

Detección de los tipos virales 16, 18, 31 y 33 de papillomavirus humano en displasias severas y carcinoma in situ de cuello uterino

Dres. Guillermo Rodríguez*, Isabel Fernández†, Enrique Barrios‡, Carlos Sanguinetti§, Rafael Alonso¶, Noemí Maedo††, Juan Vasallo‡‡

Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer Área: Programa de Prevención del Cáncer de Cuello Uterino "Dr. Enrique Pouey". Montevideo, Uruguay

Resumen

Introducción: las displasias severas y los carcinomas in situ son los verdaderos precursores del cáncer de cuello uterino. La infección por el virus del papiloma humano (HPV) es un factor etiológico importante en el origen de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (H-SIL) y el cáncer de cuello uterino de tipo epidermoide.

Objetivo: determinar la prevalencia de los tipos de HPV descriptos como más frecuentes en otras regiones, en una muestra seleccionada de mujeres de Uruguay portadoras de displasias severas y carcinoma in situ de cuello uterino, con su diagnóstico confirmado por el estudio histológico de piezas de conización quirúrgica.

Material y método: Se seleccionó una muestra de piezas de conización quirúrgica realizadas a mujeres portadoras de displasias severas y carcinomas intraepiteliales epidermoides de cuello uterino procedentes de Montevideo y Canelones. Las piezas fueron fijadas en formol y luego incluidas en parafina.

Resultados: se detectó la presencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) de HPV en 39 de las 49 (80%).

El tipo viral hallado con mayor frecuencia fue el HPV 16 en 23 de los conos (47%), seguido por el tipo 33 con siete casos (14%) y el tipo 31 en dos casos (4%). Se destaca la ausencia del tipo HPV 18 en esta muestra.

* Ex Profesor Adjunto de Clínica Ginecocológica. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Coordinador del Programa de Prevención del Cáncer de Cuello Uterino. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. Uruguay.

† Ex Profesora Adjunta de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Jefe de Laboratorio de Anatomía Patológica, Hospital Gustavo Saint Bois. Uruguay.

‡ Profesor Titular de Métodos Cuantitativos. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

§ Magíster en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay.

¶ Profesor Agregado de Métodos Cuantitativos. Facultad de Medi-

cina, Universidad de la República. Uruguay.

†† Ex Profesora Adjunta de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Jefa de laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Policial. Uruguay.

‡‡ Ex Coordinador del Programa de Vigilancia Epidemiológica. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. Uruguay.

Correspondencia: Dr. Guillermo Rodríguez
Convención 1382 ap. 215, CP 11100. Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: barranka@adinet.com.uy

Recibido: 29/6/09.

Aceptado: 6/11/09.

Conclusión: se demostró la frecuente asociación entre infección por HPV y las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino. Dentro de los cuatro tipos de HPV investigados y descriptos como más frecuentes en otras regiones, se detectó con mayor frecuencia el tipo 16 al igual que lo ocurrido en otras regiones del mundo.

Palabras clave: *INFECCIONES POR PAPILOMAVIRUS.
DISPLASIA DEL CUELLO DEL ÚTERO.
CARCINOMA IN SITU.
NEOPLASIAS DEL CUELLO UTERINO - etiología.*

Keywords: *PAPILLOMAVIRUS INFECTIONS.
UTERINE CERVICAL DYSPLASIA.
CARCINOMA IN SITU.
UTERINE CERVICAL NEOPLASMS - etiology.*

Introducción

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad que ocupa el tercer lugar en incidencia en las mujeres de Uruguay con una tasa ajustada de 17,0 por 100.000 mujeres para el año 2003. Es precedido como localizaciones más frecuentes por el cáncer de mama y colon y recto. Como causa de muerte ocupa el quinto lugar dentro de las causas neoplásicas más frecuentes en la mujer produciendo alrededor de 140 muertes por año en Uruguay, con una tasa de mortalidad ajustada de 5.99 por 100.000 (1999-2003)⁽¹⁾.

