

Maestría en Microbiología Molecular VII° Cohorte.

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud

Universidad Nacional de San Martín.

***“Epidemiología molecular de la infección  
genital por virus papiloma humano (HPV)  
en la ciudad de Viedma.”***

**Maestrando: Bioq. Darío Fabián di Prátula**

**Directora: Dra. María Alejandra Picconi**

**Lugar de realización: Hospital Regional Artemides Zatti  
(Viedma, Río Negro, Argentina)**

Tesis presentada para optar por el grado de

Magister en Microbiología Molecular.

Buenos Aires, Abril 2015

Maestría en Microbiología Molecular VII° Cohorte.

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud

Universidad Nacional de San Martín.

***“Epidemiología molecular de la infección  
genital por virus papiloma humano (HPV)  
en la ciudad de Viedma.”***

Maestrando: Bioq. Darío Fabián di Prátula

Directora: Dra. María Alejandra Picconi

Lugar de realización: Hospital Regional Artemides Zatti (Viedma,  
Río Negro, Argentina).

Tesis presentada para optar por el grado de  
Magister en Microbiología Molecular.

Buenos Aires, Abril 2015

***“Soy un monigote de arena. Juguemos, y si me borro, por lo menos me borraré jugando.”***

***Laura Devetach.***

### **Dedicado**

- ✓ A mi esposa Eloísa, que ha sufrido a mi lado, gracias por tu paciencia, te amo.
  - ✓ A mis hijos, Fausto y Donatella, que son la razón de mi vida.
  - ✓ A mis padres Mirta y Horacio, que con su amor incondicional acompañaron mi crecimiento y me enseñaron que siempre a algo nuevo que aprender.
  - ✓ A mi abuela Susana, que con 93 años, es dueña de una fortaleza enorme.
  - ✓ A mis hermano, Marcelo, que va ser padre nuevamente, felicitaciones
  - ✓ A mis hermanos menores, Sabrina y Pablo, que sigan mis pasos.
- A todos ellos, los amo.

## **Agradecimientos:**

Agradezco a todos aquellos de que de manera directa o indirecta colaboraron con mi trabajo, especialmente a mi directora, Dra. María Alejandra Picconi, que continuó con su apoyo a pesar de transitar momentos difíciles y que con su paciencia y dedicación permitió la finalización exitosa de este proyecto.

Al Bioq. Magister Jorge Basiletti que me brindó su tiempo y conocimientos en la mesada del Laboratorio, para poder realizar las tipificaciones y a todos los integrantes del Servicio de Virus Oncogénicos por su buena onda.

A los integrantes del Servicio de Ginecología del Hospital Zatti, especialmente a las Dras. Sol Gallego, Gabriela Osses y Julieta Tasarolli.

Al Dr Julio Brunori y la Bioq Graciela Gerometa del Servicio de Patología, por el aporte de las biopsias.

Un agradecimiento muy especial a la Enfermera de consultorio de Ginecología, Iris Llanqueleo y al Auxiliar de Patología Paulo Calvo, por su invaluable colaboración en el guardado y transporte de muestras y en la búsqueda de archivo de las pacientes.

Y por último pero no menos importante a mi compañero de mesada durante los últimos diez años, cuya desempeño, colaboración y acompañamiento, aportaron cuali- y cuantitativamente a la culminación de la presente tesis, gracias Raúl.

A todos ellos Gracias totales.

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	7
1.1 El Agente .....	7
1.2 Taxonomía .....	8
1.3 Historia Natural de la Infección por HPV .....	10
1.4 Patogenia de las Enfermedades Genitales Inducidas por HPV .....	11
1.5 Potencial Oncogénico Viral .....	15
1.6 Co-Factores Asociados a la Oncogénesis por HPV .....	20
1.7 Epidemiología de la Infección por HPV Y Del CCU .....	22
1.8 Detección y Tipificación Viral.....	24
1.8.1 Uso Clínico: .....	25
1.8.2 Aplicaciones en Epidemiología y Vigilancia Laboratorial .....	26
1.9 Prevención: .....	27
1.9.1 Primaria: Vacunas .....	27
1.9.2 Secundarias: Tamizaje.....	28
<b>2. Objetivos</b> .....	31
2.1 Objetivo General .....	31
2.2 Objetivos Particulares.....	31

<b>3. Materiales y Métodos:</b> .....	32
3.1 Población Estudiada.....	32
3.2 Recolección de Muestras Estudiadas .....	33
3.3 Estudios Viroológicos .....	34
3.3.1 Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos.....	34
3.3.2 Detección y Tipificación de HPV .....	35
3.4 Análisis Estadístico .....	36
<b>4. Resultados</b> .....	37
4.1 Características de la Población .....	37
4.2 Detección y Tipificación de HPV .....	40
<b>5. Discusión</b> .....	45
<b>6. Conclusiones</b> .....	55
<b>7. Anexos</b> .....	56
7.1 Anexos I: Toma, Conservación y Transporte de muestras para el estudio de HPV.....	56
7.2 Anexo II: Procesamiento de las muestras para el estudio de HPV.....	58
7.3 Anexo III: Ficha Epidemiológica Estandarizada.....	64
<b>8. Bibliografía</b> .....	66

# 1. Introducción

## 1.1 El Agente

Los virus papiloma se encuentran ampliamente extendidos en la naturaleza y se asocian generalmente a lesiones epiteliales benignas en sus hospedadores naturales. Desde comienzos de siglo pasado ha sido reconocida la relación de estos virus con verrugas y condilomas que aparecen naturalmente en el hombre, en numerosos mamíferos y en algunas especies aviarias (*Carballal y col, 1998*).

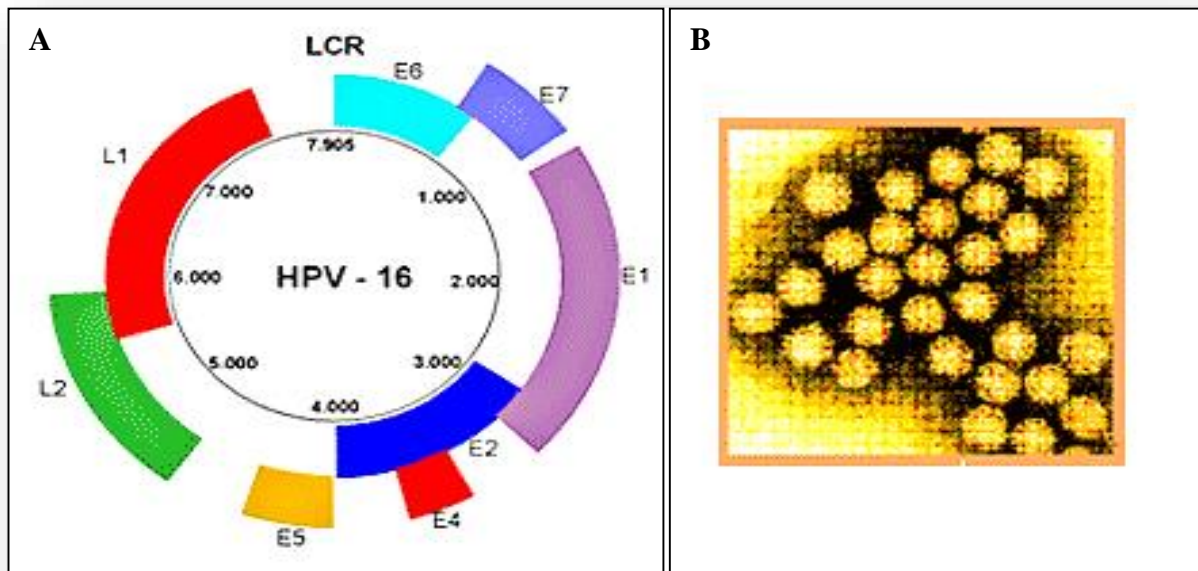
En la especie humana, los *virus papiloma humano* (HPV) pueden infectar piel y mucosas y están asociados a lesiones benignas, pre-malignas y a una variedad de carcinomas, en particular el cáncer cérvico uterino (CCU).

Los papilomavirus poseen un DNA de forma circular de doble cadena, son pequeños, desnudos y de forma icosaédrica, las partículas tienen un tamaño aproximado de 55 nm de diámetro, conteniendo a un *dsDNA* de aproximadamente 8,000 pares de bases (pb) de longitud.

Dicho genoma circular puede ser sub-dividido en tres regiones (*Figura 1*), una región temprana (E), una tardía (L) y la región larga de control (LCR). La región E contiene al menos siete marcos de lectura abiertos que codifican para proteínas involucradas en la transcripción viral (E2), la replicación del DNA viral (E1 y E2), la proliferación celular (E5, E6 y E7) y posiblemente, algunos pasos tardíos en el ciclo viral (E4). La región L comprende dos marcos de lectura abiertos, L1 y L2 que codifican para las proteínas de la cápside.

Debido a que estos virus no son propagables en los cultivos celulares convencionales, los avances en los estudios virológicos se vieron postergados hasta el advenimiento de las metodologías de biología molecular. A mediados de 1970, H. Zur Hausen y colaboradores publicaron los primeros datos que vinculaban lesiones del cérvix con la infección por HPV y en

la década del 80, clonaron y caracterizaron los primeros HPVs a partir de lesiones cervicales.



**Figura 1: A:** Mapa genómico del HPV-16. El DNA circular bicatenario tiene una longitud de 7,904 pb. La transcripción se produce en el sentido de las agujas del reloj. (Adaptado de A. Cann "Papovarisuses", Course BS335: Virology. <http://www.tulane.edu/~dmsander/www/335/Papovaviruses.html>)

**B:** Partículas del *virus papiloma humano* al microscopio electrónico.

## 1.2 Taxonomía

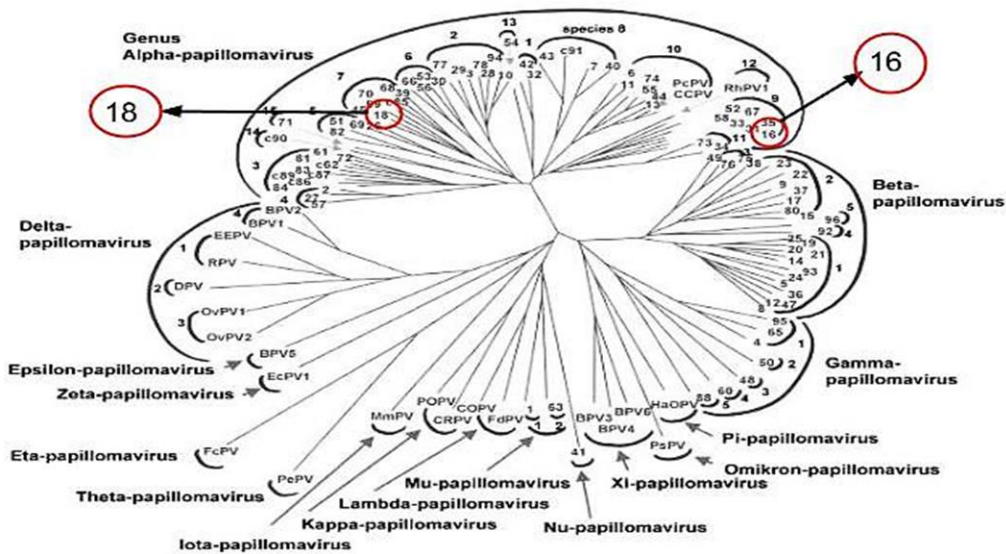
Estos virus pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Actualmente el criterio de clasificación de los HPVs se basa en la homología del gen L1 por ser una región altamente conservada. Así, se establece que los HPVs pertenecientes a los grupos de órdenes altos llamados *géneros* comparten unos con otros al menos entre un 40-60% de la secuencia de nucleótidos de L1.

Los pertenecientes a órdenes menores llamados *especies* comparten entre 60-70% de la secuencia y agrupan tipos de HPVs que son genómicamente distintos. Los llamado tipos de



HPV comparten entre un 71-89%, por los que un nuevo tipo viral es introducido cuando éste difiere en más de un 10% con la L1 de los tipos conocidos.

Para tipos virales que solo difieren en un 2-10% en la secuencia se ha introducido el concepto de subtipos y de variante cuando esa diferencia es entre el 1-2%. (Figura 2) (Ethel-Michele de Villiers y col, 2004).



**Figura 2:** Arbol Filogenético conteniendo las secuencias de 118 tipos de papillomavirus. E.-M de Villiers y col/Virology 324 (2004).

En la actualidad hay descriptos más de 120 genotipos de HPV, aproximadamente 40 son mucosotropos y se encuentran involucrados en infecciones del tracto ano-genital femenino y masculino, de la mucosa orofaríngea y de las vías respiratorias superiores.

Los HPV mucosotropos, se subagrupan según su potencial oncogénico en genotipos de alto riesgo oncogénico (HPV-AR) los cuales bajo la forma de infección persistente pueden conducir a la transformación neoplásica; bajo riesgo oncogénico (HPV-BR) comúnmente

presentes en las lesiones benignas con mínimo riesgo de progresión maligna, y aquéllos de probable alto riesgo oncogénico (HPV-PAR) cuyo potencial carcinogénico está aún en evaluación (Tabla 1). (Muñoz y col, 2003; Castle y col, 2010; Bouvard y col, 2009; Schiffman y col, 2009).

**Tabla 1:** Tipos de HPV

<b>Bajo riesgo (BR)</b>	<b>Probable alto riesgo</b>	<b>Alto riesgo (AR)</b>
6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	26, 53, 66, 68, 73, 82	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

### 1.3 Historia Natural de la Infección por HPV

La infección por HPV se adquiere por contacto directo entre epitelios; unas de las principales vías de transmisión es la sexual. El período de incubación es prolongado y va de pocas semanas hasta más de un año, con un promedio de tres meses. La evolución de la infección es variada y puede ser asintomática, manifestarse como verruga, como lesiones recurrentes o lesiones invasivas.

La replicación del genoma, la formación de la nucleocápside y la maduración del virión se producen en el núcleo de las células epiteliales basales, debido a que el HPV no compromete células de la dermis porque estas no son metabólicamente activas. (Shors y col, 2009; Longworth y col, 2004).

La infección genital por HPV está ampliamente difundida en la población general, en especial en los jóvenes al inicio de su actividad sexual. Se estima que el 75% de los individuos sexualmente activos adquieren esta infección en algún momento de su vida y más del 70%

remiten espontáneamente. Si bien sus patrones epidemiológicos son similares en todo el mundo, se han sugerido ciertas particularidades geográficas asociadas a las costumbres sexuales y al nivel socio-cultural, entre otros factores.

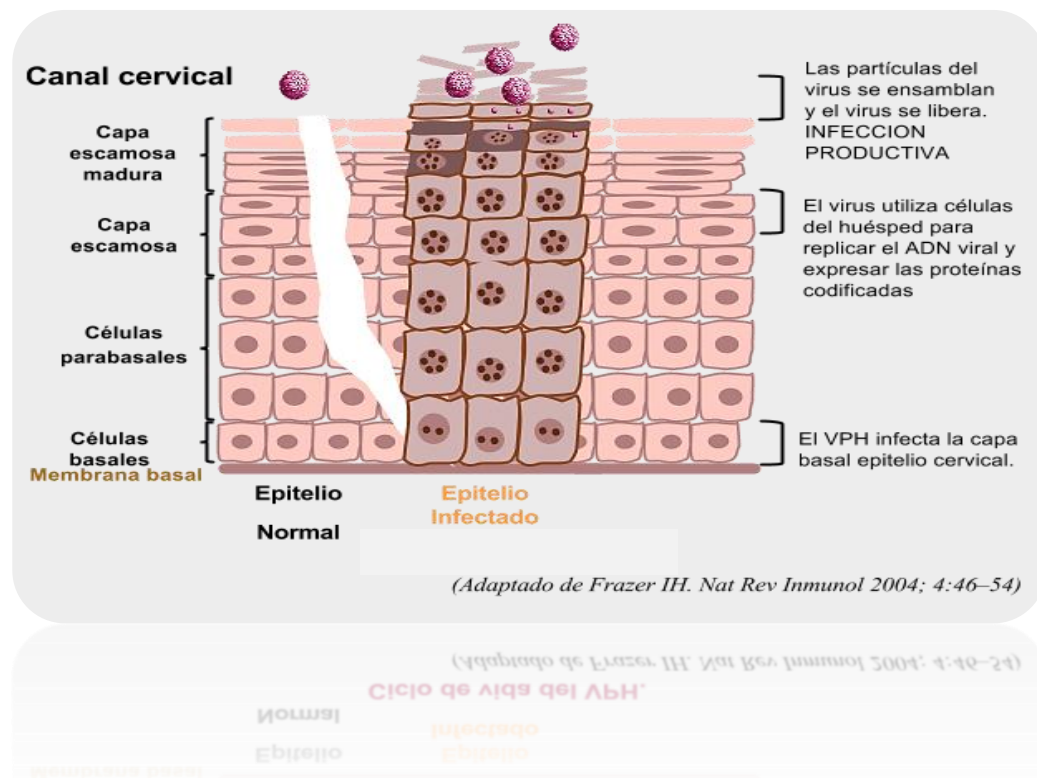
En trabajos que intentan explicar el modelo de infección por HPV-AR, se ha evidenciado que durante la actividad sexual, el microtrauma producido sobre el epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, permite la exposición de las células basales en activa proliferación al virus facilitando la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi terminal. *Figura 3*

Una vez unido, se produce la internalización del virus al citoplasma de la célula huésped, a través de los sistemas de endocitosis clatrina o caveolina (*Bousarghin y col, 2003*).

