tipos virales de AR tales como HPV31 y 45³¹. Aunque se encuentran cubiertos los genotipos más frecuentes en cáncer, aproximadamente 30% de los CCU no serán prevenidos, por lo tanto, las mujeres deberán continuar realizándose el PAP de control a futuro³².

Para establecer el impacto de las vacunas en la prevención de lesiones preinvasoras y averiguar si estas vacunas tendrían un importante rol en la prevención del CCU en nuestra población, es importante conocer cuáles son los genotipos virales de HPV que se observan en las etapas previas al desarrollo del cáncer. Debido a ello se planteó determinar la distribución de los diferentes genotipos de HPV en las lesiones preneoplásicas de cuello uterino de la Región de La Araucanía, Temuco, Chile.

Material y Método

Muestras: Se seleccionaron 235 biopsias de cuello uterino obtenidas durante el año 2007, (muestras de archivo fijadas en formalina e incluidas en parafina) desde el archivo del Departamento de Patología de la Universidad de La Frontera, provenientes del Policlínico de Patología Cervical del Hospital Dr. Hernán Henríquez Aravena de Temuco. Las muestras correspondieron a 116 casos con diagnóstico histopatológico de LBG y 119 casos con diagnóstico de LAG. El estudio fue autorizado por el Comité de Ética del Servicio de Salud de la Región de la Araucanía y las pacientes fueron ingresadas previa firma de consentimiento informado.

Extracción de ADN: Se microdisecaron manualmente 5 cortes de 10 micras de la zona de la lesión marcada en una lámina teñida con hematoxilina-eosina (HE). El tejido fue digerido en *buffer* de lisis con proteinasa K [10 mg/mL]. El ADN se precipitó en isopropanol e hidrató para su almacenamiento a -20°C hasta su análisis³³.

PCR beta globina: La integridad del ADN obtenido y su factibilidad para ser usado en ensayos de PCR fue evaluada mediante la amplificación de un fragmento de 268pb del gen de beta-globina en condiciones de PCR descritas previamente³⁴.

Controles para PCR: Como control negativo del PCR específico para HPV se empleó ADN genómico humano (Promega, Madison, Wisconsin, USA) y como blanco se utilizó mezcla de PCR sin ADN. Como controles positivos para HPV se empleó un panel de 36 genotipos de HPV, de los cuales HPV16, 18, 31 y 33 correspondieron a plásmidos recombinantes solicitados al ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) y el resto fueron facilitados por Dr. Peter Snijder (Vrije, Universiteit Medical Center, Amsterdam, Holanda).

Detección de HPV: Se amplificó un fragmento de 150pb del gen L1 utilizando los partidores GP5+ y GP6+ biotinilados que permiten amplificar un fragmento de 150 pb del gen L1 del virus y detectar así una amplia gama de tipos de HPV, tanto de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 subtipos IS39

y W13B/MM4), como de bajo riesgo (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 70, 71, 72, 81, 83, 84 y CP6108)^{28,34}.

Tipificación de HPV: Se utilizó la técnica de *Reverse Line Blot* (RLB) con productos de PCR biotinilados. Este método permite la hibridación no radiactiva de estos productos de PCR biotinilados con diferentes sondas de oligonucleótidos mediante un sistema de *Miniblotter* (MN 45; Immunetics, Boston, MA, USA)^{34,35}. Se utilizaron 36 oligosondas modificadas (18 de genotipos de AR y 18 de BR)³⁴. Las oligosondas se unieron de forma covalente a una membrana Biodyne C (Pall Bio-Support, West Chester, Pennsylvania, USA) activada con EDAC (Sigma, St Louis, Missouri, USA). Los productos de PCR obtenidos con los partidores GP5+ y GP6+ biotinilado, fueron denaturados a 96°C, enfriados en hielo, aplicados en cada capilar del *Miniblotter*, de forma perpendicular a las líneas de las oligosondas. La hibridación fue completada luego de 1 hora y luego la membrana fue removida y lavada. Para detectar la señal de hibridación del ADN, la membrana se incubó con un conjugado de streptavidina-peroxidasa (Roche, Basilea, Suiza) que interactúa con el producto de PCR biotinilado, seguido por detección quimioluminiscente mediante autoradiografía.