Se conoce la historia natural de la enfermedad que es precedida por lesiones precursoras. Estas lesiones precursoras se encuentran en el espesor del epitelio pavimentoso y, de acuerdo a su probabilidad de evolución al cáncer, se las clasifica desde el punto de vista citológico en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (L-SIL) y alto grado (H-SIL)^(2,3).

Existe evidencia de que las lesiones L-SIL integradas por lesiones HPV y displasias leves regresan espontáneamente más de 57%, persisten como tales 32%, progresan a carcinoma in situ 11% y a cáncer invasor menos de 1%. De las lesiones H-SIL integradas por displasias moderadas, severas y carcinoma intraepitelial, se comprobó que regresan aproximadamente 30% pero que progresan a cáncer más de 12%⁽⁴⁾.

Por este motivo se considera a las lesiones H-SIL como las verdaderas precursoras del cáncer de cuello uterino de tipo epidermoide.

La infección por el virus del papiloma humano (HPV) es un factor etiológico importante en el origen de las lesiones H-SIL y el cáncer de cuello uterino de tipo epidermoide. Se ha propuesto como el factor etiológico "necesario" de cáncer en humanos. No existe por el momento una hipótesis alternativa sobre la etiología del cáncer de cuello uterino⁽⁵⁻⁷⁾.

Con los estudios de tipificación viral se ha encontrado que algunos tipos virales denominados tipos de alto riesgo 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 se asocian con mayor frecuencia a las lesiones H-SIL. Dentro de este grupo los hallados con mayor frecuencia son los cuatro primeros. Se les vincula con más de 75% de los cánceres invasores.

Dentro de los tipos denominados de bajo riesgo, el 6 y 11 son los más frecuentes. Estos tipos de bajo riesgo son raros de encontrar en el cáncer de cuello uterino y lesiones precursoras, pero se les encuentra con mucha frecuencia en las verrugas genitales, anales y en la orofaringe.

La mayoría de las infecciones por HPV en mujeres jóvenes es transitoria y un pequeño porcentaje de ellas desarrolla infecciones persistentes. Estas infecciones transitorias son ocasionadas mayoritariamente por tipos de HPV de bajo riesgo mientras que las infecciones persistentes suelen ser ocasionadas por los tipos de HPV de alto riesgo^(8,9,10).

Los tipos virales de alto riesgo 16 y 18 se han descripto como los más frecuentes en lesiones H-SIL y cáncer, encontrándose también que la prevalencia del tipo 18 es variable en las diferentes regiones.

Existen trabajos que muestran que los dos tipos virales más frecuentes 16 y 18 serían los responsables y posible causa de 70% de los cánceres epidermoides.

Por este motivo es que algunos autores proponen a la tipificación de los HPV de alto riesgo como una herramienta a evaluar en el tamizaje primario del cáncer de cuello uterino⁽¹¹⁾.

En los últimos años se han desarrollado vacunas profilácticas tendientes a evitar el ingreso de los tipos virales de alto riesgo 16 y 18 al organismo de la mujer. Esta es una forma de prevención del cáncer de cuello uterino muy efectiva para los tipos virales más frecuentes en las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino epidermoide.

En Uruguay no se conoce la prevalencia de los diferentes tipos de HPV en cáncer de cuello uterino invasor, ni tampoco se conoce en las lesiones precursoras.

Por este motivo se consideró importante determinar la prevalencia de la infección por HPV en las lesiones H-SIL y dentro de ellas en especial las displasias severas y carcinoma in situ de cuello uterino.

En patología cervical la citología realiza una "aproximación diagnóstica" de lesiones precursoras o cáncer de cuello. El diagnóstico debe confirmarse mediante la biopsia dirigida por colposcopia y es el estudio histológico el que hace el diagnóstico.

Las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino corresponden desde el punto de vista histológico a las displasias moderadas, severas y al carcinoma in situ. Su confirmación diagnóstica requiere el estudio seriado del cuello uterino mediante conización quirúrgica o procedimiento LEEP (Loop Electrical Excision Procedure).