Posteriormente la cápside viral, de 55 nm de diámetro, experimenta degradación en el citoplasma celular a través de reducción química que ataca los puentes di-sulfuro, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares. Con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (*Merle y col, 1999; Nelson y col, 2002; Doorbar y col, 2012*).

#### **1.4 Patogenia de las enfermedades genitales inducidas por el HPV**

El HPV puede afectar a todo el tracto ano-genital, aunque las infecciones localizadas en el cuello uterino han constituido el principal foco de atención, particularmente la *zona de transformación o transición*, sitio donde se reúnen los epitelios del ectocérvix (plano estratificado



**Figura 3:** Ciclo de vida del HPV: El virus llega a las células basales a través de microtraumas generados durante el acto sexual; una vez endocitado produce la infección de las mismas, replica en forma rápida su ADN y sintetiza sus proteínas utilizando la maquinaria anabólica celular. Posteriormente las partículas virales se ensamblan y liberan, transformando la infección en productiva. Adaptado de Frazer IH. Nat Rev Immunol 2004; 4:46-54.

no queratinizado) con el del endocervix (cilíndrico simple y mucíparo). En la edad reproductiva es común el desplazamiento del epitelio endocervical por fuera del orificio ectocervical anatómico, dando lugar a la ectopía. La actividad sexual y los procesos inflamatorios en general (tal como la irritación producida por la acidez vaginal, etc.), producen erosiones en el epitelio, que son rápidamente reemplazadas por tejidos metaplásicos de cicatrización; por esta razón, esta zona, de activa proliferación celular, es el blanco preferido del virus y el asiento más frecuente de las lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas del cuello uterino.

Las principales lesiones del tracto ano-genital inducidas y/o asociadas al HPV son:

a) **Condiloma acuminado** (del griego “kondylus” que significa “nudillo”): Las verrugas genitales o condilomas acuminados pueden ser únicos o múltiples, son visibles a simple vista y se caracterizan por pápulas exofíticas de color carne a gris. Su tamaño es pequeño, 1 mm<sup>2</sup>, aunque pueden fusionarse alcanzando grandes dimensiones en embarazadas o pacientes inmunocomprometidos. Pueden ubicarse en cualquier sitio de los genitales, aunque generalmente se observan en cuello uterino, vagina, vulva y pene y en forma ocasional en escroto, ingles y perineo (Avendaño y col, 2011).

En el cérvix, es frecuente la observación colposcópica de lesiones condilomatosas, con papilomatosis menos evidente (condiloma plano). Los condilomas acuminados se asocian preferentemente a los HPVs tipos 6 y 11, mientras que los condilomas planos presentan una diversidad de tipos virales distintos, incluyendo HPV-AR.

Las modificaciones morfológicas cumplen con el patrón de las infecciones productivas ya descrito anteriormente, pudiendo ser diagnosticado citológica e histológicamente. El riesgo de malignización de estas lesiones es mínimo, en general son lesiones autolimitadas, con alto porcentaje de regresión espontánea o por tratamiento. Cuando los condilomas extensos muestran aspectos histológicos de invasión destructiva local sin metástasis, suelen denominarse tumores de Buschke- Lowenstein, carcinomas verrucosos o condilomas gigantes.

b) **Lesiones intraepiteliales:** se asocian en su gran mayoría a infecciones subclínicas. Se solían denominar *displasias*, pero es menos usado en la actualidad. Incluyen a aquellas lesiones con alteraciones en la proliferación, maduración y diferenciación celular con atipías de distinta jerarquía. La graduación en la clasificación avanza a medida que las alteraciones morfológicas propias del espectro neoplásico se hacen más intensas y comprometen una mayor altura del epitelio. Así se establecen displasias *leves*, *moderadas* y *severas* (incluyendo en esta última al *carcinoma “in situ”*) (Figura 4). En 1973, Richart propuso la denominación de *neoplasia*

*intraepitelial cervical* (CIN, del inglés *cervical intraepithelial neoplasia*), al sostener la hipótesis de una continuidad lesional entre la displasia y el carcinoma “in situ”; así se distinguieron tres grados de acuerdo a la severidad de la lesión: CIN I, CIN II y CIN III. En 1988, surgió un nuevo sistema, conocido como Bethesda (*NCI, The 1988 Bethesda System..., 1989*), que estableció las categorías de: *células escamosas de significado indeterminado* (ASCUS del inglés *Atypical squamous cells of undetermined significance*), *lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado* (L-SIL, del inglés *low grade squamous intraepithelial lesion*), que se corresponde con el CIN I y *de alto grado* (H-SIL, del inglés *high grade squamous intraepithelial lesion*), que incluye a CIN II y CIN III-carcinoma in situ. Esta clasificación fue revisada y actualizada en 2001 (*Solomon y col, 2002*) y se establecieron nuevos consensos en 2007 (*Solomon y col, 2006*).

c) **Cáncer invasor:** es el estadio más avanzado cuando las células neoplásicas invaden el estroma mediante la ruptura de la membrana basal; se subclasifica de acuerdo al grado de invasión y la distribución y compromiso neoplásico de los vasos subepiteliales.

La nomenclatura en patología cervical ha variado notablemente con el correr del tiempo, desde la primitiva clasificación de Papanicolaou en grados I al V, hasta la última propuesta de Bethesda, sistema de clasificación diagnóstica cito-histológica que actualmente prima.

La infección asintomática y la presencia de verrugas o condilomas son las formas clínicas más comunes. Ser portador de una infección por HPV no implica que se vaya a desarrollar una lesión maligna; la mayoría de las infecciones (alrededor del 80%) son “transitorias” y revierten espontáneamente, sobre todo en mujeres menores de 30 años ya que el virus es controlado por el sistema inmune del propio organismo. Sólo alrededor del 10% de las infecciones se tornarán “persistentes”, siendo éste el primer paso requerido para una eventual carcinogénesis.



(Adaptado de Schiffman y col., 2007)

**Figura 4.** Historia natural de la infección por HPV y desarrollo de cáncer cervicouterino. En la parte superior pueden observarse fotos correspondientes a citologías exfoliativas del cérvix (tinción de Papanicolaou) y debajo fotos tomadas durante exámenes colposcópicos del cuello uterino. En ambos casos, la gravedad de las lesiones crece hacia la derecha (Adaptado de Schiffman y col, 2007).

El ASCUS y las L-SIL son lesiones mayormente producidas por infecciones transitorias de *HPVs-BR* y *HPVs-AR*, sin predominio marcado de uno u otro tipo en particular, no dejando secuelas onco-patogénicas. Las H-SIL son generadas por infecciones persistentes de tipos de *HPVs-AR* que no pudieron ser controlados por el sistema inmune, y tienen riesgo de progresar a lesiones graves del cuello uterino (carcinoma in situ y cáncer invasor).

## 1.5 Potencial oncogénico viral

El potencial oncogénico de los virus papiloma ha sido estudiado desde hace décadas gracias a modelos animales que han demostrado su asociación con el desarrollo de lesiones malignas, tanto en sus hospedadores naturales como en heterólogos.

Las primeras sospechas del potencial oncogénico de los HPV en humanos datan de la década de 1950 (*Jablonska y col, 1957*), cuando se observó que la epidermodisplasia verruciforme, enfermedad dermatológica rara, caracterizada por lesiones verrugosas en toda la superficie del cuerpo, podía desarrollar cáncer de piel en aquellas placas ubicadas en zonas expuestas a la luz solar. En 1978 se demostró que estas lesiones contenían HPV tipos 5 y 8 (*Orth y col, 1978*). A principios de la década de 1970, surgieron las primeras teorías sobre la asociación de HPV con el cáncer de cérvix (*Zur Hausen y col, 1976*) y a partir de 1983, diversos tipos virales comenzaron a ser identificados a partir de biopsias de carcinomas cervicales (*Dürst y col, 1983; Boshart y col, 1984*). Actualmente se estima que alrededor del 15% de los cánceres humanos (9 millones de nuevos casos en el mundo, en 1990) están asociados a agentes infecciosos, correspondiendo cerca de la tercera parte de ellos al HPV.

La Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, Lyon, Francia) ha establecido que existen evidencias suficientes para considerar que los HPV-AR, en particular los tipos 16 y 18 son *carcinogénicos en humanos*; esta afirmación está sustentada en hallazgos epidemiológicos y experimentales (*Muñoz y col, 2006*). Los datos epidemiológicos disponibles indican que la asociación entre la infección por ciertos tipos de HPV y el cáncer de cérvix cumple con los criterios establecidos de *causalidad*, dicha asociación es fuerte, consistente y temporal.

Las principales evidencias biológico-experimentales que apoyan el rol etiológico del HPV en el cáncer de cérvix son:

a) ***Tipos virales de “alto riesgo oncogénico”***: en el 100% de biopsias de cánceres de cérvix se ha detectado ADN de los HPV-AR (principalmente los tipos 16 y 18). *Figura 5*. Esto ha sido corroborado también en líneas celulares humanas, provenientes de carcinomas de cérvix, tales como HeLa (que contiene secuencias de HPV 18) y CaSki y SiHa (que contienen secuencias de HPV 16). Por lo que se considera que la infección con estos virus es condición necesaria para el

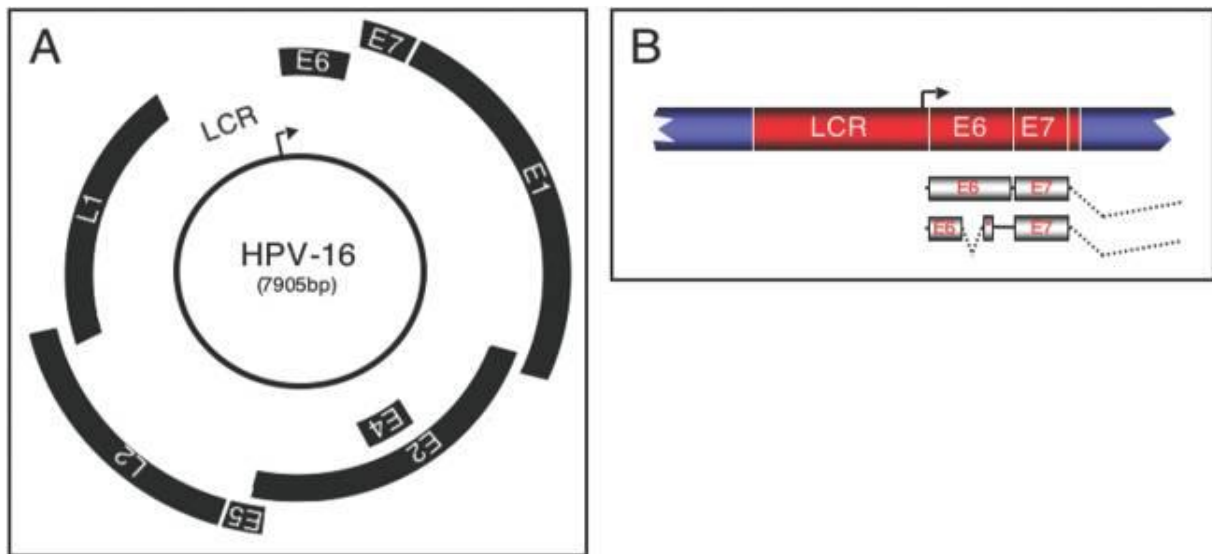


desarrollo del cáncer (*Walboomers y col, 1999*).

**b) *Oncogenes virales E6 y E7:*** Los HPV poseen en su genoma secuencias con capacidad transformante: los *oncogenes E6 y E7*. Son considerados los genes más importantes en la estimulación de la proliferación y la transformación celular. Por esta razón estos virus, en particular los de *alto riesgo*, tienen la capacidad de inmortalizar *in vitro* fibroblastos y queratinocitos cervicales humanos, los cuales, después de sucesivos subcultivos son tumorigénicos cuando se inoculan en ratones atímicos (*McDougall y col, 1994*). *Figura 5*.

**c) *Estado físico del ADN viral en la célula infectada (episomal o integrado):*** La mayoría de los cánceres de cérvix y las líneas celulares derivadas de estos tumores, contienen el ADN viral integrado al genoma celular. Este proceso de integración involucra la ruptura del gen viral E2, conduciendo a la pérdida del control en la expresión de E6 y E7 y a la desestabilización del genoma celular. Si bien la integración viral en los cromosomas es al azar, en muchos casos se han identificado en la proximidad de “sitios frágiles” o de oncogenes celulares (*ras, myc, raf*, etc.) promoviendo su activación. Este proceso puede implicar la pérdida de algunos genes virales, aunque se conservan los oncogenes E6 y E7. Contrariamente, en las lesiones benignas el genoma viral permanece en su forma original de ADN circular cerrado y episómico, con activa producción de proteínas virales de cápside L1 y L2 y con inhibición de las proteínas E6 y E7. (*Tonon y col, 2001*). *Figura 5*

**d) *Expresión de los oncogenes virales E6 y E7:*** En tumores, líneas celulares derivadas de carcinomas de cérvix y células transformadas *in vitro* por HPV, no sólo se detecta la presencia de estos genes virales, sino que, además, están expresadas las *oncoproteínas E6 y E7*. Esta expresión sería un requerimiento para el inicio y el mantenimiento del fenotipo maligno (*Stoler y col, 1992*).



**Figura 5: Mecanismo de inducción oncogénica por el virus del papiloma humano, K Münger. 2004.**

**A)** Representación esquemática del genoma circular de doble cadena del HPV 16. Se observan la región larga de control (LCR), los genes tempranos (E) y tardíos (L) y el promotor temprano más importante ( $P_{97}$ ) señalado con una flecha. En esta representación la transcripción se produce a partir de una sola hebra y en sentido horario. **B)** Representación esquemática de un fragmento mínimo del genoma del HPV 16 (rojo), luego de la integración con el genoma de la célula huésped (azul). Luego de la integración los genes E6 y E7 se expresan constantemente, mientras que el resto pueden haber sido eliminados.

e) ***Interacción de las oncoproteínas virales con proteínas celulares supresoras tumorales:***

Se demostró “in vitro” que las oncoproteínas E6 y E7 de los *HPVs-AR* presentan la propiedad de unirse con alta afinidad a las proteínas celulares supresoras tumorales p53 y pRB (proteína del retinoblastoma), respectivamente; esto originaría una inestabilidad genética sostenida que induciría la conversión maligna.

La p53 controla la proliferación celular y evita la fijación de errores en el ADN, frenando el ciclo celular; permitiendo la reparación del mismo ADN o induciendo la apoptosis (muerte celular programada) cuando el daño es irreversible. La oncoproteína E6 no sólo se une a p53 sino que además la degrada; conduciendo a la acumulación de mutaciones al impedir su normal funcionamiento (Kessis y col, 1993).

La pRB y sus proteínas asociadas p107 y p130 ejercen un control negativo del ciclo celular. Su

unión con *E7* perturbaría su accionar normal, liberando al factor transcripcional E2F y conduciendo a un aumento de la proliferación (*Münger y col, 1989*).

f) Por otro lado, E6 es capaz de estimular la actividad *telomerasa*, vinculada con el crecimiento neoplásico. Los telómeros son unidades repetitivas cortas de ADN, que aportan estabilidad al extremo de los cromosomas eucarióticos. La telomerasa es una transcriptasa reversa que adiciona secuencias, impidiendo el acortamiento de los telómeros. En las células somáticas normales, la telomerasa está inactiva y los telómeros se van acortando en los sucesivos pasajes; esto conduce a un aumento de la inestabilidad genética, lo que detiene el crecimiento y progresan hacia la senescencia. Por el contrario, en las células germinales, la telomerasa está activa, estabilizando la longitud del telómero.