Resultados

Se realizó la detección y tipificación de HPV a 235 muestras de tejido fijado, que correspondieron a 116 (49,4%) LBG y 119 (50,6%) LAG. En las LBG la edad de los pacientes fluctuó entre 17 y 73 años, con un promedio de 33 años. En las LAG fluctuó entre 17 y 78 años, con un promedio de 34 años.

Beta globina: El total de las muestras fueron beta globina positiva.

Detección y tipificación de HPV: En la Tabla 1 se observan los genotipos virales detectados tanto para las muestras con LBG y con LAG.

Lesión de Bajo Grado: En las LBG estudiadas el 61,2% de los casos fueron positivos para HPV. El 54,2 % correspondieron a casos de infección única (IU), es decir, con sólo un tipo viral y el 7% restante fueron casos de infección con múltiples tipos (IM).

Tabla 1. Genotipificación HPV en biopsias de cuello uterino fijadas y emparafinadas con lesiones de bajo grado (LBG) y en lesiones de alto grado (LAG). Temuco, Chile, 2007

Infecciones únicas	LBG			LAG		
	n	% del total	% sobre casos IU	n	% del total	% sobre casos IU
HPV 16	21	18,1	33,3	44	36,9	50,0
HPV 45	11	9,5	17,4	1	0,9	1,2
HPV 56	6	5,2	9,5	2	1,7	2,3
HPV 58	3	2,6	4,8	9	7,6	10,2
HPV 18	2	1,6	3,2	9	7,6	10,2
HPV 31	2	1,6	3,2	13	10,9	14,8
HPV 51	2	1,6	3,2	1	0,9	1,2
HPV 35	1	0,9	1,6	4	3,3	4,5
HPV 33	0	-	-	3	2,5	3,4
HPV 39	1	0,9	1,6	0	-	-
HPV 52	0	-	-	1	0,9	1,2
HPV 53	1	0,9	1,6	0	-	-
HPV 59	1	0,9	1,6	0	-	-
HPV 66	1	0,9	1,6	1	0,85	1,2
HPV 70	1	0,9	1,6	0	-	-
HPV 6	4	3,4	6,3	0	-	-
HPV 11	6	5,2	9,5	0	-	-
Total	63	54,2	100,0	88	73,9	100,0
Casos negativos	45	38,8	-	26	21,8	-
Infecciones múltiples		% del total	% sobre casos IM	n	% del total	% sobre casos IM
HPV16/11	2	1,75	25,0	0	-	-
HPV16/58	1	0,9	12,5	0	-	-
HPV16/42	1	0,9	12,5	0	-	-
HPV18/11	1	0,9	12,5	0	-	-
HPV56/6	1	0,9	12,5	0	-	-
HPV58/6	1	0,9	12,5	0	-	-
HPV16/39/45	1	0,9	12,5	0	-	-
HPV16/31	0	-	-	1	0,8	20,0
HPV18/51	0	-	-	2	1,7	40,0
HPV45/35	0	-	-	1	0,8	20,0
HPV11/58	0	-	-	1	0,8	20,0
Total	8	7,0	100,0	5	4,2	100,0
Total de muestras	116			119		

LBG: lesiones de bajo grado, LAG: lesiones de alto grado, IU: infección única, IM: infección múltiple, (-): no encontrado, no aplica.