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de los tipos de HPV descritos como más frecuentes en una muestra de las mujeres de Uruguay portadoras de displasias severas y carcinoma in situ de cuello uterino, con su diagnóstico confirmado por el estudio histológico de piezas de conización quirúrgica.

Material y método

Muestra

Se seleccionó una muestra de piezas de conización quirúrgica realizadas a mujeres portadoras de displasias severas y carcinomas intraepiteliales epidermoides de cuello uterino procedentes de Montevideo y Canelones que fueron procesadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Saint Bois y en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Policial de Montevideo, Uruguay. Estas mujeres son usuarias de los servicios de salud pública y provienen del área metropolitana de Montevideo. Se corresponden a la totalidad de las piezas existentes de procedimientos quirúrgicos realizados desde enero de 2004 hasta diciembre de 2007, a mujeres procedentes de los departamentos de Montevideo y Canelones con edades entre 25 y 54 años, que fueron estudiadas en los mencionados laboratorios.

Fueron excluidas aquellas piezas portadoras de lesiones de displasia moderada o menores. Las displasias moderadas forman parte de las lesiones H-SIL, pero no fueron consideradas pues su diagnóstico histológico puede en algunos casos ser discordante entre patólogos.

La confirmación diagnóstica anatomopatológica se realizó de acuerdo entre los dos patólogos jefes de ambos laboratorios.

Estas piezas de conización fueron fijadas en formol y

luego se incluyeron en parafina.

Procedimiento de extracción de ácido desoxirribonucleico

La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de las muestras se realizó en el laboratorio ATGen SRL.

Para cada muestra se desparafinaron diez cortes de 6 micras del tejido embebido, utilizando un promedio de tres lavados sucesivos de xilol mediante centrifugación. Se utilizaron cuchillas descartables individuales para cada una de las piezas de conización estudiadas.

El precipitado se lavó dos veces en alcohol absoluto y se resuspendió en 500 µl de tiosianato de guanidina 4M y se incubó 10 minutos a 56°.

Para la extracción del ADN se utilizó el método convencional de fenol/cloroformo descrito por Sambrook J⁽¹²⁾ en 700 µl de fenol-cloroformo 1:1, centrifugando a máxima velocidad. La fase acuosa se separó en un tubo limpio y se adicionó igual volumen de isopropanol al 100% y centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos, el precipitado fue lavado por centrifugación dos veces en etanol 70% para luego resuspenderlo en 50 µl de agua milliQ.

Valoración de la aptitud del ADN para ser amplificado por PCR

Dos µl de ADN fueron utilizados como molde para reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando como agente intercalante Sybr green y el aparato Rotor Gene 3000 de Corbett Research. La ausencia de inhibidores y la aptitud de ADN extraído para ser amplificado se corroboró tras amplificar un fragmento de 230 pb del gen de beta globina humana.

Aquellas muestras que resultaron positivas para beta globina humana se introdujeron en el protocolo de investigación de la presencia de ADN de HPV.

En las que resultaron negativas se realizaron nuevas extracciones.

Investigación de la presencia de ADN de HPV

Se realizó por PCR en tiempo final utilizando los iniciadores GP5 y 6⁽¹³⁾ para determinar la presencia de ADN de HPV.

Para determinar el tipo de HPV se utilizaron oligonucleótidos iniciadores de la PCR específicos para cada genotipo⁽¹⁴⁾.

Cada reacción de PCR se realizó utilizando en la mezcla de reacción 5 µM de cada oligonucleótido iniciador de la PCR en 2,5 µM de dNTPs, cinco unidades de Taq ADN polimerasa en 25 µl finales de buffer de PCR.

Cinco µl del producto de PCR se mezclaron con igual volumen de buffer de carga y se sembraron en geles de acrilamida al 6%. Se migraron a 150 V por aproximadamen-

te 45 minutos (hasta que el azul de bromofenol del buffer de carga llegó al final del gel) y se colorearon con nitrato de plata según Sanguinetti y colaboradores (1994)⁽¹⁵⁾.