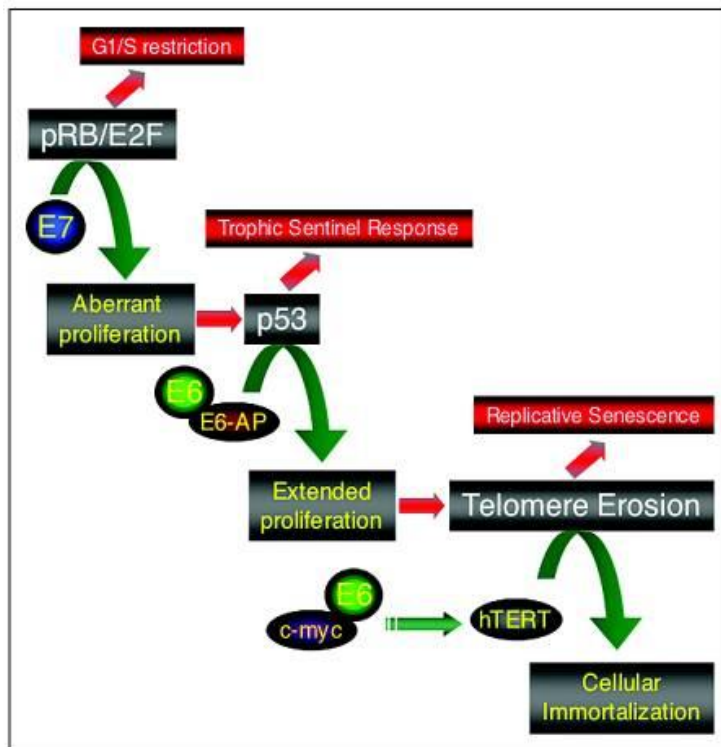
En las células inmortalizadas *in vitro* por HPV-AR: las interacciones E6-p53 y E7-pRB conducen a la prolongación del ciclo celular, superando la senescencia normal. En el punto de crisis de la proliferación, la activación de la telomerasa inducida por E6 sería clave para la supervivencia de la célula, conduciendo a una proliferación indefinida (*McDougall y col, 1999*) *Figura 6*.

## 1.6 Co-factores asociados a la oncogénesis por HPV

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por HPV es una condición necesaria pero no suficiente para la génesis del tumor. La infección persistente por HPV-AR, es considerada como el de principal factor de riesgo para el desarrollo del CCU.

Pocas mujeres infectadas, eventualmente desarrollan lesiones precancerosas y CCU por lo que se ha establecido la influencia de otros factores asociados al hospedador que pueden afectar el curso de la infección (*Castellsagué y col, 2002*), entre ellos cabe destacar:

a) ***Estado inmune:*** la respuesta inmune mediada por células constituye la principal vía de control y eliminación de la infección por HPV. En los distintos individuos se expresan formas



**Figura 6: Mecanismo de inducción oncogénica por el virus del papiloma humano, K Münger. 2004.** Esquema de los pasos críticos de los HPV-AR para inducir carcinogénesis. Las vías de inactivación del gen supresor tumoral p53 y pRb y la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) constituyen un subconjunto de pasos que han demostrado ser necesarios, in vitro, para la generación de células epiteliales humanas totalmente transformadas.

diferentes de los *antígenos leucocitarios humanos* (HLA), responsables de la amplia diversidad en la selección y presentación de péptidos correspondientes a un determinado antígeno viral. Los haplotipos HLA de un individuo en particular podrían influenciar el curso de la historia natural de una infección por HPV, pudiendo ser uno de los determinantes de la *regresión, persistencia o progresión* de las lesiones cervicales. Datos publicados sugieren que ciertos haplotipos de los HLA se encuentran más frecuentemente en pacientes con lesiones severas por lo que se consideran “predisponentes”, mientras que otros detectados en mujeres infectadas que no desarrollaron lesiones serían haplotipos “protectivos” (Eiguchi y col, 2008; Stanley y col, 2009).

**b) Multiparidad:** Se ha encontrado una relación directa entre el elevado número de embarazos de término y el riesgo de CCU (Castellsagué y col, 2002), esto podría deberse a efectos traumáticos, hormonales e inmunológicos que exponen la zona de transformación, facilitando de esta manera la persistencia de la infección viral, primer paso a la carcinogénesis.

c) **Anticonceptivos orales (ACO):** Las hormonas esteroides (estrógenos y progesterona), en su forma natural o sintética, son muy utilizadas en los esquemas de reproducción asistida, anticoncepción y como terapia de reemplazo hormonal en la posmenopausia (*Castro Romero y col, 2011*). Estas hormonas desempeñan una función muy importante en diversos procesos biológicos y su uso prolongado por más de 5 años podría ser un cofactor que incrementase el riesgo de CCU en mujeres infectadas por HPV-AR (*Moreno y col, 2002*). Otros autores proponen que tras un diagnóstico de displasia, en aquellas mujeres que consumen anticonceptivos orales, la progresión a carcinoma *in situ* es más rápida (*Moreno y col, 2002*).

No hay muchos datos disponibles sobre las posibles causas de este efecto, aunque existe cierta evidencia por experimentos *in vitro*, de la promoción por parte de las hormonas, de la integración del genoma viral al genoma del hospedador, llevando a la desregulación en la expresión de las proteínas E6 y E7. Además existen datos en modelos animales que demuestran un mecanismo sinérgico entre la exposición prolongada a ACO y la expresión de oncogenes de HPV16 (*Elson y col, 2000*).

b) **Tabaquismo:** La influencia del tabaquismo en el desarrollo del CCU tuvo controversias; sin embargo actualmente se acepta, que aumentaría 3 veces el riesgo de padecer la enfermedad comparado con las mujeres no fumadoras y se ha documentado que existe una fuerte relación entre la disminución del tamaño y la gravedad de las lesiones intraepiteliales y la reducción o abandono del hábito de fumar (*Szarewski y col, 1996; Serrano y col, 2004*).

Se ha propuesto la hipótesis de que los carcinógenos procedentes del consumo de tabaco, nicotina y cotinina, al ser transportados por el sistema circulatorio y llegar al epitelio cervical, puedan iniciar o actuar como co-carcinógenos en las células ya afectadas por agentes transformantes. Otros autores atribuyen el potencial carcinogénico a la disminución de la habilidad del hospedador de establecer una adecuada respuesta inmune local, debido a una disminución de

células de Langerhans (*Hildesheim y col, 2001; Szarewski y col, 1998; Prokopczyk y col, 1997; Yang y col, 1996*).

c) **Asociación con otras infecciones de transmisión sexual:** La co-infección del HPV junto a otros agentes de transmisión sexual, aumenta la respuesta inflamatoria local, lo que conlleva a un incremento del trauma producido sobre el epitelio y una disminución en su capacidad de reparación. Se ha demostrado cierta asociación entre CCU con algunas enfermedades de transmisión sexual como sífilis o blenorragia (*Bosch y col, 2002*), así como también en HSV tipo 2 y *Chlamydia trachomatis* (*Deluca y col, 2011*).

Adicionalmente, la co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aumentaría hasta cinco veces la probabilidad de desarrollar neoplasia cervical, frente a la mujeres no infectadas con VIH (*Marais y col, 2012*).

## 1.7 Epidemiología de la infección por HPV y del CCU

Esta patología representa el segundo cáncer más común en mujeres en todo el mundo; se detectan anualmente 529.000 nuevos casos, con 275.000 muertes, presentándose el 85% de estos casos en países en vías de desarrollo (*Crown y col, 2012*).

De acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Salud, en Argentina se diagnostican cada año aproximadamente 4000 casos nuevos de CCU y mueren aproximadamente 1800 mujeres a causa de la enfermedad (*Prevención del Cáncer Cervicouterino. Instituto Nacional del Cáncer, 2011*).

Su tasa de incidencia en 2008 era de 17,5/100.000 mujeres y la tasa de mortalidad, ajustada por edad, de 7,4 muertes/100.000 mujeres (según estimaciones de la IARC, Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer).

La distribución de la enfermedad y sus consecuencias para la salud de la mujer en la Argentina no es homogénea, varía según la Provincia, según el Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cervicouterino (PNPCC) en base a datos aportados por la Dirección de Estadísticas e Información en Salud (DEIS), es más elevada en poblaciones con menor nivel de desarrollo socio-económico, por ejemplo, las tasas de mortalidad entre 2005 y 2009 fue de 18,4/100.000 mujeres en Formosa, mientras que los índices más bajos se encuentran en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires con 3,9/100000 y Chubut 4,5/100000 mujeres. La provincia de Río Negro se encuentra en un rango medio de la tasa nacional con 10,8 muertes cada 100000 mujeres (*Fuente: Ministerio de Salud de la Nación*).

Numerosos estudios han demostrado que los distintos tipos de HPV pueden distribuirse con diferente predominio según la región geográfica y el diagnóstico cito-histológico, entre otros factores.

En mujeres con citología cervical normal, la positividad para HPV oscila entre 10 y 15% a nivel mundial. Se puede identificar una amplia variedad de tipos virales, el HPV-16 en general, ocupa el primer lugar, aunque sin un predominio marcado (*Bruni y col, 2010*), el único estudio de prevalencia de la infección por HPV en la Argentina con base poblacional se realizó en la ciudad de Concordia provincia de Entre Ríos, arrojando una prevalencia de infección del 17,7% entre mujeres sexualmente activas (*Matos y col, 2003*).

Los tipos de HPV detectado en lesiones de cuello uterino varía según la gravedad de la lesión. En las *L-SIL*, *HSIL* y *CCU*, la positividad general para HPV es virtualmente del 100%; sin embargo, en la práctica este valor oscila entre 80 y 100%, debido principalmente a cuestiones metodológicas y/o sobre diagnóstico. En las *L-SIL*, pueden encontrarse gran diversidad de tipos virales, siendo el HPV-16 el más frecuente (26.3%), seguido de HPV-31 (11.5%), HPV-51 (10.6%) y HPV-53 (10.2%) (*Clifford y col, 2005*). En las *H-SIL*, el espectro de tipos virales es

más restringido, con predominio de los HPV-AR, en especial 16 y 18 (50%) (Ciapponi y col, 2011).

En los CCU, los tipos virales que ocupan el primero y segundo lugar son los HPV-16 y HPV-18, respectivamente, alcanzando juntos alrededor del 70% en las neoplasias a nivel mundial (de Sanjosé y col, 2005). En América Latina y el Caribe, el mayor meta-análisis realizado que incluyó más de 5.500 CCU confirmó este hallazgo, siendo los siguientes tipos los más comunes: 31, 45, 33, 52, 58 y 35, estos sumados a 16 y 18 son responsables del 86,5% de este tipo de neoplasia en la región (Ciapponi y col, 2011).

Además del CCU los HPV también se vinculan con el desarrollo de neoplasias extra-cervicales, tales como los cánceres vaginal y vulvar (aprox 70%), pene (aprox 60%), ano (aprox 90%), cabeza y cuello, en especial los orofaríngeos (cavidad nasal, glándulas salivales, amígdalas, lengua, boca, (aprox 60%)) (Fuente: Centers for Diseases Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/cancer/hpv>; consultado 27/03/2015).

## 1.8 Detección y tipificación viral

Al no disponer de cultivos celulares convencionales que permitan la propagación de los HPV, las pruebas actualmente en uso para su estudio se basan en la detección de los ácidos nucleicos del virus, por técnicas de biología molecular. Está disponible una amplia variedad de formatos que incluyen la detección de ADN, ARN mensajero (ARNm), sistemas que detectan grupos de HPV-AR y los que identifican tipos virales específicos (Chan y col, 2012).

El criterio de selección del método se debe realizar teniendo en cuenta los objetivos que se persigan, ya sea para investigación epidemiológica o bien para uso clínico, en la patología cervical. Existen dos conceptos importantes a tener en cuenta para realizar la mejor elección:



sensibilidad clínica y sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica hace referencia a métodos capaces de detectar cualquier infección independiente de la presencia o no de lesiones. Dichos métodos son útiles para la detección precisa y altamente sensible del HPV y su genotipificación. Una vez iniciada la vacunación estas técnicas son cruciales en la vigilancia del virus, permitiendo evaluar el impacto de la vacuna sobre la prevalencia de los tipos virales incluidos en la misma, identificación de posibles protecciones cruzadas o discriminación de infecciones múltiples.

Por otro lado el concepto de sensibilidad clínica se utiliza para referenciar a aquellos métodos que detectan la presencia del HPV asociado a una enfermedad relevante. Estas técnicas moleculares de tamizaje virológico son las recomendadas para el diagnóstico y manejo clínico de la patología cervical (*Picconi, 2013*).

### **1.8.1 Uso clínico de las pruebas de detección de ADN de HPV**

En la práctica clínica existen indicaciones consensuadas para el uso de las pruebas de ADN para el diagnóstico; debiéndose tener en cuenta que las mismas se encuentren validadas para tal fin.

La detección de ADN viral es de utilidad en:

- a) El esclarecimiento de citologías atípicas de significado indeterminado (ASCUS). Esta entidad implica cambios atípicos en las células escamosas de cuello uterino; si bien ASCUS no significa enfermedad resulta importante su esclarecimiento, pues puede asociarse a una citología normal o a una lesión precancerosa.
- b) Seguimiento de mujeres con resultados citológicos anormales que resultaron negativas para colposcopia/biopsia inicia; la detección permite detectar mujeres con mayor riesgo de

desarrollar lesiones graves.

**c)** Control post tratamiento de lesiones severas (H-SIL). Las mujeres sometidas a tratamiento por ablación o conización deben ser monitoreadas después del tratamiento. Datos actuales aseguran que las pruebas moleculares detectan enfermedad residual o recurrencia más rápidamente y con mayor sensibilidad que el seguimiento citológico.

**d)** Tamizaje primario en mujeres a partir de los 30 años, para detectar lesiones precursoras de CCU, estas pruebas presentan numerosas ventajas frente al tamizaje citológico. Son pruebas sensibles, altamente reproducibles, objetivas y particularmente su rasgo más importante es su elevado valor predictivo negativo, que permite confiar con un alto grado de seguridad que la mujer no tiene HPV ni ninguna enfermedad asociada al mismo, permitiendo de esta manera ampliar el intervalo de tamizaje espaciando los controles al menos 5 años (*Picconi, 2013*).

En nuestro país, entre las pruebas validadas para uso clínico aprobadas por ANMAT se encuentran, la Captura Híbrida 2 (HC2) HPV DNA Test de la empresa Qiagen y el ensayo para ADN HPV-AR con genotipificación de HPV16 y 18 Cobas 4800 HPV Test de la firma Roche Molecular Systems.

### **1.8.2 Aplicaciones en epidemiología y vigilancia laboratorial**

Dada la cantidad de tipos de HPV, para su identificación individual tanto en la investigación epidemiológica como en la vigilancia laboratorial, se requieren técnicas de suficiente sensibilidad y capacidad de discernimiento entre relativamente pequeñas diferencias de secuencias genómica. Desde que se iniciaron las investigaciones en este campo, a fines de 1970, la cantidad de tipos de HPV identificados ha aumentado notablemente, pero también las técnicas de biología molecular han ido perfeccionándose. Actualmente existen variados sistemas

de genotipificación, comerciales y artesanales. Los primeros son aun sumamente costosos, lo que ha limitado mucho su uso; por otro lado, los sistemas artesanales exigen una rigurosa estandarización que permita conocer la sensibilidad con que se trabaja y establecer una adecuada reproducibilidad que asegure la calidad de los resultados obtenidos.

Estas técnicas debidamente validadas para el fin analítico, son de vital importancia también para evaluar el impacto de la vacunación a través de la vigilancia virológica y para la continuidad en los estudios de prevalencia de genotipos en las distintas poblaciones.

Se recomienda que los laboratorios que hagan estos estudios cuenten con manuales de procedimientos y con la certificación internacional establecida por los controles de calidad de la Red Global de Laboratorios de HPV (WHO HPV Lab-Net) perteneciente a la OMS. Estos se basan en paneles con muestras que contienen infecciones simples y múltiples, con variado número de copias (5-500 copias), que abarcan alrededor de 40 tipos virales que infectan las mucosas (*Picconi, 2013*).

### **1.9 Prevención:**

#### **1.9.1 Primaria: Vacunas**

En la actualidad existen dos vacunas contra HPV que han sido licenciadas en más de 120 países, incluyendo la Argentina (*Lowy y col, 2006*). Ambas están basadas en el sistema de partículas similares a virus (VLPs). Una es bivalente (*Cervarix; GlaxoSmithKline*), dirigida contra HPV-16 y HPV-18 (responsables de alrededor del 75% de los casos de CCU a nivel mundial), licenciada por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina (ANMAT) en marzo 2008; la otra es tetravalente (*Gardasil; Merck Sharp & Dohme*), dirigida contra HPV-16, -18, -6 y -11 (estos dos últimos causantes de lesiones

cervicales, verrugas genitales y condilomas) licenciada por ANMAT en octubre 2006.

En Argentina, la Dirección Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (Ministerio de Salud de la Nación) introdujo la vacuna bivalente en el Calendario Nacional de Vacunación, en octubre de 2011, gratuita y obligatoria para niñas de 11 años. Dado que la mayoría de las mujeres se infecta con el HPV en el comienzo de su vida sexual, para lograr mejores resultados se definió esta edad a fin de vacunar a las niñas antes de tomar contacto con el virus. A partir de 2014, se cambió por la tetravalente, debido al beneficio adicional de la prevención de condilomas, producidos mayoritariamente por HPV 6 y 11.