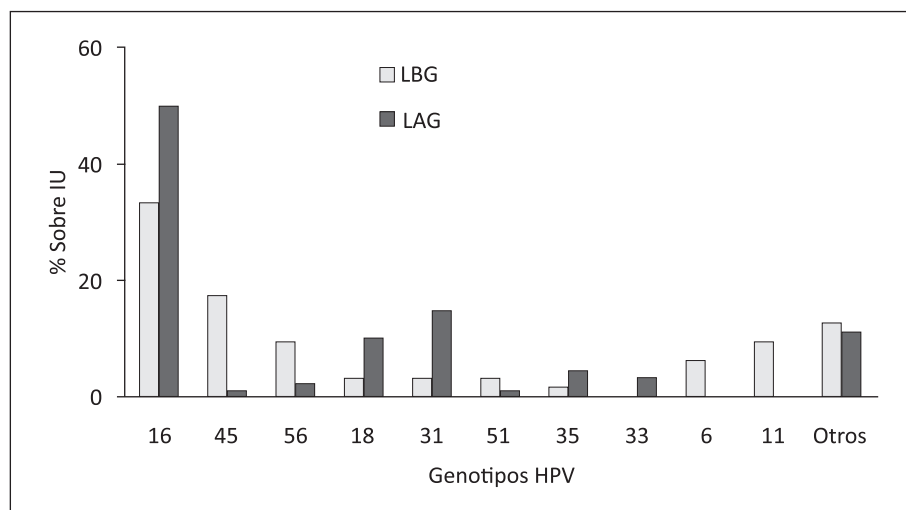


Figura 1. Frecuencia de infecciones únicas de HPV en lesiones de bajo grado y en lesiones de alto grado, Otros: HPV 39, HPV 52, HPV 53, HPV 59, HPV 66 y HPV 70, Temuco, Chile, 2007.

Los principales genotipos de HPV registrados en los casos de IU fueron HPV 16 (18,1%), HPV 45 (9,5%), HPV 56 y 11 (5,2%), HPV 6 (3,4%), HPV 58 (2,6%) y HPV 18, 31 y 51 (1,6%). Los genotipos menos frecuentes fueron HPV 35, 39, 53, 59, 66 y 70 (0,9%) (Figura 1). Las IM registraron una mayor frecuencia del grupo viral compuesto por HPV 16/11 (1,8%), observándose en menor frecuencia (0,9%) los grupos virales HPV 16/58, HPV 16/42, HPV 18/11, HPV 56/6, HPV 58/6 y HPV 16/39/45. HPV 16 y/o 18 que estuvieron presentes en el 25,1% del total de las muestras.

Del total de genotipos registrados en las LBG, 77,8% correspondieron a genotipos virales de AR y 22,2% a BR.

Lesión de alto grado: En las LAG estudiadas 78,2% de los casos fueron positivos para HPV (73,9% correspondieron a IU y el 4,2% restante fueron casos de IM). Los principales genotipos de HPV registrados en los casos de IU fueron HPV 16 (36,9%), HPV 31 (10,9%), HPV 18 y 58 (7,6%), HPV 35 (3,3%), HPV 33 (2,5%) y HPV 56 (1,7%). Los genotipos menos frecuentes fueron HPV 45, 51, 52 y 66 (0,9%) (Figura 1). Las IM registraron con mayor frecuencia el grupo viral compuesto por HPV 18/51 (1,7%). Además fueron observados los grupos virales HPV 16/31, HPV 45/35 y HPV 11/58 con una baja frecuencia de casos (0,8%). HPV 16 y/o 18 estuvieron presentes en 47,1% del total de las muestras.

Del total de genotipos registrados en las LBG, 80,0% correspondieron a genotipos virales alto riesgo y 20,0% a bajo riesgo.

Discusión

Distintos estudios realizados a nivel mundial señalan una alta frecuencia de HPV en las LBG y LAG de cuello uterino; de igual manera, es reconocido que HPV está presente en el 99,7% de los casos de CCU³⁵. En este estudio la prevalencia de HPV en las lesiones preneoplásicas fue de 61,2% en LBG y 78,2% en LAG, valores muy cercanos a lo descrito en la literatura, que fluctúan entre 59% y 82% en las LBG y superan el 80% en LAG^{23-25,36}.

Los genotipos virales de alto riesgo fueron más frecuentes que los de bajo riesgo, tanto en las LBG como en las LAG. Dentro de los genotipos virales de bajo riesgo registrados en las LBG se encuentran HPV 42, 70, 6 y 11; y en las LAG HPV 42, 6 y 11. Se ha observado que los genotipos virales de alto riesgo se relacionan estrechamente con la progresión de las lesiones preneoplásicas hacia cáncer, mientras que los genotipos virales de bajo riesgo serían eliminados por la acción del sistema inmune. Por tanto, una alta frecuencia de genotipos virales de alto riesgo, tendría directa relación con la elevada prevalencia del CCU en esta zona⁷.

