

Tipificación de virus de papiloma humano en lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cérvix

Drs. María Pacheco¹, Hugo Calderas¹, Indalecio Rivero¹, Lic. Ana Briceño², Norelis Tineo³

Hospital Universitario "Dr. Pedro Emilio Carrillo" Departamento de Obstetricia y Ginecología
Posgrado de Obstetricia y Ginecología. Valera, Estado Trujillo

RESUMEN

Objetivo: Determinar los tipos de virus papiloma humano mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa en lesiones preneoplásicas (neoplasia intraepitelial cervical I, II, III) y neoplásica (cáncer in situ), en pacientes que acudieron a la consulta de patología cervical.

Métodos: Estudio descriptivo transversal, no experimental y de campo, se evaluaron 102 pacientes de la consulta de patología cervical, de las cuales 42 pacientes se incluyeron en el estudio, se les practicó una entrevista y luego una toma de exfoliado cervical por la técnica de hisopado, que fueron recogidas en un tubo recolector, para ser procesados en el laboratorio clínico e inmunodiagnóstico BRIMED C. A. mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa.

Resultados: Mediante reacción en cadena polimerasa para virus papiloma humano dieron positivo en 24 pacientes, mayormente entre las edades de 34 a 39 años con 7 pacientes, el genotipo 6 fue el más común con un total de 12 de pacientes, siendo la neoplasia intraepitelial cervical I el tipo de lesión cervical más afectada con 5 pacientes en este grupo, mientras que solo 10 pacientes dieron positivo para genotipo de riesgo alto, siendo el más común el de otro genotipo con un total de 7 pacientes, obteniéndose la cervicitis y la neoplasia intraepitelial cervical II como las lesiones cervicales más afectadas con 2 pacientes en cada grupo.

Conclusiones: La técnica por reacción en cadena de polimerasa para virus papiloma humano obtuvo una sensibilidad de 57,1 % y especificidad de un 42,9 % en este estudio, siendo el genotipo 6 de bajo riesgo el más frecuente en total, el de riesgo intermedio fue habitual en solo 2 pacientes y el de riesgo alto, el más común fue el de otro genotipo con un total de 7 pacientes, mientras que el genotipo 16 fue el menos frecuente. Asimismo, la relación del virus papiloma humano con el grupo etario se ubicó frecuentemente entre las edades de 34 a 39 años, y en relación al tipo de lesión cervical la neoplasia intraepitelial cervical I fue la más común.

Palabras clave: Virus papiloma humano. Reacción en cadena de polimerasa. Genotipo. Neoplásica. Neoplasia intraepitelial cervical. Cáncer in situ.

SUMMARY

Objective: To determine the type of virus human papillomavirus by the technique of polymerase chain reaction in premalignant lesions (NIC I, II, III) and neoplastic (cancer in situ) in patients who attended the consultation cervical pathology.

Methods: Not experimental and field, cross-sectional study of 102 patients with cervical pathology consultation, of which 42 patients were included in the study and, she underwent an interview and then a decision by the exfoliated cervical swab technique, which were collected in a collecting tube to be processed in the clinical laboratory and immunodiagnostic BRIMED CA by polymerase chain reaction.

Results: Using polymerase chain reaction were positive for human papillomavirus 24 patients, mostly between the ages of 34 to 39 with 7 patients, genotype 6 was the most common with a total of 12 patients being the NIC I the type of neck injury more affected with 5 patients in this group, while only 10 patients tested positive for high-risk genotype, the most common being that of another genotype with a total of 7 patients, obtaining cervicitis NIC II and neck injuries as most affected 2 patients in each group.

Conclusions: Human papillomavirus polymerase chain reaction technique had a sensitivity of 57.1 % and specificity of 42.9 % in this study, with the low risk genotype 6 the most common in all, the intermediate risk was common in just 2 patients and high risk, the most common was that of another genotype with a total of 7 patients, while genotype 16 was the least frequent. Likewise, the ratio of the age group human papillomavirus is frequently ranked among the ages of 34-39 years and in relation to the type of cervical lesion NIC I was the most common.

Key words: Human papillomavirus. Polymerase chain reaction. Genotyping. Neoplastic. NIC. Cancer in situ.

¹ Especialistas en Obstetricia y Ginecología.

² Licenciada en Bioanálisis. Maestría de Inmunología. Representante laboratorio clínico e inmunodiagnóstico BRIMED. C.A.