En el marco de una infección inmunoprevenible, la OMS ha iniciado una Red Global de Laboratorios de HPV (WHO HPV LabNet) para armonizar a los laboratorios de virología a nivel mundial a fin de organizar una efectiva vigilancia virológica. Así se podrá diagramar una correcta política de implementación y tener herramientas para evaluar el impacto de la vacunación, incluyendo, entre otras cosas, la confirmación de la protección cruzada con otros genotipos no incluidos en las fórmula vacunal y el esclarecimiento del posible reemplazo de los genotipos de alto riesgo ahora más frecuentes por otros tipos de alto riesgo de menor prevalencia no prevenibles por la vacunación (*Eklund y col, 2012*).

### **1.9.2 Secundaria: Tamizaje**

Según estudios de la OMS, el tamizaje sigue siendo una herramienta esencial en la prevención del CCU. A pesar de la disponibilidad de vacunas confiables y seguras, el tamizaje es necesario, debido a que las dos vacunas de actual uso masivo protegen, contra dos de los HPV-AR responsables de la mayoría de los CCU. Además ha de tenerse en cuenta que dado lo reciente de la vacunación, existe una mayoría de mujeres adultas que no han sido beneficiadas por la inmunización.

En la mayoría de los países desarrollados el uso de la citología (Papanicolaou, PAP), aplicada en programas organizados de detección, ha logrado disminuir el porcentaje de muertes por CCU (*Arbyn y col, 2009; Sasieni y col, 1999; Hakama y col, 1988*). Este no ha sido el caso de América Latina, donde a pesar de la disponibilidad de la prueba de PAP, alrededor de 32.000 mujeres mueren cada año por esta neoplasia (*Ferlay y col, 2004*). Esto podría deberse principalmente a la baja sensibilidad de la prueba, a la baja cobertura y al elevado porcentaje de mujeres con anormalidades citológicas que no son evaluadas y/o tratadas adecuadamente (*Almonte y col, 2010*).

Hacia la década de los '90, se comenzaron a evaluar técnicas de tamizaje alternativas, más precisamente la detección del ADN del HPV. La precisión y validez de esta metodología ha sido puesta a prueba en varios estudios, demostrando ser más sensible que la citología, con un valor predictivo negativo cercano al 100%, lo que permite confiar con un alto margen de seguridad que las mujeres con un resultado negativo para esta prueba no tienen HPV.

Sin embargo esta técnica mostró un menor valor predictivo positivo, ya que podía resultar positiva en mujeres portadoras de infecciones transitorias o de bajo riesgo, esta menor especificidad hace necesaria la aplicación de una segunda prueba de triaje para las mujeres que resulten positivas, con el fin de identificar a las portadoras de una lesión precursora de CCU.

En las mujeres positivas para la prueba de HPV, las pruebas alternativas que podrían aplicarse para completar el triaje podrían ser: citología de buena calidad, inspección visual o biomarcadores moleculares. Estos últimos son técnicas que detectan indicadores directos de expresión de oncogenes como el ARNm de las proteínas E6 y E7; o técnicas que detectan proteínas marcadoras de proliferación celular aumentada.

En la Argentina, el Programa Nacional de Prevención de CCU (Instituto Nacional

del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación), tiene como principal eje de acción: mejorar la accesibilidad y la cobertura del tamizaje de mujeres entre 30 y 64 años. Actualmente el Programa se encuentra migrando progresivamente, del tamizaje citológico por PAP; al tamizaje virológico molecular por técnicas validadas para uso clínico. Esto, sumado a la implementación de la vacuna pretende alcanzar una prevención más eficiente e integral de esta enfermedad.

Este cambio ha comenzado por las provincias más afectadas por esta patología, implementándose como prueba piloto primero en la provincia de Jujuy en 2011 y continuando en 2014 con las provincias de Misiones, Tucumán, Catamarca y Neuquén.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la infección genital por HPV, a través del estudio de los virus circulantes en mujeres de la ciudad de Viedma, provincia de Río Negro. Dada la diferente conducta epidemiológica de los HPVs de *bajo* y *alto riesgo*, el conocimiento de la distribución de los tipos de HPV en distintas regiones geográficas contribuirá a la optimización de la prevención y control de las enfermedades asociadas.

### 2.2 Objetivos particulares

- Determinar la prevalencia de los genotipos de HPV que infectan el tracto ano-genital en muestras normales y de lesiones de distinto grado de severidad.
- Discriminar todos los genotipos posibles en infecciones múltiples.
- Analizar factores de riesgo de la infección por HPV.
- Correlacionar los datos virológicos con la información clínica y cito-histológica.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS:**

#### **3.1 Población estudiada**

El presente es un estudio observacional descriptivo de corte transversal. Fue realizado en la ciudad de Viedma, capital de la provincia de Río Negro; esta ciudad está situada al este de la misma, a 30 Km de la costa atlántica. Se encuentra muy vinculada a la ciudad bonaerense de Carmen de Patagones separada sólo por el río Negro, formando la Comarca Viedma-Patagones con una población total de 73.322 habitantes según datos del Censo Nacional 2010.

Se estudiaron pacientes concurrentes al Servicio de Ginecología del Hospital Regional Artemides Zatti, provenientes de Viedma y de varias Localidades cercanas, tanto Carmen de Patagones como del interior de la provincia de Río Negro.

Las mismas, fueron invitadas a participar por el médico ginecólogo durante la consulta de control. Aprovechando la oportunidad de toma de PAP, se ofreció la posibilidad de la participación voluntaria y consentida en el presente estudio.

Las participantes firmaron un consentimiento donde se incluían detalles del estudio y riesgos y beneficios asociados con su participación, asegurándosele la confidencialidad de la información.

Posteriormente el médico realizó una entrevista donde procedió a completar una planilla epidemiológica, que incluyó datos sobre: nivel de estudios y socioeconómico, características del comportamiento sexual y reproductivo, historial médico, utilización de anticonceptivos orales y hábito de fumar.



En el estudio participaron los Servicios de Laboratorio, Área Virología y Biología Molecular; Servicio de Tocoginecología y Servicio de Anatomía Patológica pertenecientes al Hospital Regional Artemides Zatti; además se contó con el apoyo y activa participación del Servicio de Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) que es el Laboratorio Nacional y Regional (OPS/OMS) de Referencia de HPV, dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Carlos G. Malbrán” (Buenos Aires).

### **3.2 Recolección de muestras estudiadas**

Las muestras fueron recolectadas, entre junio del 2012 y diciembre de 2013, por médicos del Servicio de Ginecología según normas establecidas por el Servicio de Virus Oncogénicos del Instituto Malbrán detalladas en el Anexo I. Fueron rotuladas especificando Nombre, Apellido y N° de Historia Clínica; en ese mismo momento se completó la Ficha Epidemiológica descrita en el Anexo III y se entregó a la paciente el Consentimiento informado para su firma.

Para la toma de las células cérvico-vaginales, se utilizaron cepillos especiales (tipo “cytobrush”) que fueron sumergidos en tubos cónicos de 15 ml con tapa a rosca conteniendo 1,5 ml de buffer PBS (pH 7,4) estéril. Conjuntamente con la muestra virológica, se tomó otra para la realización el examen citológico por PAP.

Se incluyeron un total de 174 muestras, 160 muestras frescas y 14 biopsias fijadas embebidas en parafina, los resultados cito-histológicos aplicando el criterio Bethesda 2001 (*Solomon y col, 2002*) fueron los siguientes: citología normal (N-SIL) (n=110); ASCUS (n=12); L-SIL (n=19); H-SIL (n=30); CCU (n=3).

### 3.3 Estudios virológicos

#### 3.3.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos

Las muestras de células cervicales frescas, fueron agitadas enérgicamente con Vortex a fin de liberar las mismas del cepillo y optimizar su resuspensión, luego fueron centrifugadas a 4.400 x g durante 15 minutos y el pellet se transfirió a un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml debidamente identificado. Se almacenaron a -20° C hasta su procesamiento según normas establecidas por el Servicio de Virus Oncogénicos del Instituto Malbrán en el Anexo 2.

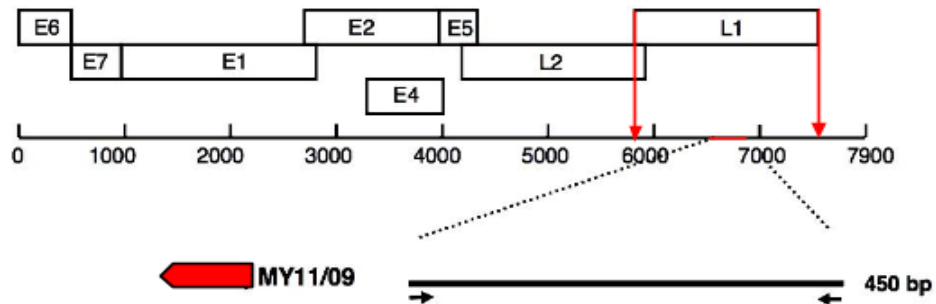
Posteriormente las células provenientes de cepillados cervicales fueron sometidas a digestión con buffer suplementado con proteinasa K, a fin de obtener el extracto crudo de la muestra (*Sambrook y col, 1989*).

En los casos de las biopsias, se procedió de la siguiente manera: en el Servicio de Anatomía Patológica, a partir del taco de tejido fijado y embebido en parafina se realizaron 5 cortes histológicos de alrededor de 10 µm, se recogieron en tubos estériles tipo *Eppendorf* y se remitieron al laboratorio acompañados de su respectiva identificación. Se tuvo extremo cuidado en la limpieza de la cuchilla del micrótopo entre una muestra y otra para evitar contaminaciones cruzadas. La parafina fue eliminada mediante un tratamiento sucesivo con diferentes solventes y luego los cortes histológicos fueron digeridos con el buffer suplementado con proteinasa K y purificado. Una vez obtenido el ADN, fue resuspendido en buffer TE y almacenado a -20° C hasta su análisis. (*Wright y col, 1990*), Anexo 2.

#### 3.3.2 Detección y tipificación de HPV

Para la detección del HPV se aplicó una PCR directa usando los cebadores genéricos

consenso MY09,11 que amplifican un fragmento de 450pb de la región L1 del genoma de los HPV mucosotropos (*Figura 7*) (*Manos y col, 1989*).



**Figura 7:** Esquema del genoma de HPV. Se observa la región de 450 pb amplificada por la PCR genérica realizada con primers consenso MY11/09, ubicada sobre el gen L1.

Como control interno se utilizaron primers para amplificar el gen de la Beta Actina (Marca: Biodynamics), obteniéndose como producto un amplicon de 289 pb. Los productos amplificados fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa, previa tinción con bromuro de etidio. La PCR MY09,11 se desarrolló sobre un volumen final de 10 microlitros conteniendo solución tamponada 1X, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1uM de cada cebador, 240 uM de cada dNTP y 0,04 U/ml de Taq DNA polimerasa (Fermentas). La amplificación se realizó mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguida de 35 ciclos: 94°C, 1 min / 55°C, 1 min / 72°C, 1min, con una extensión final 5 min a 72°C..

La tipificación posterior de las muestras positivas se realizó mediante la PCR PGMY09/11 seguida una hibridación reversa en línea (RLB) (CHUV), sobre una membrana de nylon cargada negativamente y utilizando oligosondas específicas biotiniladas (*Estrade y col, 2011*). La detección de los híbridos se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el equipo ECL (Amersham) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Este sistema tiene la ventaja

de permitir la identificación de 37 tipos de HPV y analizar 40 muestras, en un solo ensayo. En todas las muestras, se efectuó un control de integridad del ADN total, empleando los cebadores GH20/PC04 que amplifican fragmento de 268 pb del gen celular de la beta-globina humana. Esta técnica fue validada por la WHO HPV LabNet (*Human papillomavirus laboratory manual, Ed. 2009*).

### **3.4 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando empleando el programa Epi-Info 7.0. La asociación entre las variables y la infección por HPV se estimó con correlación univariante, estableciendo la razón de posibilidades (Odds Ratio) con intervalos de confianza del 95% en tablas 2x2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características de la población

Un total de 174 muestras de mujeres fueron incluidas en el estudio. En la Tabla 2 se muestra las características de la población estudiada.

La población de mujeres fue categorizada por sus niveles socioeconómicos, consultándose a las mismas sobre su nivel de ingresos mensuales (alto, medio y bajo) y nivel de estudios alcanzados (sin formación, nivel primario, nivel secundario y nivel terciario). Un 34% de las mujeres declararon un bajo nivel de ingresos y un 41% se declaró sin trabajo estable. Un 20% reportaron haber llegado hasta el nivel primario de educación, un 45% declararon haber terminado el colegio secundario y un 25% haber terminado una carrera terciaria o universitaria. Más de la mitad, el 74% declaró una pareja estable.

En las mujeres con menos estudios (sólo primario completo) se encontró infección en el 32%, mientras que el porcentaje de mujeres infectadas con secundario completo fue de 51%, y 41% para aquellas que completaron estudios superiores (terciarios y/o universitarios). Al combinar el nivel de educación con la media de edad se observó que las mujeres más jóvenes y con mayor riesgo de contraer la infección son las que poseen mayor nivel de educación.

La edad media del inicio de las relaciones sexuales fue de 17 años con un rango entre 10 y 28 años; 16% de las mujeres sexualmente activas reportó sólo una pareja sexual a lo largo de su vida. La mediana de embarazos fue de 2, el 28% de las mujeres declararon no haber cursado ningún embarazo y el 70% declaró cuatro embarazos o más.

En cuanto a los métodos anticonceptivos, el 43% de las mujeres usaba anticonceptivos orales (ACO) y el 37% otros, tales como preservativos o dispositivos

intrauterinos. El uso de ACO aumentó significativamente la probabilidad de presencia de lesión cervical; de las pacientes con citología normal, el 37% utilizó habitualmente ACO, contra el 53% de las pacientes que presentaban algún tipo de lesión epitelial; OR (95% CI) = 1,24 (0,63 – 2,44).

Se encontró una relación significativa entre la probabilidad de adquirir la infección y la tenencia o no de una pareja sexual estable; en el caso de las mujeres que declararon una pareja estable la chance de contraer la infección fue de OR (95% CI)=0,32 (0,15-0,66); mientras que para mujeres que no poseen una pareja estable el OR (95% CI) fue de 1,87 (0,83 – 4,17); en el caso de mujeres que reportaron hasta dos parejas, la prevalencia de la infección fue del 30%, contra 51% para mujeres que reportaron tres parejas o más.

Alrededor del 40% de las mujeres declaró ser fumadora habitual y un 11% declaró haber fumado en algún momento de su vida; sin encontrarse una relación entre el hábito de fumar y el riesgo de infección o de portar lesiones. OR (95% CI) = 0,66 (0,34 – 1,31).

El 30% de las mujeres tuvo alguna infección de transmisión sexual (ITS) en el transcurso de su vida, siendo los condilomas y la infección por *Trichomonas vaginalis* las más declaradas. El historial de ITS también fue asociado significativamente a mayor cantidad de parejas sexuales y a una mayor predisposición para contraer la infección por HPV, ya que el 52% de las pacientes con citología anómala presentaba alguna ITS, contra el 25% de las mujeres con citología normal. Ninguna mujer declaró ser portadora del virus VIH o tener una pareja que con este virus. OR (95% CI) = 1,30 (0,63 – 2,66).

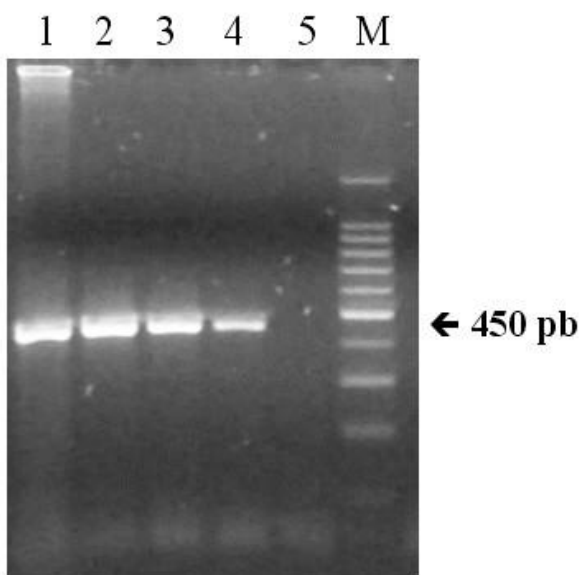
**Tabla 2:** Características generales de la población estudiada, Hospital Regional Artemides Zatti, Viedma, Río Negro, Argentina.