Un metaanálisis realizado por Clifford et al, demostró que en el mundo existe una gran va-

riedad de genotipos virales presentes en las lesiones preneoplásicas, entre los que se encuentran principalmente HPV 16, 18, 31 y 33³⁷. En este estudio, también observamos una alta variedad de genotipos virales, siendo el más frecuente HPV 16, seguido de 45, 31 y 18. A nivel mundial, HPV 16 es el genotipo más frecuente en las lesiones preneoplásicas en Sudamérica, África, Asia y Europa^{1,16,36,38-41}, lo cual coincide con lo obtenido en este estudio, ya que este tipo viral estuvo presente en 18,1% de las LBG y en 36,9% de las LAG.

Los genotipos virales HPV 16 y/o 18 son los más frecuentes en CCU^{2,27,42} y por esto son los incluidos en las vacunas comerciales disponibles actualmente^{30,31}. En este estudio ambos virus se encontraron presentes en 25,1% de la LBG y en 47,1% de las LAG. Además una de estas vacunas presenta la acción cruzada con HPV 31 y HPV 45 lo cual, según los datos obtenidos en esta investigación, permitiría cubrir 36,1% y 59,6% de las LBG y LAG, respectivamente.

Debido a ello la implementación de un programa de vacunación profiláctica contra HPV tendría positivos efectos a mediano plazo en la disminución de la aparición y posible progresión de las lesiones preneoplásicas y el desarrollo de CCU, al estar directamente relacionadas con la presencia de los genotipos virales incluidos en las vacunas disponibles en el mercado.

Para este estudio se utilizaron muestras de archivo fijadas en formalina e incluidas en parafina, debido a que esto permite conservar la arquitectura del tejido y es la metodología de almacenamiento más utilizada en los laboratorios de patología. Se ha demostrado que esta técnica de conservación genera problemas en la obtención de material genético de buena calidad necesario para la aplicación de variadas técnicas moleculares⁴³. A pesar de ello, la técnica de tipificación utilizada, permitió obtener buenos resultados, lo que demuestra su alta sensibilidad. Dentro de otras ventajas de la técnica de *Reverse Line Blot* se destaca que es económica y eficiente, ya que permite en un ensayo, detectar y tipificar más de 30 genotipos de HPV en aproximadamente 40 muestras de forma simultánea; además, es más sensible y específica que las técnicas realizadas mediante restricción enzimática y *Dot-Blot*.

Los tipos de HPV de bajo riesgo oncogénico suelen asociarse con condiloma y/o LBG, y aquellos de alto riesgo con LAG y con carcinoma

infiltrante¹². Sin embargo, en estudio se identificaron principalmente tipos virales de alto riesgo oncogénico tanto en las LBG como en las LAG.

Con lo anteriormente expuesto, queda de manifiesto la relación que existe entre los genotipos virales de alto riesgo y la progresión de las lesiones preneoplásicas hacia cáncer invasivo. Una adecuada caracterización de las lesiones presentes en el cuello uterino acompañada de la genotipificación de HPVs infectantes entregaría mayores herramientas al momento de tratar el tipo de lesión preneoplásica observada.

Agradecimientos: Financiado por del proyecto INNOVA CORFO 07CN13PBT-222 y proyecto DIUFRO DI10-0055.

Referencias

- Muñoz 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.
- Rolon PA, Smith JS, Muñoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer* 2000; 85 (4): 486-91.
- Brebi MP, Ili GC, López MJ, García MP, Melo AA, Montenegro HS, et al. [Detection and genotyping of human papillomavirus in biopsies of uterine cervical adenocarcinoma]. *Rev Med Chile* 2009; 137 (3): 377-82.
- Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist* 2005; 10 (7): 528-38.
- <http://www.uicc.org/general-news/globocan-2008-launched>.
- Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I, et al. HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999; 81 (3): 554-8.
- Aedo S, Melo A, García P, Guzmán P, Capurro I, Roa JC. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Rev Med Chile* 2007; 135: 167-73.
- Roa JC, García P, Gómez J, Fernández W, Gaete F, Espinoza A, et al. HPV genotyping from invasive cervical cancer in Chile. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 105 (2): 150-3.
- Suárez E, Prieto M, Rojas I, Fernández B, Prado R, Olfos P. Programa nacional de Cáncer Cervicouterino. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2001; 66: 480-91.

10. Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, Ampuero SL, Snijders PJ, Meijer CJ, et al. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13 (12): 2271-6.
11. Ministerio de Salud. Guía Clínica Cáncer Cérvicouterino 21st EdSantiago: Minsal 2005.
12. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews* 2007; 7 (1): 11-22.
13. Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002; 78 (918): 225-8.
14. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (1): 1-17.
15. Solorza G, Ortíz A, Muñoz S, Vargas C, Vargas V. Cervical intraepithelial neoplasia. Diagnosis and treatment. *Gamo* 2006; 5 (4).
16. Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care* 2006; 12 (17 Suppl): S462-72.
17. Jenkins D. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Dis Markers* 2007; 23 (4): 199-212.
18. Chan JK, Berek JS. Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (20): 2975-82.
19. Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol* 2004; 42 (4): 255-66.
20. Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin* 2001; 51 (2): 92-114; quiz 5-8.
21. Rivera R, Aguilera J, Larraín A. Epidemiología del Virus Papiloma Humano (HPV). *Rev Chil Obstet Ginecol* 2002; v. 67 n. 6.
22. Petersen I, Klein F. [HPV in non-gynecological tumors]. *Pathologie* 2008; 29 Suppl 2: 118-22.
23. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C, Weiss NS, Kuypers JM, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 2002; 288 (14): 1749-57.
24. Huang SL, Chao A, Hsueh S, Chao FY, Huang CC, Yang JE, et al. Comparison between the Hybrid Capture II Test and an SPF1/GP6+ PCR-based assay for detection of human papillomavirus DNA in cervical swab samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (5): 1733-9.
25. Kulasingam SL, Kim JJ, Lawrence WF, Mandelblatt JS, Myers ER, Schiffman M, et al. Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 2006; 98 (2): 92-100.
26. Guzmán P, Ili C, Rifo P, Briceño G, Araya J, Villaseca M, et al. [Prevalence of human papillomavirus genital infection among male university students]. *Rev Med Chile* 2008; 136 (11): 1381-9.
27. Castle PE, Gravitt PE, Solomon D, Wheeler CM, Schiffman M. Comparison of linear array and line blot assay for detection of human papillomavirus and diagnosis of cervical precancer and cancer in the atypical squamous cell of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (1): 109-17.
28. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (10): 3020-7.
29. Melo A, Montenegro S, Hooper T, Capurro I, Roa JC, Roa I. [Human papilloma virus (HPV) typing in preneoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix in the IX region-Chile]. *Rev Med Chile* 2003; 131 (12): 1382-90.
30. McIntosh J, Sturpe DA, Khanna N. Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention: practice and policy implications for pharmacists. *J Am Pharm Assoc* (2003) 2008; 48 (1): e1-13; quiz e4-7.
31. Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernández-Avila M, Wheeler CM, et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naive women aged 16-26 years. *J Infect Dis* 2009; 199 (7): 926-35.
32. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2007; 56 (RR-2): 1-24.
33. García P, Benavente F, Melo AA, Roa I, Roa JC. Effect of fixation on DNA quality: controlled study with five fixatives. *Rev Esp Patol* 2006; 39 (3): 175-9.
34. van den Brule AJ, Pol R, Franssen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (3): 779-87.
35. Snijders PJ, van den Brule AJ, Jacobs MV, Pol RP, Meijer CJ. HPV DNA detection and typing in cervical scrapes. *Methods Mol Med* 2005; 119: 101-14.

36. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89 (1): 101-5.
37. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (5): 1157-64.
38. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366 (9490): 991-8.
39. Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer* 2008; 122 (2): 424-7.
40. Bhattarakosol P, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratanachai S, Niruthisard S. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 Suppl 1: S360-5.
41. Esmaili M, Bonyadi M, Dastranj A, Alizadeh M, Melli MS, Shobeiri MJ. HPV typing in women with cervical precancerous and cancerous lesions in northwestern Iran. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 66 (1): 68-72.
42. Santos C, Muñoz N, Klug S, Almonte M, Guerrero I, Alvarez M, et al. HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer* 2001; 85 (7): 966-71.
43. García P, Benavente F, Melo A, Roa I, Roa J. Effect of fixation on DNA quality: controlled study with five fixatives. *Rev Esp Patol* 2006; 39: 175-9.