Investigación de posibles inhibiciones de la PCR

Todos los casos negativos obtenidos para cada tipo fueron sometidos a una segunda PCR, idéntica a la anterior, conteniendo 1 µl de ADN sintético del genotipo de HPV que se proponía analizar.

Métodos estadísticos

Se calcularon los intervalos de confianza binomiales para las proporciones de los distintos subtipos de HPV.

Resultados

El procedimiento de detección y tipificación del ADN de HPV se realizó sobre 50 piezas de conización quirúrgica, de las cuales se pudo obtener material para su estudio en 49.

La muestra integró piezas quirúrgicas de mujeres entre 25 y 54 años (media: 37,6 años, desvío estándar: 7,96).

Se detectó la presencia de ADN de HPV en 39 de las 49 (80%) piezas de conización estudiadas (tabla 1).

El tipo viral hallado con mayor frecuencia fue el tipo 16 en 23 de los casos (47%, de lo cuales en 18 casos no se presentó con ninguno de los otros subtipos de alto riesgo

analizados), seguidos por el tipo 33 con siete casos (14%) y el tipo 31 en dos casos (4%). Se destaca la ausencia del tipo HPV 18 (tabla 2, figura 1).

No se encontraron diferencias significativas en la edad de las pacientes para los diferentes tipos de HPV.

A su vez, dentro de las 39 piezas de conización que se encontró ADN de HPV, 22 fueron infecciones por un solo tipo de HPV investigado (56,4%) mientras que cinco fueron infecciones mixtas (12,8%) y 12 (30,8%) se correspondieron a otros tipos de HPV diferentes de los investigados (tabla 3).

Discusión

Se comprobó la asociación entre displasias severas y carcinoma in situ de cuello uterino con la presencia de ADN de HPV en 80% de los casos investigados. Este hallazgo está de acuerdo con lo encontrado por otros investigadores^(8,16), mientras que el ADN de HPV se encuentra entre 95% a 100% de las muestras de cáncer invasor y entre 5% a 20% de las muestras de mujeres sin patología cervical demostrable⁽¹⁶⁾. Dentro de los tipos de alto riesgo investigados el hallado con mayor frecuencia fue el tipo 16, en 23 de las piezas estudiadas, 47% (32,5-61,7); seguidos por el 33, 14% (5,9-27), y el 31 en 2,4% (2,26-19,60). Esto concuerda con los hallazgos comunicados con anterioridad⁽⁹⁾. Aunque en una revisión extensa realizada por Insinga⁽¹⁷⁾, la frecuencia al HPV 31 fue mayor que la encontrada en esta casuística.

Tabla 1. Presencia de ADN de HPV en la muestra analizada

	Número de casos	% (Intervalo de confianza 95%)
Negativo al HPV	10	20 (10,3-34,4)
Positivo al HPV	39	80 (65,6-89,7)
Total de muestras	49	100
HPV: virus del papiloma humano		

Tabla 2. Frecuencia de los tipos de HPV investigados

	Número de casos	% (Intervalo de confianza 95%)
Positivo al HPV16	23	47 (32,5-61,7)
Positivo al HPV18	0	00 (0,0-7,2)
Positivo al HPV 31	2	04 (2,26-19,60)
Positivo al HPV 33	7	14 (5,9-27)
Positivo a HPV no analizados	12	24 (13,3-38,8)
HPV: virus del papiloma humano		