<b>Característica</b>	<b>Citología normal</b>	<b>Citología anormal *</b>
- Edad Media (rango 17 - 60 años)	34 a	25 a
- Edad Media de inicio relaciones sexuales. (rango 10 - 28 años)	17 a	17 a
- Edad media de Nacimiento 1er. Hijo (rango 17 - 33 años)	18 a	17 a
- Fuma		
NO	46%	49%
SI	54%	51%
- Educación		
Sin formación	7%	4%
Primaria	23%	13%
Secundaria	41%	57%
Terciaria/Universitaria	29%	26%
-Hijos		
NO	31%	30%
SI	69%	70%
-Mediana de N° de embarazos (rango 0 - 11 )	2	2
Uso de anticonceptivos Orales	37%	53%
N° de parejas sexuales		
<5	79%	74%
5 – 10	11%	13%
+ de 10	10%	13%
-Historia de enfermedades transmisión sexual		
NO	75%	48%
SI	25%	52%
- PAP previos		
SI	78%	71%
- Años del último PAP		
menos de 1 año	73%	80%
más de 1 año	27%	20%

\* Se incluye ASCUS, L-SIL, H-SIL y CCU

#### 4.2 Detección y Tipificación de HPV

Todas las muestras de células cérvico-vaginales fueron aptas para los estudios virológicos. De las 14 muestras de biopsias, 6 no pudieron ser incluidas en el estudio debido a que no amplificaron el control interno de la globina humana; por lo tanto, el análisis del presente estudio se refiere a 168 muestras totales que incluyen 109 citologías normales y 59 muestras con PAP positivos distribuidos de la siguiente manera, ASCUS (n=12), L-SIL (n=16), H-SIL (n=28) y CCU (n=3). Del total de muestras analizadas mediante la PCR genérica, 77 resultaron positivas (Figura 8). La prevalencia general de la infección fue de 46% (77/168).



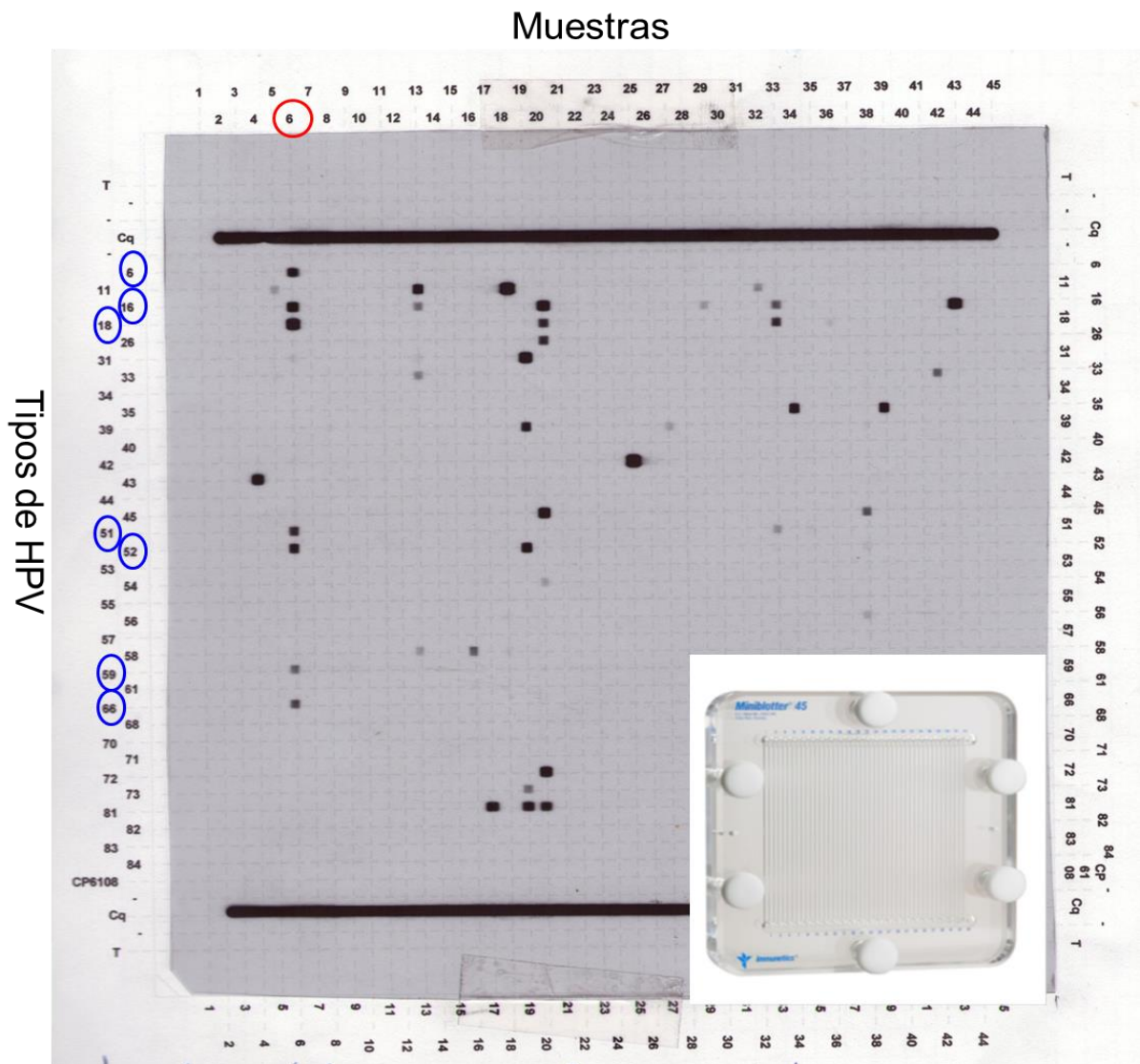
**Figura 8:** Reacción en cadena de la polimerasa empleando los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) genéricos MY9,11. Se observan las bandas positivas correspondientes al fragmento amplificado (450 pb), luego de la electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Calles 1, 2 y 3: muestras HPV positivas; calle 4: control positivo; calle 5: control negativo; M: marcador de peso molecular, escalera de a 100 pb

La Figura 9 muestra la foto de una película radiográfica correspondiente a una hibridación reversa, luego del revelado por quimioluminiscencia; a su lado el minibloter utilizado para el desarrollo de dicha técnica.

Los tipos de HPV identificados en las 77 muestras positivas con sus correspondientes



diagnósticos cito-histológicos se detallan en la Tabla 3; se pudieron detectar 27 tipos virales distintos, en infecciones simples y múltiples.



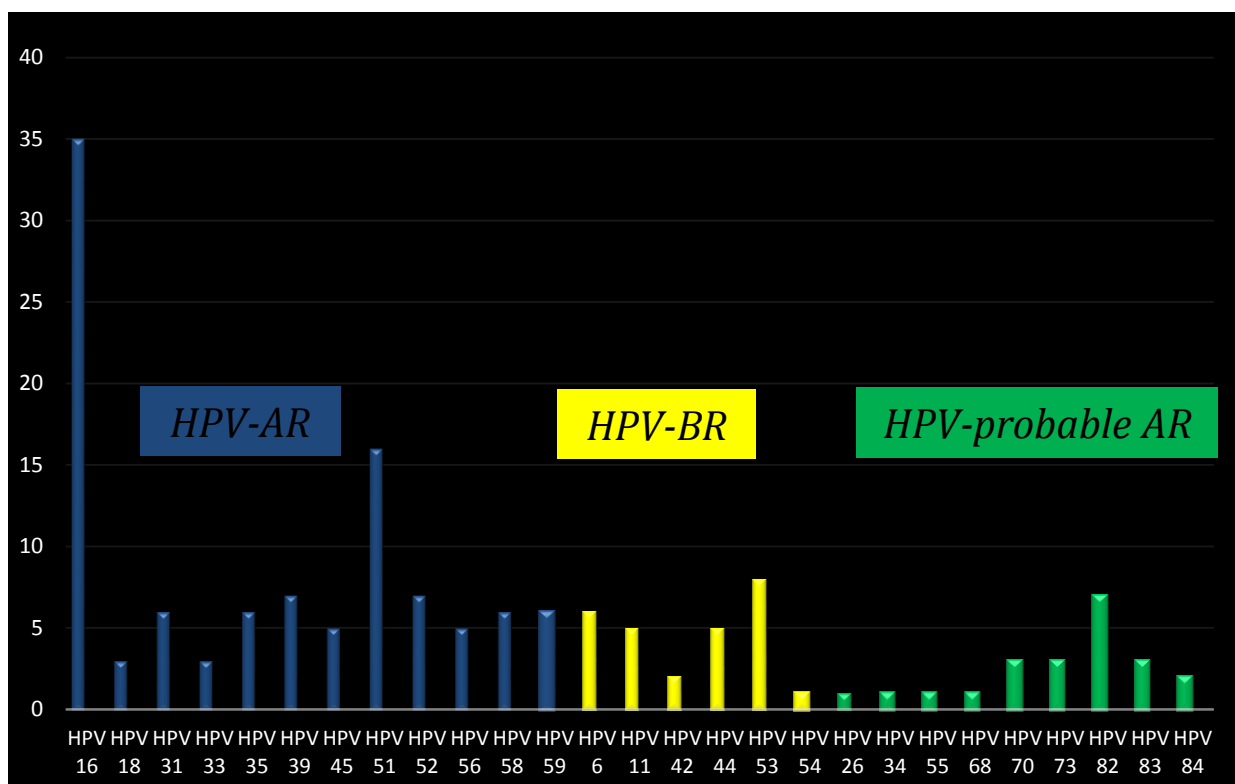
**Figura 9:** Genotipificación de HPV por hibridación reversa en línea. Los productos amplificados por PCR empleando una mezcla de cebadores biotinilados, fueron aplicados sobre una membrana de nylon previamente tratada, en la que se encuentran fijadas las oligosondas tipo- específicas; luego de la hibridación, el revelado de los híbridos formados se realiza por quimioluminiscencia y autografía. A izquierda se observa la película revelada, las manchas oscuras muestras la señal positiva; a modo de ejemplo, se marcó con círculo rojo a la muestra N° 6 en la que se pudo identificar una infección múltiple con siete tipos virales: HPVs 6, 16, 16, 51, 52, 59 y 66 (círculos azules). Abajo a la derecha, se muestra el equipo usado para la siembra de las muestras en la membrana.

Tabla 3. Positividad de HPV y tipos virales de alto y bajo riesgo según diagnostico cito-histologico. Hospital Regional Artemides Zatti, Viedma.

Diagnostico cito-histologico	n	Positividad HPV		Tipos HPV-AR			Tipos HPV-BR			Otros HPVs		
		n	%	Tipos	Frec.	%	Tipos	Frec.	%	Tipos	Frec.	%
N-SIL	109	25	23	16	9	36	6	3		34	1	
				31	1		11	1		68	1	
				35	2		42	2		70	2	
				39	3		44	3		73	1	
				45	1		53	6		82	2	
				51	7					84	1	
				52	4							
				56	3							
				58	2							
				59	3							
ASCUS	12	9	75	16	5	56	11	1		70	1	
				33	1		44	1		73	1	
				39	1		53	1		83	1	
				45	2							
				51	2							
				58	1							
L-SIL	16	13	81	16	3	23	6	2		26	1	
				18	1	8	11	1		55	1	
				51	2					82	1	
				52	2					83	1	
				58	3					84	1	
				59	1							
H-SIL	28	27	96	16	16	59	6	1		73	1	
				18	1	4	11	2		82	4	
				33	2		44	1		83	1	
				31	5		53	1				
				35	4		54	1				
				39	3							
				45	2							
				51	5							
				52	1							
				56	2							
				59	2							
CCU	3	3	100	16	2	67				66	1	
				18	1	33						
TOTAL	168	77	46									

En la Figura 10 se puede observar la distribución de los tipos virales identificados.

Del total de muestras positivas, 86% (66/77) resultaron portadoras de HPV-AR, siendo el HPV 16 el más frecuente. En el estudio se detectó un 51% de infecciones múltiples (39/77) encontrándose 19 pacientes con 2 tipos virales, 7 con 3 tipos, 9 con 4 tipos, 1 con 5 tipos, 2 con 6 tipos y 1 con 8 tipos virales distintos; todos los casos, salvo una paciente, presentaban por lo menos un tipo viral de alto riesgo.

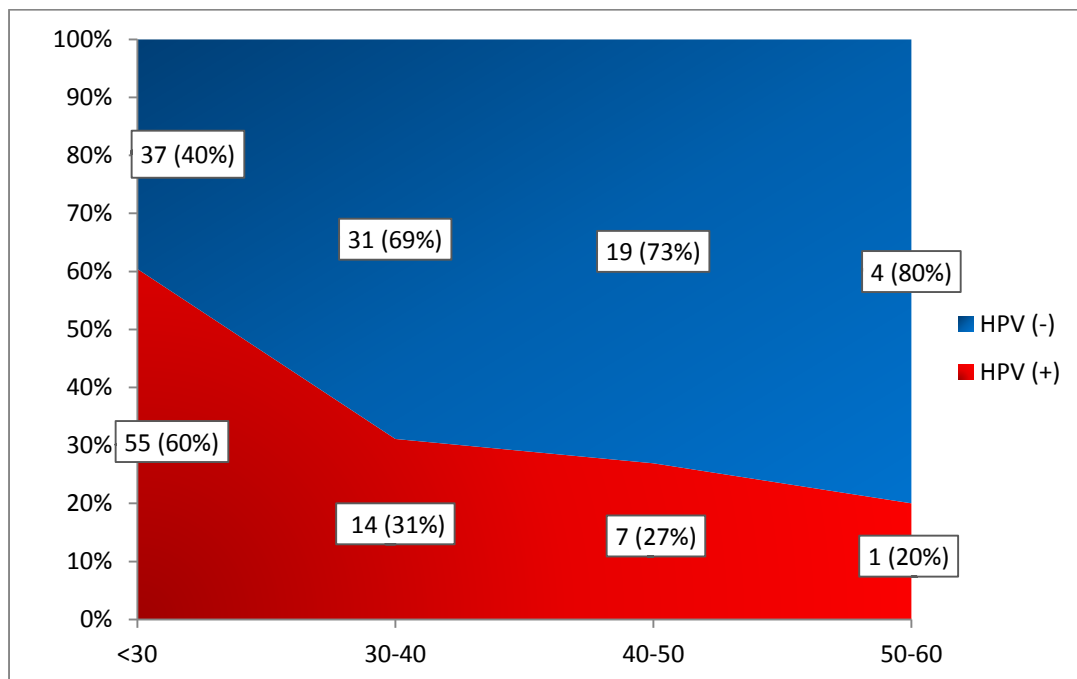


**Figura 10:** Frecuencia de los tipos virales detectados.

Para el análisis de la frecuencia de infección según la edad, las mujeres se agruparon en los siguientes intervalos <30 años (n=92), 30-40 años (n=45), 40-50 años (n=26) y 50-60 años (n=5). La frecuencia de infección fue disminuyendo a medida que aumentaba la edad siendo el grupo etario menor de 30 años el de mayor porcentaje de infección, alcanzando el 60% (55/92).

Figura 11.

Se encontró una alta frecuencia de HPV-AR y en particular HPV 16 en todos los grupos.



GRUPO EDAD	N	HPV (-)	HPV (+)	%
<30	92	37	55	60
30-40	45	31	14	31
40-50	26	19	7	27
50-60	5	4	1	20

**Figura 11:** Prevalencia del *virus papiloma humano* según edad, en la población estudiada.

## 5. DISCUSIÓN

El presente trabajo, realizado sobre pacientes concurrentes a un consultorio de Ginecología del hospitalario, es el primero de este tipo desarrollado en la provincia de Río Negro; reúne el esfuerzo de tres servicios, enfocándose en describir la prevalencia y la epidemiología de la infección por HPV en este grupo de mujeres de la ciudad de Viedma. Además se realizó la tipificación de las muestras positivas a fin de aportar datos sobre los HPV-AR y BR circulantes.

Cuando se analizan las características de la población, se observa una gran heterogeneidad de la misma; el rango de edad es de 17 a 60 años y la edad de inicio de relación sexual varía de 10 a 28 años. Asimismo, es una población con al menos el 70% de pacientes que han terminado la educación secundaria, terciaria y/o universitaria, por lo que se la puede considerar con cierto nivel educativo; también se observa que la mayoría (70%) tiene hijos con una mediana de 2 embarazos. Esto podría estar relacionado con las características asistenciales del hospital, que si bien es público, atiende a través del sistema de consultorio externo una considerable proporción de población con trabajo formal, evidenciado en el porcentaje de pacientes con obra social en el padrón hospitalario, 59% (*Fuente: Unidad Estadística del Hospital Artemides Zatti*).

El hecho de que la mayoría de las pacientes infectadas, aún con tipo de HPV-AR no progresan al CCU, indica que la presencia viral, si bien es necesaria, no es suficiente para generar la neoplasia; otros factores contribuirían para la transformación maligna. Se han considerado entre ellos a la multiparidad, coinfecciones con otras ITS (herpes simplex, clamidias), factores del hospedador vinculados con la respuesta inmune y la acción hormonal, el tabaquismo, estado nutricional, entre otros (*Muñoz y col, 2006; Antilla y col, 2001; Bosch y col, 2002; Moreno y col, 2002; Castellsagué y col, 2002*).