³ Adjunto al Departamento de Pediatría, Servicio de Neonatología.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela el cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública, con una incidencia del 25,54 %, seguida de cáncer de mama (16,42 %) y cáncer de colon y recto (7,03 %), siendo la primera causa de muerte oncológica en las mujeres venezolanas para el año 2009 (1). Sin embargo, para el año 2010 según lo publicado por el Ministerio Para el Poder Popular de la Salud (MPPS) reporta 1 697 muertes por tumores malignos de la mama superando la cifra de mortalidad por tumor maligno de cuello uterino con 1 238 muertes (2), por consiguiente, el cáncer de cuello uterino es actualmente la segunda causa de muerte oncológica en mujeres venezolanas.

Estudios epidemiológicos realizados en países desarrollados y en vías de desarrollo, presentan indicios de que los virus genotipo específicos del virus papiloma humano (VPH) se encuentran asociados a la patogénesis de lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) y al cáncer invasor cervicouterino, igualmente, se ha demostrado que la progresión de LIE a cáncer invasivo suele estar asociada a la infección viral persistente por VPH (1). Asimismo, según lo publicado por Molano y col. (3) en un estudio realizado por Walboomers y col. en el año 1999, encontró VPH en el 99,7 % de mujeres con cáncer de cuello uterino, lo cual permitió establecer que el VPH es causa necesaria para el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, se ha identificado el ácido desoxirribonucleico (DNA) de VPH en 10 % a 50 % de pacientes con citologías normales, lo que indica que algunas de las pacientes infectadas por VPH no desarrollan cáncer cervical, sugiriendo que se requieren eventos adicionales para la transformación neoplásica. Se ha propuesto como factores importantes que propician la progresión, la persistencia de la infección, el estado inmunológico del huésped y la habilidad que posee el virus de expresar determinados genes por tiempo prolongado, independientemente de que la infección tenga manifestaciones clínicas o subclínicas (1,4).

Por otro lado, el conocimiento de la distribución de los distintos genotipos de VPH, es información de gran importancia para introducir la vacuna en Venezuela, pues actualmente en el país y mediante el esfuerzo de distintos grupos de investigadores, se ha establecido en diferentes zonas de nuestra geografía, la prevalencia de la infección de VPH en la población femenina, Cavazza y col. (5) determinaron que en

la zona Oriental está presente en un 85 %; mientras que en la zona Occidental lo hace en un 40 % y en el área metropolitana se halla en un 67 %. Además, observaron una alta prevalencia de VPH de alto riesgo oncogénico que alcanza un 70 %, asociado a lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEbg) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEag). Un hallazgo, importante fue la observación de un 45 % de muestras positivas para VPH de genotipos de alto riesgo oncogénico y citología normal, y la demostración de que el genotipo de mayor circulación en Venezuela es el VPH del tipo 16, que a su vez, representa uno de los genotipos con mayor potencial oncogénico (6). Así pues, es pertinente ofrecer la tipificación del VPH en la consulta de patología cervical del Hospital Universitario “Dr. Pedro Emilio Carrillo”, de Valera, Estado Trujillo en la que existe un número de pacientes con lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el cérvix, con citologías que únicamente permiten sugerir la presencia de infección por VPH, pero que hasta ahora no ha sido posible hacer la detección certera del virus, indicar si hay infección viral mixta y determinar los genotipos involucrados en esta geografía.

El método convencional para la pesquisa de cáncer de cuello uterino ha sido la citología cervicovaginal y su interpretación se realiza sobre la base de la clasificación de Bethesda, detectando las alteraciones celulares causadas por el virus del VPH. Como método de diagnóstico es utilizado la colposcopia realizada con los test de Hiselmann y de Schiller, que permite la identificación de lesiones precursoras de cáncer de cuello uterino y aumentando la sensibilidad de la citología, siendo el diagnóstico definitivo de lesiones precancerosas con biopsia dirigida (6). Por tal motivo, en el Hospital Universitario “Dr. Pedro Emilio Carrillo”, Valera, Edo. Trujillo, en el año 2013, se realizó una investigación en la consulta de patología cervical, con el propósito de demostrar y analizar la correlación entre los hallazgos en citología cervical, colposcopia y biopsia reportando un elevado porcentaje de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I, en comparación al Cáncer (Ca) *in situ*, con un posterior repunte en el aumento de cáncer infiltrante, por lo que pareció que la causa de este comportamiento, es la falla en el engranaje del equipo multidisciplinario, en la cadena de seguimiento a pacientes reportadas inicialmente con lesiones pre malignas (7).