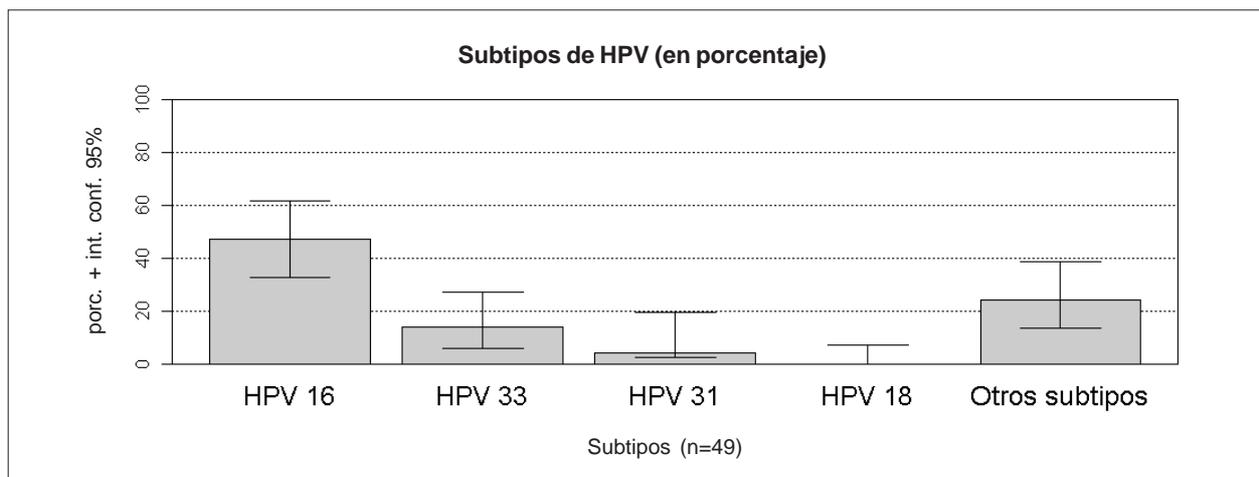


Figura 1. Frecuencia relativa de los tipos de HPV investigados. Intervalo de confianza 95%

Tabla 3. Infecciones únicas o mixtas según el tipo de HPV analizados

	Número de casos	% (Intervalo de confianza 95%)
Positivo a HPV 16 o 18 o 31 o 33 en forma única o en forma mixta con HPV no analizados	22	56,4 (39,6-72,1)
Positivo a HPV mixto entre 16 o 18 o 31 o 33	5	12,8 (4,3-27,4)
Positivo a HPV no analizados	12	30,8 (17,0-47,5)
Total	39	100

HPV: virus del papiloma humano

No se detectó el tipo viral 18 en ninguna de las 49 piezas de conización investigadas (Int. conf.: 0-7,2). Este hallazgo de menor prevalencia del HPV 18 en H-SIL concuerda con lo comunicado por otros investigadores⁽⁹⁾, y en la revisión realizada por Insinga⁽¹⁶⁾ encontró cuatro publicaciones con números reducidos de casos que tampoco encontraron el HPV 18; es posible que el tipo viral 18 tenga una menor prevalencia dentro de las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino de las mujeres uruguayas, pero hay que tener en cuenta el tamaño muestral considerado. Estos resultados requieren confirmación con un estudio de mayor tamaño.

Recientemente, Wheeler y colaboradores⁽¹⁸⁾ comunicaron que en una muestra de carcinomas in situ y adenocarcinomas in situ encontraron una prevalencia de HPV de 97,1%, mayor que el 91% encontrado en los carcinomas invasores. Encontraron el HPV 16 como tipo más frecuente (56,3%) en los carcinomas in situ seguidos por el HPV 31 (12,6%), HPV 33 (8,0%) y el HPV 18 (5,9%).

El HPV 16 es el tipo viral que con más frecuencia da infecciones persistentes y estas son las que tienen mayor

riesgo de evolución al cáncer de cuello uterino invasor⁽¹⁹⁾.

En 12 casos se detectó la presencia de ADN de HPV en las piezas de conización que no se correspondía con ninguno de los tipos investigados. Esto podría significar que puede haber otro tipo de HPV que no se corresponde con los investigados y que puede estar relacionado con las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino de esta muestra analizada. No fue posible realizar la secuenciación de estas 12 muestras de ADN a los efectos de determinar el tipo o las variantes de HPV detectadas.

La mayor limitante de este trabajo es su pequeño tamaño muestral, por lo que es conveniente que estos resultados sean confirmados por un estudio de mayor tamaño.

Es de destacar que no existe bibliografía nacional que aporte información sobre los tipos de HPV que prevalecen en H-SIL. La bibliografía internacional brinda datos de prevalencia en el cáncer invasor y en las lesiones precancerosas que son concordantes con los tipos hallados en esta casuística^(8,9,16,18,20-22).