En este trabajo, en coincidencia con estudios previos, aumentó significativamente la probabilidad de presencia de lesión cervical con el uso de anticonceptivos orales (ACO) y la historia de otras ITS. La probabilidad de desarrollar CCU se duplica en mujeres que usan ACO por 5 años o más en comparación a mujeres que no lo utilizan (*Smith y col, 2003*). Probablemente los estrógenos y progestágenos aumentan la expresión génica del HPV en el cuello uterino a través de receptores de progesterona, y elementos de respuesta a hormonas en el genoma viral. (*Muñoz y col, 2006*).

Numerosos trabajos han considerado que las coinfecciones producidas por otras ITS, tales como el virus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) y *Chlamydia trachomatis* (CT) predisponen al desarrollo de CCU en mujeres persistentemente infectadas por HPV –AR. Se ha demostrado que las infecciones por HSV-2 y CT generan una respuesta inflamatoria, asociada con la liberación de radicales libres que producen inestabilidad genética (*Muñoz y col, 2006; Deluca y col, 2011*).

En el caso particular del hábito de fumar y su efecto sobre la carcinogénesis inducida por HPV hay datos controvertidos. Se ha especulado que una posible reducción de la respuesta inmune en el cuello uterino inducida por el tabaco podría afectar al metabolismo de las hormonas femeninas o bien producir un daño directo a través de la generación de nitrosaminas carcinogénicas en el flujo vaginal (*Muñoz y col, 2006*). Si bien un gran porcentaje de las pacientes estudiadas eran fumadoras, a diferencia de lo hallado por Yetimalar (*Yetimalar y col, 2012*), no se pudo encontrar una relación entre este evento y la aparición de lesiones. Debe tenerse en cuenta que otras variables pueden influenciar en este análisis, tal como la cantidad de cigarrillos diarios, por lo que dificulta la comparación entre los distintos estudios.

La multiparidad, ha sido asociada con el mayor riesgo de lesiones y CCU (*Almonte*

y col, 2001). Esto podría deberse a que en cada embarazo la zona de transformación del cuello uterino queda más expuesta aumentando así la accesibilidad del virus al epitelio; también podría sumarse la acción hormonal propia de la gestación (Muñoz y col, 2006). En este estudio no se encontró asociación entre haber sido madre y la presencia de lesiones; sin embargo, al no haberse considerado la cantidad de hijos el análisis de esta variable queda restringido.

Es bien conocido que los hábitos sexuales tienen impacto sobre la posibilidad de adquirir la infección por HPV y por lo tanto de quedar en riesgo de desarrollar CCU y lesiones precursoras. En este estudio se encontró una relación significativa entre la probabilidad de adquirir la infección y la carencia de pareja sexual estable; asimismo, la prevalencia de la infección fue significativamente mayor en las mujeres que reportaron tres parejas o más. Esto está en concordancia con lo observado por Almonte y col en 2011, en relación a que el mayor número de parejas sexuales predispone la adquisición de infección por HPV. En el estudio realizado por Pista et al en 2012, dicha probabilidad fue 5 veces mayor en mujeres con un número de parejas sexuales mayor o igual a 5, en comparación a mujeres con una sola pareja sexual (*Int J Cancer. 2006; Almonte y col, 2011; Pista y col, 2012; Nyitray y col, 2014*). De todos modos, hay que tener en cuenta que este análisis es complejo, ya que la probabilidad de adquirir la infección no solo dependerá de la historia sexual de la mujer sino que también de su pareja.

En relación a la educación, diversos autores han informado que el menor nivel de formación estaría asociado a un mayor riesgo de infección por HPV y presencia de lesiones (*Francheschi y col, 2009*), aunque no existe consenso pleno (*Almonte y col, 2011*). En el presente trabajo, no se halló esta asociación, sino que, por el contrario, se encontró un riesgo relativo aumentado de infección (OR=1,24) en la mujeres con formación secundaria o mayor. Almonte y col en 2011, encontraron que entre mujeres peruanas, positivas para HPV-AR, aquéllas con alta paridad y menor escolarización presentaban mayor riesgo de desarrollo de lesiones

precancerosas. Sin embargo, Deluca G. (*Deluca y col 2012*), en un estudio realizado en mujeres de la comunidad Pigalá de Formosa, no encontraron relación entre el nivel educativo alcanzado con la infección por HPV, aunque sí se describió un riesgo relativo aumentado (OR=2.05) en la mujeres con algún tipo grado de educación formal. Esto indicaría que se trata de variables cuya influencia debe evaluarse localmente. No hay que perder de vista los factores confusionales que podrían interferir en el análisis; en el presente estudio, al combinar el nivel de educación con la media de edad se observó que las mujeres que poseen mayor nivel de educación y más elevado porcentaje de infección, son las más jóvenes. Este grupo es justamente el que se caracteriza por presentar mayor proporción de infección debido a su cercanía al inicio de la actividad sexual, fuertemente asociado al contacto con el virus.

La prevalencia de infección por HPV, así como también, la distribución de tipos virales varían según la región geográfica y gravedad de la lesión del cuello uterino.

En el presente estudio, los análisis virológicos mostraron una prevalencia general del 46%, similar a las encontradas en trabajos previos realizados en otras localidades de la Argentina, tales como Ushuaia (41%) (*Sijvarger y col, 2006*) y Formosa (47%) (*Deluca y col, 2012*), sin embargo, es menor al 54% encontrado en un estudio epidemiológico pre-vacunal realizado en mujeres concurrentes al Hospital Alvarez de la Ciudad de Buenos Aires (*Iglesias y col, 2011*) y más baja aún, si se la compara con la prevalencia del 76% encontrada en mujeres aborígenes de la provincia de Jujuy, donde la mortalidad por CCU triplica a la media nacional (*Picconi y col, 2002*).

Si se enfoca el análisis de prevalencia viral según el diagnóstico citológico, en las mujeres con citología normal, la prevalencia de HPV informada en países en vías de desarrollo (15,5%) es superior a la de los países desarrollados (10%). En el presente estudio, la prevalencia



de HPV en mujeres con citología normal fue del 23%, similar al 20% encontrado en Concordia (*Matos y col, 2003*), al 26% encontrado en Ushuaia por Sijvanger et al y al 20% de otros países sudamericanos como Paraguay (*Mendoza y col, 2010*) o Brasil (*Franco y col, 1999*); sin embargo, este porcentaje resultó mayor al valor hallado por Bruni (*Bruni y col, 2010*) en el meta-análisis internacional que consideró mujeres con citología normal, incluyendo datos sudamericanos de Perú, Paraguay, Colombia, Chile, Brasil, Argentina, con una prevalencia de la infección del 13,2% (2302/17500). Asimismo el 23% hallado en nuestro estudio resultó mucho menor que el encontrado en mujeres quechuas y guaraníes de regiones de alta prevalencia de CCU como Jujuy (52%) (*Picconi y col, 2002*) y Misiones (64%) (*Tonon y col, 2003*). El principal factor que podría explicar estas divergencias tiene que ver con diversidad de las técnicas de biología molecular aplicadas en los distintos estudios y con la edad de las mujeres incluidas, ya que no todos los estudios se han hecho sobre una base poblacional. Está bien establecido que las mujeres más jóvenes (por debajo de los 30 años), presentan la mayor prevalencia de la infección por HPV debido a la proximidad del inicio de la actividad sexual, fuertemente asociado a la primo infección. Estas infecciones son mayoritariamente subclínicas y transitorias, siendo controladas por el hospedador sin dejar secuelas.

En nuestro estudio, como era esperable, casi el 90% de las muestras con alteraciones cito-histológicas (desde ASCUS hasta CCU) resultó positivo para el virus. El ASCUS representa una situación de incertidumbre diagnóstica, en la que el citólogo observa células que no son completamente normales, pero que tampoco cumplen con una morfología patológica. La elevada positividad para HPV obtenida en ASCUS (75%), sugeriría que el grado de sospecha es bajo, asociado a un buen desempeño del citólogo.

La positividad para HPV hallada en las L-SIL (81%) esté en concordancia con los

valores obtenidos en el mayor meta-análisis (n=8.308) publicado por Clifford (*Clifford y col, 2005*), que oscilan entre 70 y 80%. Dado que las L-SIL son producidas por una infección por HPV, todas deberían resultar positivas; esto no sucede principalmente por el sobrediagnóstico citológico.

En las lesiones más graves, como el caso de H-SIL y CCU, en general los porcentajes de detección viral se acercan al 100%. En nuestro estudio todos los H-SIL y CCU resultaron HPV positivos, lo que concuerda con datos internacionales que informan una positividad superior al 80% (*Clifford y col, 2003; de Sanjosé y col, 2010; Ciapponi y col, 2011*). Las razones por las cuales puede no detectarse el ADN viral en estas muestras están más comúnmente ligada a cuestiones metodológicas, vinculadas con la calidad del desempeño de las PCR aplicadas en las diferentes estrategias de biología molecular.

En cuanto a los genotipos de HPV identificados en las distintas categorías citológicas, numerosos estudios han demostrado que el tipo viral más frecuente mundialmente es el HPV-16, independiente de la morfología celular; otros tipos virales pueden ocupar los siguientes lugares en orden de frecuencia según la región geográfica y el diagnóstico citohistológico, entre otros factores. En el presente trabajo se confirmó el predominio del HPV 16 en las pacientes estudiadas. Nuestros datos de prevalencia tipo-específica en citología normal son similares a los observados en el estudio de Concordia (*Matos y col, 2003*), con el HPV 16 ocupando el primer lugar, aunque superan casi en el doble a lo hallado por de Sanjosé (*de Sanjose y col, 2007*). Numerosos autores han señalado que mujeres con infección persistente por HPV 16 poseen una mayor probabilidad de desarrollar lesiones precancerosas al ser comparadas con mujeres infectadas por otros tipos de HPV. Kjaer (*Kjaer y col, 2010*) observó que mujeres con citología normal e infección persistente por HPV 16 poseen aproximadamente un 30% de probabilidad de desarrollar lesiones

de alto grado en un periodo de 12 meses.

En las LSIL, puede encontrarse una gran diversidad de tipos virales, tanto de bajo como de alto riesgo. En nuestras muestras, el HPV16 alcanzó el 23%; este valor es semejante al informado por Clifford (*Clifford y col, 2003*) (26.3%) en un meta-análisis internacional.

En las HSIL de nuestro estudio, el porcentaje de detección de HPV 16 fue del 59%; este valor supera al informado en el mayor meta-análisis de Latinoamérica y el Caribe publicado por Ciapponi (*Ciapponi y col, 2011*) (46.5%); aunque coincide en que el espectro de tipos virales es más restringido, con marcado predominio de los HPV-AR, en especial HPV-16 y 18.

En las 3 muestras con diagnóstico de CCU incluidas en el presente trabajo se identificaron HPV-16 (2/3) y HPV-18 (1/3). Si bien el N es muy pequeño, se observa un marcado predominio de los HPV 16 y 18, en concordancia con lo descripto por de Sanjose y col (2010), responsabilizando a estos virus de al menos el 70% de los CCU a nivel mundial. En América Latina y el Caribe, el mayor meta-análisis realizado que incluyó más de 5.500 CCU confirmó este hallazgo (*Ciapponi y col, 2011*), siendo los seis siguientes más comunes los HPV-31, 45, 33, 52, 58 y 35, que sumados a los HPV- 16 y 18 son responsables del 86,5% de esta neoplasia en la región. En el subgrupo de 1.000 casos de CCU que provenían de Argentina, las prevalencias de HPV 16 más 18 superaban el 77%; estos datos demuestran que las vacunas actualmente licenciadas, que incluyen a estos tipos virales en su fórmula, son apropiadas para nuestra población.

En relación a la prevalencia de la infección en función de la edad de las pacientes (Figura 11), en el presente estudio se pudo observar como a medida que la edad aumenta, la prevalencia de la infección disminuye. Esto está de acuerdo con lo informado por diversos autores en numerosos países (*Franceschi y col, 2006*), incluyendo los datos locales de Concordia (*Matos y col, 2003*), Ushuaia (*Sijvarger y col, 2006*), Jujuy (*Picconi y col, 2002*), entre otros.

Esta curva se sustenta con la información disponible sobre la historia natural de la infección por HPV y el desarrollo de lesiones del cuello uterino (*Schiffman y col 2005*). Se sabe que la mujer toma contacto con el virus a través de relaciones sexuales con parejas infectadas, por lo que la frecuencia de esta infección presenta un pico en la edad de inicio de la actividad sexual (15-25 años). Más del 80% de estas infecciones (aún las producidas por los HPV-AR, con o sin anomalías citológicas), son transitorias, es decir que son controladas por el sistema inmune y se hacen indetectables en aproximadamente 1-2 años. Durante la infección productiva, en las células cervicales pueden observarse cambios morfológicos benignos inducidos por el virus, que se asocian con LSIL. Por otro lado, existe un grupo minoritario (menos del 20%, aunque numéricamente importante dada la alta circulación viral) de infecciones producidas por tipos de HPV-AR que persisten; éstas son las infecciones que concentran el foco de la atención, ya que tienen una mayor probabilidad de avanzar a H-SIL. Se estima que el tiempo necesario para progresar a la malignidad, en caso de permanecer sin tratamiento, es de varios años. El pico de incidencia de las lesiones precancerosas ocurre aproximadamente a los 30-40 años y el del CCU cerca de una década después. Por esta razón, los programas de tamizaje están dirigidos a mujeres a partir de los 25-30 años, con el fin de identificar aquéllas portadoras de lesiones precursoras. (*Schiffman y col 2005; Kjaer y col 2010, Picconi, 2013*).

En nuestro estudio, puede resultar *a priori* llamativo que algunas pacientes menores de 30 años presentaron H-SIL e incluso dos de ellas tuvieron CCU; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el momento de la vida en que se desarrolle una lesión precancerosa o CCU dependerá principalmente de tres factores: la edad de inicio de relaciones sexuales (vinculada con el primer contacto con el virus), el tipo viral infectante (relacionado con el potencial oncogénico) y el estado inmune del hospedador (ligado a la capacidad de controlar la infección). Esta combinación marca las diferencias en la evolución clínica.

Es frecuente la presencia de más de un tipo viral en muestras anogenitales; las implicancias de estas infecciones múltiples en la patogenia del cáncer son aún controvertidas. En el presente estudio se detectó un 51% de infecciones múltiples, identificándose en casi todos los casos al menos un tipo viral de alto riesgo. Esta frecuencia de infecciones múltiples es mayor a la publicada por Pista (*Pista y col, 2011*) (19,4%), en mujeres con citología normal; sin embargo, la frecuencia observada por nosotros es comparable a la hallada en mujeres italianas, con y sin lesión (41,7%) (*Menegazzi y col, 2009*) y a la informada en mujeres colombianas urbanas e indígenas (59,8%) (*Soto de Leon y col, 2008*). En estos trabajos se ha observado que la frecuencia de infección múltiple por HPV disminuye a medida que aumenta la edad de la mujer. Las diferencias en frecuencias observadas podría deberse a varios factores como parámetros étnicos, demográficos, eventuales diferencias en las metodologías utilizadas para la detección viral.

Algunos autores han sugerido que las coinfecciones con múltiples tipos virales de alto riesgo se asocian con un riesgo significativamente aumentado de HSIL; sin embargo, el riesgo de enfermedad fue similar a la suma del riesgo estimado en forma individual para cada uno de los tipos virales, con baja evidencia de sinergismo. Trabajos más recientes indican que la lesión maligna es inducida solo por uno de los tipos virales presentes (*Quint y col, 2012*).

En los estudios de genotipificación de HPV, cobra enorme significado el aseguramiento de la calidad las técnicas empleadas (*Tabrizi, 2010*). Cabe destacar que los datos aportados en este estudio fueron obtenidos empleando una técnica artesanal validada por la OMS (PCR-RLB), de acuerdo al Manual de la Red Global de Laboratorios de HPV de la Organización Mundial de la Salud (*WHO HPV LabNet*) (*Unger y col, 2009*). Estas determinaciones cuentan además con el respaldo de los paneles internacionales de evaluación de la genotipificación resueltos en el Laboratorio Nacional y Regional de Referencia para HPV (OPS/OMS) (*Fagan y col, 2010*).

En suma, este estudio amplía la información disponible sobre la epidemiología molecular de HPV en mujeres de nuestro país, enfocando a una población hospitalaria de la ciudad de Viedma (Río Negro). Los datos obtenidos además de poder contribuir con el control de la enfermedad, aportan información aplicable a la implementación de programas de prevención, tanto primaria, relacionada con la vigilancia epidemiológica en la era vacunal, como la prevención secundaria, ligada al tamizaje para la detección precoz de lesiones precancerosas y CCU. En este contexto, la consolidación del Laboratorio del Hospital Zatti como referente de HPV provincial y su incorporación a la Red Nacional de Laboratorios de HPV representa un logro adicional que valoriza aún más a este trabajo.