En Venezuela y en diversos países han investigado la presencia del VPH y los genotipos de alto riesgo, para iniciar medidas preventivas como por ejemplo la

TIPIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

aplicación de la vacuna dependiendo de la frecuencia de los virus.

Melo y col. (8), realizaron un estudio donde determinaron la presencia y frecuencia de los genotipos virales en muestras de cuello uterino con lesiones preneoplásicas y neoplásicas, mediante la técnica de PCR en 175 biopsias; detectando el VPH en 40 % de los casos sin lesión histológica, 88 % en lesiones de bajo grado, el 89 % en las lesiones de alto grado y 93,5 % en el carcinoma invasivo. De todos los casos de VPH positivos, el 89,5 % fueron clasificados como de alto riesgo y solo un 4,9 % de los casos de VPH eran de bajo nivel de riesgo. El 6 % de los casos tenían múltiples infecciones. La distribución de los genotipos virales fue: genotipo 33 (25,3 %), 16 (18,7 %), 52 (13,3 %), 31 (12 %), 35 (6,6 %), 18 (2,7 %). Por lo que concluyeron, que la mayoría de VPH que se encuentran en las biopsias con LIEag era de genotipo de alto riesgo, los tipos virales más frecuentes fueron: 16, 31, 33 y 52, y que la detección y tipificación viral pueden proporcionar información valiosa para la selección de pacientes y el seguimiento y para la asignación de los recursos.

Inclusive, Lugo (9), efectuó un trabajo de investigación utilizando como población aquellas pacientes que acudieron a la consulta de patología cervical con diagnóstico histopatológico de VPH relacionados con NIC I, II, III, cáncer *in situ* no tratadas; con una muestra de 20 pacientes. El 65 % de las pacientes tipificadas tienen diagnóstico histopatológico de NIC I, el 50 % de los genotipos resultó ser de un genotipo indeterminado, el 25 % positivo para el genotipo 6 y el 15 % para el 11. El factor de riesgo más relevante fue el antecedente de infecciones genitales (70 %), siendo el genotipo indeterminado el más frecuente con un 90 %. Los síntomas manifestados con más frecuencia fueron leucorrea y prurito genital en un 5 % y 45 % respectivamente, asociándose a infecciones por el genotipo indeterminado y el 6. Con respecto al examen ginecológico según los genotipos de VPH tipificados resultaron en que el 85 % de la muestra tenía colposcopia positiva, siendo solamente el genotipo 16, 100 % presente.

También, Suárez y col. (4) ejecutaron un estudio donde incluyeron a 53 pacientes con diagnóstico de cáncer de cuello uterino entre abril de 2004 y noviembre de 2005. La mayoría de las pacientes tenían diagnóstico de cáncer localmente avanzado (43,18 % estadio IIb, 40,90 % estadio IIIb y 2,27 % estadio IVa). El tipo histológico predominante fue carcinoma

epidermoide en 86,36 %, seguido de adenocarcinoma en 11,36 % y carcinoma adenoescamoso en 2,27 %. Evidenciaron la presencia de secuencias de ADN asociados a virus del papiloma humano en 28 pacientes (52,83 %). Identificaron las secuencias de ADN asociadas a virus del papiloma humano 16 en 13 pacientes (24,52 %), el 18 en 4 pacientes (7,54 %), 31 en 3 (5,66 %), 6 en 2 (3,77 %) y el 11, 33 y 35 en un caso respectivamente (1,88 %). Concluyen que la tipificación del virus del papiloma humano en estas pacientes no refleja aquellos reportados en otros países y plantearon la necesidad de realizar estudios epidemiológicos a gran escala que incluyan otros tipos de alto riesgo.

Pero, Susana y col. (10) elaboraron un trabajo con el objetivo de evaluar la frecuencia de los diferentes genotipos de VPH en lesiones cervicales cancerosas y preinvasoras; en esta detección y tipificación del virus utilizaron la reacción en cadena de la polimerasa y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. Todas las mujeres fueron infectadas con el VPH. El 85 % de las muestras se tipificaron, un único genotipo de VPH se encontró en 76 % de las mujeres. El 14 % tenía una infección con múltiples genotipos, y en 10 % el genotipo viral no fue identificado. Los genotipos más frecuentes corresponden a VPH 16, VPH 52 y el VPH 53. Concluyen que existe una alta tasa de infección con el VPH de alto riesgo oncogénico entre estas mujeres.