En los últimos años aparecieron dos herramientas muy importantes que seguramente van a cambiar las estrate-

gias de prevención del cáncer de cuello uterino. Una de ellas es la vacunación profiláctica contra el virus HPV en las niñas y adolescentes, y la otra es la detección de infecciones por HPV persistentes por los tipos virales carcinogénicos. Para estimar el impacto que tendrán estas dos herramientas es muy importante la realización de estudios epidemiológicos en las mujeres uruguayas. El conocimiento de la prevalencia de los tipos de HPV en las lesiones precancerosas es un aporte en esa dirección.

La alta prevalencia hallada del HPV 16 en esta muestra de lesiones precancerosas de cuello uterino de mujeres de Uruguay, junto con los resultados de ensayos clínicos que muestran que las vacunas profilácticas contra el HPV 16 y 18 tienen una alta eficacia para prevenir las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino, hacen suponer que la implementación de la vacunación profiláctica contra el HPV podría tener un fuerte impacto sobre la aparición de nuevos casos de cáncer en la población vacunada.

Conclusión

Se demostró la frecuente asociación entre infección por HPV y las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino. Dentro de los cuatro tipos de HPV investigados y descritos como más frecuentes en otras regiones, se detectó con mayor frecuencia el tipo 16 al igual que lo ocurrido en otras regiones del mundo.

Se destaca la ausencia del tipo viral 18 en las muestras estudiadas.

La presencia de los tipos virales 31 y 33 le siguen en frecuencia al HPV 16 como la encontrada en otras comunicaciones.

Summary

Introduction: severe dysplasia and carcinoma-in-situ (CIN) is actually the first grade of uterine cervical cancer. HPV infection constitutes an important etiological factor for the origin of High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (H-SIL) and uterine cervical epidermoid cancer.

Objective: to determine the prevalence of HPV types that are described as more frequent in other regions, from a sample of Uruguayan women carriers of severe dysplasia and uterine cervix carcinoma in situ, with diagnosis confirmed by the histological study of surgical conization pieces.

Method: we selected a sample of surgical conization pieces from women who were carriers of severe dysplasia and intraepithelial epidermoid cancer of the uterine cervix in Montevideo and Canelones. Pieces were fixed in formol and then embedded in paraffin.

Results: we identified the presence of HPV deoxyribonucleic acid (DNA) in 39 out of 49 patients (80%). The

most common type of virus found was HPV 16 in 23 of cones (47%), followed by HPV 33, found in seven cases (14%). We stand out the absence of HPV 18 in this sample.

Conclusion: we proved the usual association between HPV infections and precursor lesions to uterine cervical cancer. Among the four types of HPV studied and described as more common in other regions, we identified HPV 16 as the most common, the same as it happens in other parts of the world.

Résumé

Introduction: les dysplasies sévères et les carcinomes in situ sont les vrais précurseurs du cancer du col de l'utérus. L'infection par le virus du papillome humain (HPV) est un facteur étiologique important à l'origine des lésions intra épithéliales squameuses de haut degré (H-SIL) et le cancer du col de l'utérus de type épidermoïde.

Objectif: déterminer la prévalence des types de HPV décrits selon leur fréquence dans d'autres régions, dans un échantillon de femmes uruguayennes porteuses de dysplasies sévères et carcinome in situ du col de l'utérus, avec diagnostic confirmé par étude histologique de pièces de conisation chirurgicale.

Matériel et méthode: on fait un prélèvement de pièces de conisation chirurgicale de femmes porteuses de dysplasies sévères et carcinomes intra épithéliaux épidermoïdes du col utérin, originaires de Montevideo et de Canelones. Les pièces sont fixées en formol, puis incluses en paraffine.

Résultats: 39 sur 49(80%) ont révélé présence d'acide désoxyribonucléique (ADN) de HPV.

Le type viral le plus fréquent fut le HPV 16 en 23 cônes (47%), puis sept cas (14%) du type 33 et deux cas(4%) du type 31. On signale l'absence du type HPV 18.