## 6. CONCLUSIONES

1. Este estudio aporta los primeros datos sobre la diversidad de tipos de HPV en muestras de cérvix de una población hospitalaria de la ciudad de Viedma (Río Negro). Los tipos virales hallados coinciden, en general, con los virus más prevalentes a nivel mundial.

2. Se detectaron factores que podrían generar un riesgo adicional para el desarrollo de cáncer de cuello uterino en las mujeres estudiadas:

a) La elevada detección de infección por HPV de alto riesgo, en particular HPV 16, en mujeres citológicamente normales demuestra una exposición frecuente al virus y podría representar un mayor riesgo de persistencia viral.

b) El alto porcentaje de mujeres con coinfecciones de virus de *alto y bajo riesgo* podría favorecer el desarrollo de lesiones preneoplásicas y la progresión maligna.

c) La asociación significativa entre la probabilidad de presencia de lesión cervical con el uso de anticonceptivos orales (ACO) y la historia de otras ITS, confirma datos previos y amplía la información sobre la epidemiología de esta infección.

3. Los datos obtenidos podrían contribuir al control de la enfermedad y aportar información aplicable a la vigilancia virológica pos-vacunal en la provincia de Río Negro.

## **ANEXO 1:**

### **Toma, conservación y transporte de muestras para el estudio de HPV.**

#### **A) Células cérvico-vaginales**

- 1) Eliminar el moco sobrante del orificio cervical y ectocérvix circundante utilizando una torunda de algodón. Desechar la torunda.
- 2) Insertar el cepillo en el orificio cervical a una profundidad de 1-1,5 cm, hasta que las cerdas externas más largas del cepillo toquen el ectocérvix.
- 3) Girar el cepillo al menos tres veces en sentido antihorario.
- 4) No insertar el cepillo completo en el canal cervical.
- 5) Si se desea hacer un examen de PAP, recoger primero la muestra para el frotis antes de obtener la muestra para los análisis de HPV.
- 6) Obtener la muestra antes de aplicar ácido acético o yodo cuando se va a realizar una colposcopia.
- 7) Sumergir el cepillo en un tubo cónico conteniendo medio de recolección que permita la preservación de la morfología celular y la calidad de las macromoléculas (ADN).  
  
Ej. PBS estéril pH 7,4. También puede utilizarse un medio de transporte comercial. Sacudirlo para liberar el material en la solución. Sostener el mango del cepillo y cortarlo.
- 8) El tubo cónico tiene tapa a rosca; verificar que la misma quede bien cerrada y controlar que la muestra esté correctamente rotulada.



- 9) Trasladar al laboratorio el tubo con la muestra en un recipiente con refrigerante o hielo; en caso de no poder entregarlo en ese momento, guardarlo en heladera no más de tres días (NUNCA CONGELAR).
- 10) La muestra debe ser remitida con un resumen de historia clínica.

**B) Tejido de biopsia en fresco**

- 1) **Opción 1:** Colocar el tejido en tubo estéril y congelarlo inmediatamente. Trasladar al laboratorio en hielo seco y congelarlo hasta su procesamiento.
- 2) **Opción 2:** Colocar el tejido en tubo estéril y cubrirlo con etanol 96°. Trasladar al laboratorio a temperatura ambiente. Mantenerlo en estas condiciones hasta su procesamiento.

**ANEXO 2:****PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV).****PROCEDIMIENTO GENERAL****Bioseguridad**

Antes de comenzar se recomienda lavar las manos con abundante agua y jabón. Ésta maniobra debe repetirse cada vez que se termina de trabajar y se retira del laboratorio.

Trabajar con guardapolvo o camisolín, guantes y antiparras de seguridad. Limpiar la superficie de trabajo y materiales con etanol 70%.

En el caso de tener que desparafinar muestras fijadas y embebidas en parafina y purificar ácidos nucleicos con solventes, trabajar en campana de extracción; los restos de los solventes utilizados, deben acumularse en bidones de vidrio claramente identificados.

Descartar todo material de plástico o vidrio que hayan estado en contacto con las muestras en solución de hipoclorito de sodio (5g/l cloro activo) preparada en el día y dejar como mínimo 1h; una vez transcurrido este tiempo, descartar el material plástico en bolsa roja, excepto los portaobjetos que hayan estado en contacto con las muestras los cuales deben ser descartados como vidrio roto.

Decontaminar los bisturíes y pinzas metálicas por inmersión en etanol 70% y dejar como mínimo 30 minutos. Descartar las hojas de bisturí en recipiente para descarte de agujas.

Una vez concluida la tarea, limpiar con etanol al 70% todas las superficies de trabajo utilizadas, al igual que los materiales (pipetas, cajas de tips, gradillas etc).

El personal debe considerar que las muestras clínicas son potencialmente infecciosas y debe conocer los lineamientos del Manual de Bioseguridad del departamento de Virología, así como los del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3<sup>ra</sup> edición, año 2005 de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

## **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR.**

### **Obtención de extractos crudos a partir de:**

● **Células de descamación (cepillado genital)**: luego de efectuada la toma, espátula o cepillo debe ser sumergido en un tubo cónico (preferentemente plástico c/tapa a rosca, marca Corning o similar), conteniendo aproximadamente 3 ml de PBS estéril. Puede guardarse a 4°C hasta un máximo de 72 horas.

- 1) Centrifugar 5 min a 2000-3000 rpm (puede usarse una centrífuga común de mesa).
- 2) Descartar el sobrenadante. Si no se va a continuar con la extracción de ácidos nucleicos, puede interrumpirse en este punto, congelando el pellet de células a -20°C (por semanas o meses)
- 3) Resuspender el pellet de células en 250-500 µl de buffer de digestión (150 mg/ml Proteinasa k), (alrededor de 4 volúmenes).
- 4) Incubar 1 hora a 56°C. Si no se va a continuar con la purificación de ácidos nucleicos, puede interrumpirse en este punto y congelar a -20°C (por semanas). El punto final de digestión es cuando se visualiza como máximo el 20% del material celular inicial
- 5) Opción 1 (sin purificación): Calentar a 95°C, 10 minutos para inactivar la proteinasa y guardar las muestras a -20°C. Para realizar la PCR, descongelar, agitar y tomar de 5 a 20 µl.

**Nota:** El calentamiento prolongado puede dañar al ADN y tiempos menores a 8 minutos pueden

no inactivar a la proteinasa K. En este paso las tapas de los tubos pueden abrirse con facilidad por lo que se recomienda utilizar tubos con tapas de seguridad (*cap locks*) o después de la incubación (paso 6) pasar el digesto a inactivar a un tubo nuevo.

6) Opción 2 (con purificación): Ver “**Purificación de ácidos nucleicos**”

● **Tejido fijado y embebido en parafina** si se trata de tacos, efectuar ~5 cortes con micrótopo, de 10 µm, extremar las precauciones respecto de la higiene de la cuchilla entre una y otra muestra. Si se trata de preparados histológicos, el material debe ser obtenido por raspado de los portaobjetos con bisturí estéril.

1) Recoger el material en tubo estéril de 1,5 ml. Adicionar 0,5 -1 ml de n-octano o xilol.

2) Agitar constantemente durante 20 min., a temperatura ambiente.

**Nota:** En general la parafina se disuelve rápidamente; éste tiempo junto a la agitación sería suficiente, aunque eso dependerá de la cantidad de material inicial

3) Centrifugar en microcentrífuga a 14000 rpm durante 8-10 minutos.

4) Remover cuidadosamente el sobrenadante y descartarlo, sin tocar el pellet. Si todavía quedan restos de parafina, repetir de 1 a 4.

**Nota:** Para saber si un tejido está desparafinado es necesario observar el aspecto del tejido: el desparafinado es opaco y tiene apariencia plumosa, mientras el parafinado es un sólido blanco y rígido

5) Repetir 1 a 4 usando etanol 100% en lugar de n-octano o xilol.

6) Repetir de 1 a 4 usando etanol 70% en lugar de 100%.

7) Dejar toda la noche los tubos abiertos tapados con un trozo de parafilm agujereado, a fin de evaporar el etanol. La apariencia del tejido cambia de opaco cuando está húmedo a blanco cuando está seco.

**Nota:** No usar *speed vac* o botellas de vacío para secar los pellets debido a que las muestras pueden contaminarse fácilmente entre sí. Los tubos abiertos son muy vulnerables a la contaminación, extremar las precauciones

8) Resuspender el pellet en 250-500 µl de buffer de digestión (500 µg/ml Proteinasa K), según el tamaño del pellet.

9) Digerir durante 3 horas a 56°C (se puede dejar toda la noche), con suave agitación. Si no se va a continuar, puede interrumpirse en este punto congelando el digesto a -20°C. El punto final de digestión es cuando se visualiza como máximo el 20% del material celular inicial

10) Opción 1 (sin purificación) Idem punto 5 en células de descamación

11) Opción 2 (con purificación): Ver **“Purificación de ácidos nucleicos**

● **Tejido de biopsia en fresco (no fijado):**

1) Retirar el tejido de biopsia del freezer de -80°C y observar su tamaño.

Si el tamaño es aproximado al de una lenteja, llevarlo a la cabina de seguridad biológica y ahí traspasarlo a un tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 ml.

2) Si el tamaño es mayor, se recomienda cortarlo en trozos más pequeños en la cabina de seguridad biológica, para que la digestión sea más rápida y completa. Para realizar esta maniobra, colocar el tejido en una placa de Petri ubicada sobre una bandeja con hielo y cortarlo con bisturí estéril. Esta maniobra debe realizarse en forma rápida, evitando la descongelación total del tejido.

Traspasar el material cortado a un tubo/s *Eppendorf* de 1,5 ml de manera tal que el material no sobrepase la mitad del tubo.

3) Resuspender el tejido en 250-500  $\mu$ l de buffer de digestión (*500 $\mu$ g/ml de proteinasa K*), dependiendo del tamaño de la biopsia (se calcula alrededor de 4 volúmenes de buffer de digestión por volumen de tejido). El tejido debe estar completamente inmerso en el buffer de digestión. Si es necesario, usar vortex y centrifugar brevemente los tubos antes de incubar. Asegurar que el/los tubo/s estén bien tapado/s y retirarlo/s de la cabina de seguridad biológica.

4) Digerir como mínimo 3 horas a 56°C, con suave agitación. El punto final de digestión es cuando se visualiza como máximo el 20% del tejido inicial. Si no se va a continuar, puede interrumpirse en este punto congelando el digesto a -20°C (por semanas).

**Nota:** grandes piezas de tejido pueden requerir períodos de incubación de hasta 48 hs y el agregado de cantidades adicionales de proteinasa K.

5) Una vez terminada la incubación, retirar el/los tubo/s del agitador termostatzado. Centrifugar brevemente los tubos para asegurar que no quede líquido en la tapa ni en las paredes.

6) Opción 1 (sin purificación): Idem punto 5 en células de descamación.

7) Opción 2 (con purificación): Ver “**purificación de ácidos nucleicos**”

#### **Purificación de ácidos nucleicos:**

Eventualmente, los extractos crudos pueden contener alguna sustancia que afecte la amplificación (por ej. que inactive a la polimerasa Taq). Este problema puede solucionarse por el siguiente protocolo de purificación de ácidos nucleicos:

1) Adicionar un volumen de fenol saturado:cloroformo/alcohol isoamílico (1:1) (cloroformo:isoamílico 24:1) al extracto crudo.

- 2) Agitar suavemente por inversión 10 minutos.
- 3) Microcentrifugar 10 minutos al máximo de velocidad (14.000 rpm) para separar bien las fases.
- 4) Tomar con cuidado la fase acuosa (superior) y pasarla a otro tubo estéril previamente rotulado.
- 5) Adicionarle igual volumen de mezcla cloroformo/isoamílico (24:1)
- 6) Agitar 10 minutos.
- 7) Repetir 3 y 4.
- 8) Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y un 1/10 volumen de solución de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  7,5M. Mezclar por inversión.
- 9) Colocar 10 minutos a  $-70^\circ\text{C}$  o toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$ .
- 10) Microcentrifugar a  $4^\circ\text{C}$  durante 60 minutos a 14000 RPM, colocando el tubo de manera de reconocer la posición del pellet.
- 11) Volcar por inversión. Escurrir bien con el tubo boca abajo sobre papel absorbente.
- 12) Enjuagar el pellet (rotando el tubo muy suavemente) con 500  $\mu\text{l}$  etanol 70%.
- 13) Microcentrifugar a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos a 14000 RPM, colocando el tubo de manera de reconocer la posición del pellet.
- 14) Retirar con tip cuidadosamente, secar al aire unos minutos.
- 15) Resuspender en  $\sim 50\text{-}100$   $\mu\text{l}$  de buffer TE estéril o agua bidestilada, raspar bien las paredes del tubo para asegurar una óptima recuperación.
- 16) Guardar a  $-20^\circ\text{C}$ .

## ANEXO III

## FICHA EPIDEMIOLOGICA ESTANDARIZADA

Número de Paciente: ..... FECHA: ...../...../.....  
 Emplear sigla de Provincia y luego número consecutivo (Ej. MIS 1; MIS 2; etc.)

Apellido y Nombres:	Edad:	DNI N°:
Institución/Servicio derivante:	Nacionalidad:	
Dirección completa:	TE de contacto:	

## ANTECEDENTES SOCIOCULTURALES

<b>Nivel educativo:</b> Sin formación, Primaria incompleta, Primaria completa, Secundaria incompleta, Secundaria completa, Terciario/universitario incompleto, Terciario/universitario completo.		
<b>Profesión /Ocupación:</b> ..... <b>Nivel de ingresos mensuales:</b>		
<b>Nivel habitacional:</b> a) casa adobe, casa madera, casa material; b) letrina, baño instalado; c) pozo, canilla pública, agua corriente		
<b>Estado civil:</b> sin pareja	con pareja estable	con pareja no estable
<b>Etnia:</b> caucásico	aborigen (aclarar etnia):	

## ANTECEDENTES GINECOBSTETRICOS

FUM: ...../...../.....	Edad de inicio de relación sexual: .....
Número de parejas sexuales: .....	Número de embarazos: .....
Hijos nacidos vivos: .....	Edad al primer embarazo: .....
Se ha realizado PAP?: Si - No Fecha último PAP:...../...../..... Resultado:	
Se ha realizado Colposcopia?: Si - No Fecha: ...../...../..... Resultado:	
Se ha realizado Biopsia?: Si - No Fecha: ...../...../..... Resultado:	

## FACTORES ASOCIADOS

Usa anticonceptivos?: No - Si	Tipo: .....	Duración en años: .....
Historia de ETS : No - Si	Tipo de ETS:.....	

Terapia de Reemplazo Hormonal: No-Si Tipo: ..... Duración en años: .....

Fue fumadora alguna vez? (un cigarrillo diario por un mínimo de 6 meses): Si - No

Edad de inicio: .....

Nombre y Firma Encuestador:



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO:

“Epidemiología Molecular de la infección genital por virus papiloma humano en la ciudad de Viedma.”

### Explicación introductoria para las pacientes

#### Sra/Srta.:

En el contexto de nuestra tarea de cuidado y prevención de la salud, realizamos diferentes trabajos de investigación para conocer más sobre las causas de las enfermedades y poder evitarlas o curarlas de la mejor manera. Entre ellos, el proyecto cuyo título se encuentra en el encabezado, enfoca el estudio de la infección de un virus llamado Papiloma Humano (cuya abreviatura es “HPV”) y su acción en el cuello uterino; este estudio lo realizamos en conjunto con investigadores del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS “Dr. Malbrán”.

Este proyecto incluye la realización de análisis adicionales sobre la misma muestra que es necesaria para realizar el diagnóstico, ya sea durante los controles habituales o las prácticas terapéuticas que se le realicen. ***Se tomará una muestra con el fin de ser utilizada para el presente proyecto, que no generará molestias ni riesgos adicionales para Ud.*** y no serán utilizadas con otros fines, asegurando además su confidencialidad.

Por todo lo expuesto solicitamos su autorización para poder incluirla en el estudio.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Autorizo a que el material de células y/o biopsias cérvico-vaginal sea utilizado en un trabajo de investigación sobre HPV, en el marco de lo que me fue explicado en el texto anterior.

Aclaro que he leído y entendido cada párrafo de este texto, con los que he acordado.

Fecha:...../...../.....

Firma.....

Carácter en que firma.....

Tipo y N° de documento.....

Domicilio.....