Conclusion: la fréquente association entre infection par HPV et les lésions qui préconisent le cancer du col de l'utérus fut prouvée. Parmi les quatre types de HPV étudiés et décrits comme les plus fréquents dans d'autres régions du monde, le type 16 fut aussi le plus fréquent.

Resumo

Introdução: as displasias severas e os carcinomas in situ são os verdadeiros precursores do câncer de colo uterino. A infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) é um fator etiológico importante na origem das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (H-SIL) e o câncer de colo uterino de tipo epidermoide.

Objetivo: determinar a prevalência dos tipos de HPV descritos como mais frequentes em outras regiões, em uma amostra selecionada de mulheres no Uruguai portadoras de displasias severas e carcinoma in situ de colo uterino,

com diagnóstico confirmado pelo exame histológico de material obtido por conização cirúrgica.

Material e método: uma amostra de peças de conização cirúrgica realizadas a mulheres de Montevideu e Canelones portadoras de displasias severas e carcinomas intraepiteliais epidermóides de colo uterino foi selecionada. As peças foram fixadas em formol e posteriormente incluídas em parafina.

Resultados: em 39 das 49 (80%) amostras foi detectada a presença de ácido desoxirribonucléico (ADN) de HPV. O tipo 16 de HPV foi encontrado em 23 dos cones (47%), seguido pelo tipo 33 com sete casos (14%) e o tipo 31 em dois casos (4%). Nesta amostra o tipo HPV 18 não foi detectado.

Conclusão: a associação entre infecção por HPV e lesões precursoras de câncer de colo uterino foi demonstrada. Dos quatro tipos de HPV pesquisados e descritos como freqüentes em outras regiões, o tipo 16 foi o que apresentou maior freqüência como em outras partes do mundo.

Bibliografía

1. **Vasallo JA, Barrios E.** III Atlas de mortalidad por cáncer en el Uruguay. Comparación de dos quinquenios 1994-1998 y 1999-2003. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer; 2005.
2. **National Cancer Institute Workshop.** The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 1989; 262(7): 931-4.
3. **Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al.** The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16): 2114-9.
4. **Ostor G.** Natural history of cervical Intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12(2): 186-92.
5. **Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, ShahKV, et al.** Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1): 12-9.
6. **Muñoz N, Castellsagué X, Berrington A, Gissman L.** Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3): S1-10.
7. **Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah K.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4): 244-65.
8. **Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S.** Comparison of HPV type distribution in high grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89(1): 101-5.
9. **Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa L.** Chapter 3: HPV type distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3: S26-34.
10. **Cuschieri K, Cubie H, Whitley M, Gilkinson G, Arends, Graham C, et al.** Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol* 2005; 58(9): 946-50.
11. **Solomon D.** Role of triage testing in cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; (31): 97-101.
12. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2a ed. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
13. **De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ.** The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76(Pt 4):1057-62.
14. **Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, et al.** Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3): 745-47.
15. **Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ.** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17(5): 914-21.
16. **International Agency for Research on Cancer.** International Agency for Research on Cancer-Cervical cancer screening. IARC Handbooks of cancer prevention Nro. 10. Lyon: IARC; 2005.
17. **Insigna R, Liaw K, Johnson L, Madeleine M.** A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(7): 1611-22.
18. **Wheeler C, Hunt W, Joste N, Key C, Quint W, Castle P.** Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(7): 475-87.
19. **Sigurdson K, Taddeo F, Benediktsdottir K, Olafsdottir K, Sigvaldason H, Oddsson K, et al.** HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: a population-based study. *Int J Cancer* 2007; 121(12): 2682-7.
20. **Smith J, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al.** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high grade cervical. Lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121(3): 621-32.
21. **Koshiol J, Lindsay L, Pimenta J, Poole C, Jenkins D, Smith J.** Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168(2): 123-37.
22. **Maucort-Boulch D, Franceschi S, Plummer M.** International correlation between human papillomavirus prevalence and cervical cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(3): 717-20.