## 8. Bibliografía

- *Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Vaccine 2008; 26: L16-36*
- *Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, Robles SC, Winkler JL, Tsu VD, Jeronimo J, Cuzick J, Sasieni P. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. Int J Gynecol Cancer. 2011;21(9):1654-63.*
- *Almonte M, Silva Idos S, Asare A, Gilham C, Sargent A, Bailey A, et ál. Sexual behavior and HPV infection in British women, by postal questionnaires and telephone interviews. J Med Virol. 2011 Jul;83(7):1238-46. doi: 10.1002/jmv.22085. Epub 2011 Apr 22.*
- *Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Närvänen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA 2001 Jan 3;285(1):47-51.*
- *Arbyn M, Rebolj M, De Kok IM, Fender M, Becker N, O'Reilly M, et al. The challenges of organising cervical screening programmes in the 15 old member states of the European Union. Eur J Cancer 2009;45(15):2671-2678.*
- *Beutner KR, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. Am J Med. 1997 May 5;102(5A):9-15.*
- *Bosch FX<sup>1</sup>, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol. 2002 Apr;55(4):244-65.*
- *Boshart M., Gissmann L., Ikenberg H., Kleinheinz A., Scheurlen W., zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer. EMBO J. 3:1151-1156 (1984).*
- *Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. J Virol. 2003 Mar;77(6):3846-50.*
- *Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. J Infect Dis. 2010 Dec 15;202(12):1789-99.*
- *Castellsagué X<sup>1</sup>, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. Virus Res. 2002 Nov;89(2):191-9.*

- Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066–71
- Castro-Romero JI, Hernández-Girón C, Madrid-Marina V. La anticoncepción hormonal como factor de riesgo para cáncer cervicouterino: evidencias biológicas, inmunológicas y epidemiológicas. *Ginecol Obstet Mex* 2011;79(9):5
- Chan PK, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2012 Jul-Aug;49(4):117-36
- Ciapponi AI, 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):e25493
- 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 May;14(5):1157-64.
- Crown JM. HPV: The global burden. *Nature* 2012; 488:S2-3.
- de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453-9.
- Deluca GD, Basiletti J, González JV, Díaz Vásquez N, Lucero RH, Picconi MA. Human papilloma virus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from Northern Argentina. *Medicina (B Aires).* 2012;72(6):461-6.
- Deluca GD, Basiletti J, Schelover E, Vásquez ND, Alonso JM, Marín HM, Lucero RH, Picconi MA. Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. *Braz J Infect Dis.* 2011 Nov-Dec;15(6):567-72.
- Deluca GD, Marín HM, Blanco NS, Basiletti JA, González JV, Merino AL, Picconi MA. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical alterations from north Argentina.. *Indian J Med Microbiol.* 2013 Apr-Jun;31(2):138-41.
- Dianne J. Marais, Leigh F. Johnson, David Coetzee and Anna-Lise Williamson J. Impact of Human Immunodeficiency Virus on the Natural History of Human Papillomavirus Genital Infection in South African Men and Women. *Infect Dis.* (2012) doi: 10.1093/infdis/jis299 First published online: April 19, 2012.

- *Dürst 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. 80: 3812-3815 (1983).*
- *Eiguchi K, Tatti S, Alonio LV, González JV, Leirós GJ, Fleider L, Vighi S, Padros K, Raimondi E, Teyssié A, Picconi MA. Association of DRB1 and DQB1 HLA class II polymorphisms in high-grade and neoplastic cervical lesions of women from Argentina. J Low Genit Tract Dis. 2008 Oct;12(4):262-8.*
- *Eklund C<sup>1</sup>, Forslund O, Wallin KL, Zhou T, Dillner J; WHO Human Papillomavirus Laboratory Network. Bharti AC, Dillner J, Ennaifer-Jerbi E, Garland S, Kukimoto I, Ngamkham J, Picconi MA, Sahli R, Unger ER, Williamson AL. J Clin Microbiol. 2012 Jul;50(7):2289-98. The 2010 global proficiency study of human papillomavirus genotyping in vaccinology.*
- *Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. Cancer Res. 2000 Mar 1;60(5):1267-75*
- *Ethel-Michele de Villiers, Claude Fauquet, Thomas R. Broker, Hans-Ulrich Bernard, Harald zur Hausen. Classification of papillomaviruses. Virology 2004 Jun 20;324(1):17-27.*
- *Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. J Virol. 1997 Mar;71(3):2449-56.*
- *Fagan EJ, Moore C, Jenkins C, Rossouw A, Cubie HA, James VL. External quality assessment for molecular detection of human papillomaviruses. J Clin Virol 2010; 48: 251–4.*
- *Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No 5 version 2.0 2004.*
- *Franceschi S, Plummer M, Clifford G, de Sanjose S, Bosch X, Herrero R, Muñoz N, Vaccarella S. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Groups; International Agency for Research on Cancer Human Papillomavirus Prevalence Surveys Study Group. Br J Cancer. 2009 Sep 1;101(5):865-70.*
- *Frattini MG<sup>1</sup>, Lim HB, Laimins LA. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 2;93(7):3062-7.*
- *Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. J Virol. 2001 Feb;75(3):1565-70.*

- GM Clifford<sup>1</sup>, JS Smith, T Aguado, S Franceschi. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer* (2003) 89, 101–105.
- Guadalupe Carballal y José Oubiña. *Virología Médica*. Año 1998. Ed. El Ateneo.
- Hakama M, Louhivuori K. A screening programme for cervical cancer that worked. *Cancer Surv* 1988;7(3):403-416.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6413-23.
- Instituto Nacional del Cáncer. *Prevención del Cáncer Cérvico-uterino* (2011).
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006 Sep 1;119(5):1108-24.
- Itzel E, Calleja-Macias, Luisa L, Villa, Jose C, Prado, Mina Kalantari, Bruce Allan, Anna-Lise Williamson, Lap-Ping Chung, Robert J. Collins, Rosemary E. Zuna, S. Terence Dunn, Tang-Yuan Chu, Heather A. Cubie, Kate Cuschieri, Magnus von Knebel-Doeberitz, Claudia R. Martins, Gloria I. Sanchez, F. Xavier Bosch, Nubia Munoz, Hans-Ulrich Bernard. Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31, 35, 52, and 58, Four Close Relatives of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol*. November 2005 vol. 79no. 21 13630-13640.
- Jablonska S., Milleski B. Zur Kenntnis der epidermodysplasia verruciformis Lewandowsky - Lutz. *Dermatologica* 115: 1-22 (1957)
- Jarret W.F.H., Murphy J., O'Neil B.W., Laird H.M. Virus-induced papillomas of the alimentary tract of cattle. *Int. J. Cancer* 22: 323-328 (1978).
- Sambrook Joseph, Fritsch EF, Maniatis Tom. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- Kesis T.D., Slebos R.J., Nelson W.G., Kastan M.B., Plunkett B.S., Han S.M., Lörincz A.T., Hedrick L., Cho K.R. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3988-3992 (1993).
- Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jul 20;97(14):1072-9.

- Kjør SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Oct 6;102(19):1478-88. Epub 2010 Sep 14.
- Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Jun;68(2):362-72.
- Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1167-73
- Luis Fidel Avendaño, Marcela Ferrés, Eugenio Spencer. *Virología Clínica. Año 2011. Ed. Mediterraneo.*
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Brocker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; 7: 209- 14.
- Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince MA, Moreno J, Krunfly C, van den Brule AJ, Meijer CJ, Muñoz N, Herrero R; Proyecto Concordia Collaborative Group. Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sex Transm Dis.* 2003 Aug;30(8):593-9.
- McDougall J.K. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186: 101-119 (1994).
- McDougall J.K., Klingelutz A.J. Telomerase and the HPV oncogenes: more than a terminal relationship. *Papillomavirus Rep.* 10: 81- 84 (1999).
- Menegazzi P, Barzon L, Palù G, Reho E, Tagliaferro L. Human papillomavirus type distribution and correlation with cyto-histological patterns in women from the South of Italy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2009;2009:198425. Epub 2010 Jan 24.
- Merle E, Rose RC, LeRoux L, Moroianu J. Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin alpha2beta1 heterodimers. *J Cell Biochem.* 1999 Sep 15;74(4):628-37.
- Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002 Mar 30;359(9312):1085-92.
- Münger K., Werness B.A., Dyson N., Phelps W.C., Harlow E., Howley P.M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene. *EMBO J* 8: 4099-4105 (1989).

- Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, et al. *Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine* 2006; 24 (suppl 3): S1–10.
- N Muñoz, et al. *Vaccine* 24S3 S3/1-S3/10 (2006).
- National Cancer Institute Workshop. *The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. JAMA* 1989; 931-4.
- Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. *Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. J Biol Chem.* 2002 Jun 28;277(26):23958-64
- Nyitray AG, Lin HY, Fulp WJ, Chang M, Menezes L, Lu B, Abrahamsen M, Papenfuss M, Gage C, Galindo CM, Giuliano AR. *The role of monogamy and duration of heterosexual relationships in human papillomavirus transmission. J Infect Dis.*2014 Apr1;209(7):1007-1
- Olson C., Pamukcu A.M., Brobst D.F., Kowalczyk T., Sattler E.J., Price J.M. *A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. Cancer Res* 19: 779-782 (1959).
- Orth G., Jablonska S., Favre M., Croissant O., Jarzabek-Chorzelska M. *Characterization of two new types of HPV from lesions of epidermodysplasia verruciformis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1537-1541 (1978).
- Picconi MA, Gronda J, Alonio L, Villa LL, Sicheros L, Miranda S, Barcena M, Teyssie A. *Virus Papiloma Humano en mujeres Quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino. Tipos virales y variantes de HPV16. MEDICINA (Buenos Aires)* 2002; 62: 209-220
- Picconi MA. *Human papillomavirus detection in cervical cancer prevention. Medicina (B Aires).* 2013;73(6):585-96.
- Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O; CLEOPATRE Portugal Study Group. *Risk factors for human papillomavirus infection among women in Portugal: The CLEOPATRE Portugal Study.Int J Gynaecol Obstet.* 2012 Aug;118(2):112-6. Epub 2012 May 16.
- Poppe WA<sup>1</sup>, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. *Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. Gynecol Obstet Invest.* 1995;39(1):34-8.

- Quint W, Jenkins D, Molijn A, Struijk L, van de Sandt M, Doorbar J, Mols J, Van Hoof C, Hardt K, Struyf F, Colau B. One virus, one lesion--individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol.* 2012 May;227(1):62-71. doi: 10.1002/path.3970. Epub 2012 Feb 17.
- Ricardo Ortiz Serrano, M.D. Claudia Janeth Uribe Pérez, M.D. Luis Alfonso Díaz Martínez, M.D. Yuriko Rafael Dangond Romero, OD, FACTORES DE RIESGO PARA CÁNCER DE CUELLO UTERINO. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 55 No.2 • 2004 • (146-160).*
- Sasieni P, Adams J. Effect of screening on cervical cancer mortality in England and Wales: analysis of trends with an age period cohort model. *Bmj* 1999;318(7193):1244-1245.
- Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et ál. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337: 76–84.
- Schiffman M<sup>1</sup>, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007 Sep 8;370(9590):890-907.
- Shope R.E., Hurst E.W. Infectious papillomatosis of rabbit: with a note on the histopathology. *J. Exp. Med.* 58:607-624 (1933).
- Sijvarger CC, González JV, Prieto A, Messmer AG, Mallimaci MC, Alonio VL, Teyssié R, Picconi MA. Epidemiología de la infección cervical por virus papiloma humano en Ushuaia, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* (2006) 38: 19-24
- Silvia de Sanjose, Wim G V Quint, Laia Alemany, Daan T Geraets, Jo Ellen Klaustermeier, Belen Lloveras, Sara Tous, Ana Felix, Luis Eduardo Bravo, Hai-Rim Shin, Carlos S Vallejos, Patricia Alonso de Ruiz, Marcus Aurelho Lima, Nuria Guimera, Omar Clavero, Maria Alejo, Antonio Llombart-Bosch, Chou Cheng-Yang, Silvio Alejandro Tatti, Elena Kasamatsu, Ermina Iljazovic, Michael Odida, Rodrigo Prado, Muhieddine Seoud, Magdalena Grce, Alp Usulutun, Asha Jain, Gustavo Adolfo Hernandez Suarez, Luis Estuardo Lombardi, Aekunbiola Banjo, Clara Menéndez, Efrén Javier Domingo, Julio Velasco, Ashrafun Nessa, Saibua C Bunnag Chichareon, You Lin Qiao, Enrique Lerma, Suzanne M Garland, Toshiyuki Sasagawa, Annabelle Ferrera, Doudja Hammouda, Luciano Mariani, Adela Pelayo, Ivo Steiner, Esther Oliva, Chris J L M Meijer, Waleed Fahad Al-Jassar, Eugenia Cruz, Thomas C Wright, Ana Puras, Cecilia Ladines Llave, Maria Tzardi, Theodoros Agorastos, Victoria Garcia-Barriola, Christine Clavel, Jaume Ordi, Miguel Andújar, Xavier Castellsagué, Gloria I Sánchez, Andrzej Marcin Nowakowski, Jacob Bornstein, Nubia Muñoz, F Xavier Bosch, on behalf of the Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010; 11: 1048–56
- Silvia Franceschi<sup>1\*</sup>, Rolando Herrero<sup>2</sup>, Gary M. Clifford<sup>1</sup>, Peter J.F. Snijders<sup>3</sup>, Annie Arslan<sup>1</sup>, Pham Thi Hoang Anh<sup>4</sup>, F. Xavier Bosch<sup>5</sup>, Catterina Ferreccio<sup>6</sup>, Nguyen Trong Hieu<sup>7</sup>, Eduardo Lazcano-Ponce<sup>8</sup>, Elena Matos<sup>9</sup>, Monica Molano<sup>10</sup>, You-Lin Qiao<sup>11</sup>, Raj



- Rajkumar<sup>12</sup>, Guglielmo Ronco<sup>13</sup>, Silvia de Sanjos<sup>e5</sup>, Hai-Rim Shin<sup>14</sup>, Sukhon Sukvirach<sup>15</sup>, Jaiye O. Thomas<sup>16</sup>, Chris J.L.M. Meijer<sup>3</sup>, Nubia Munoz<sup>10</sup> and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int. J. Cancer*: 119, 2677–2684 (2006)
- Smith JS, Green J, Berrington de González A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et ál. Cervical cancer and the use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003;361:1159–67.
  - Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
  - Soto-De Leon SC, Camargo M, Sanchez R, Leon S, Urquiza M, Acosta J, et ál. Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jan;15(1):100-2. Epub 2008 Dec 19.
  - Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses *Indian J Med Res*. 2009 Sep; 130(3):266-76.
  - Stoler M.H., Rhodes C.R., Whitbeck A., Wolinsky S.M., Chow L.T., Broker T.R. Human papillomavirus type 16 and 18 expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol*. 23: 117-128 (1992).
  - Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ, Guillebaud J, Cuzick J. Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet*. 1996 Apr 6;347(9006):941-3.
  - Tabrizi SN. Quality assessment for human papillomavirus testing. *Sex Health* 2010;7:335–7.
  - Tedd V. Ellerbrock, MD; Mary Ann Chiasson, DrPH; Timothy J. Bush, BA; Xiao-Wei Sun, MD; Dorothy Sawo, NFP; Karen Brudney, MD; Thomas C. Wright, Jr, MD. Incidence of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions in HIV-Infected Women. *JAMA*. 2000;283(8):1031-1037. doi:10.1001/jama.283.8.1031.
  - Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teyssie AR. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol*. 2001 May;21(2):129-34.
  - Tori Shors. *Virus: Estudio molecular con orientación clínica*. Año 2009. Ed. Panamericana.
  - Unger ER, Dillner J, editors. *Human Papillomavirus Laboratory Manual*. 1st Edition Geneva: World Health Organization; 2009. Available at: <http://www.who.int/immunization/documents/en/> (last accessed May 2012).

- Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M. Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J., Peto J., Meijer C.J., Muñoz N. *Human papilloma virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol.* 189: 12-19 (1999).
- WHO HPV LabNet (*Human papillomavirus laboratory manual, Ed. 2009*)
- Wright D, Manos MM. *Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis M (ed). PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, 1990, p 153-8.*
- Wright TC Jr; Massad LS; Dunton CJ; Spitzer M; Wilkinson EJ; Solomon D. *2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. American Journal of Obstetric Gynecology.* 2007 Oct; 197(4):346-55.
- [www.who.int/biologicals/areas/human\\_papillomavirus/WHO\\_HP\\_V\\_LabNet/en/index.html](http://www.who.int/biologicals/areas/human_papillomavirus/WHO_HP_V_LabNet/en/index.html)
- [www.who.int/wer/2009/wer8415.pdf](http://www.who.int/wer/2009/wer8415.pdf)
- Yetimalar H, Kasap B, Cukurova K, Yildiz A, Keklik A, Soylu F. *Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis.. Arch Gynecol Obstet.* 2012 ;285(3):805-10
- zur Hausen H. *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):690-8.
- zur Hausen, H. *Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer Res.* 36: 530-535 (1976).