Mientras, que Quintero y col. (11) realizaron un estudio con la finalidad de estandarizar una técnica de reacción de cadena polimerasa por enzimas de restricción en Tiempo Real (PCR-RFLP) para la detección y tipificación de VPH en mujeres con diagnóstico clínico previo de infección por VPH. El 16,8 % de las muestras presentó VPH de alto riesgo tipos 16, 31, 33, 35, 56, 59 y 68; el 6,8 % presentó VPH de riesgo intermedio tipos 51, 53, 58, 61 y 83; y el 18 % los tipos de bajo riesgo 6, 32, 53, 54, y 81. De esta manera, concluyeron que la técnica PCR-RFLP estandarizada fue adecuada para el diagnóstico y la tipificación de VPH en muestras del área genital. El 51,9 % del total de las muestras resultaron positivas para VPH, siendo VPH 16 el genotipo de alto riesgo más común (20,0 %), y VPH 6 el de bajo riesgo más frecuente (23,8 %).

García (12), realizó un estudio de investigación donde se analizaron 99 muestras: 45 (45,45 %) lesiones de bajo grado, 28 (28,28 %) lesiones de alto grado y 26 (26,26 %) de cáncer invasor. El resto de virus detectados según su orden de frecuencia: 58,

18, 59, 53, 31, 51, 39, 56, 33, 66 y 52. Concluyó que los VPH de alto riesgo están presentes en todos los casos de cáncer de cérvix y el VPH tipo 16 es el más frecuente. Recomiendan, especialmente a las autoridades máximas de salud de su país, para gestionar la vacunación contra el VPH, porque protegería contra el VPH 16 y 18.

Martínez (13) realizó un trabajo donde encontró en los pacientes evaluados: 3 genotipos de VPH: 6, 11 y 18, el más común fue el VPH genotipo 11. En total, de 102 pacientes evaluados hubo 23 hombres y 20 mujeres infectados (42,16 %); en cuanto a los resultados negativos: 29 mujeres y 21 hombres (49,02 %), los nueve pacientes restantes (8,82 %) son casos sin determinar por material insuficiente o degradación del producto amplificado. La mayoría de las infecciones virales con 2 o más genotipos fueron solo observados en mujeres. Encontraron también una prevalencia mayor de la infección viral de 14 parejas (33,33 %), donde la mujer era negativa y el hombre positivo. En cuanto a los resultados de amplificación y los encontrados en biopsias, citología y colposcopias, los mismos no fueron concordantes. Con respecto a los factores de riesgo solo el consumo de café resultó ser estadísticamente significativo. Concluyen que el VPH genotipo 18 y las combinaciones de dos o más genotipos virales fueron encontradas exclusivamente en mujeres, mientras los VPH de bajo riesgo genotipo 6 y 11 se encontraron tanto en hombres como en mujeres.

Ríos y col. (14) realizaron un estudio con el objetivo de determinar los tipos de VPH presentes en muestras de tumores de cáncer de cérvix en mujeres cubanas, así como describir el comportamiento de diferentes factores de riesgo asociados a esta enfermedad. El genotipo 16 fue el más prevalente, seguido por el 18, 45, 31, 39, 51, 56, 59. No encontraron en ninguna de las muestras los tipos de bajo riesgo 6 y 11. El conocimiento de los tipos virales presentes en los tumores del cérvix uterino en las pacientes es importante a la hora de plantearse el desarrollo y uso de vacunas tanto profilácticas como terapéuticas.

Y por último, Abreu (7) realizó un trabajo de investigación con el propósito de demostrar y analizar la correlación entre los hallazgos en citología cervical, colposcopia y biopsia dirigida donde el mayor porcentaje de resultados de citología cervicovaginal alteradas fue de un 47,33 %, siendo el reporte de mayor frecuencia LIebg en 76 pacientes y específicamente en 38 pacientes del grupo etario entre 35 y 49 años. Con respecto a la colposcopia por grupo de

edad, encontró que en el 47,1 %, los hallazgos son normales, frente a 43,8 % con hallazgos anormales. Igualmente, analizaron las biopsias dirigidas de cuello uterino, el cual el porcentaje más alto, corresponde al grupo etario entre 35 y 49 años, representado por el 46,0 % con hallazgo anormal frente al 42,9 % que fue normal. Por lo que la correlación entre resultado normal de colposcopia, citología y biopsia dirigida de cuello uterino por grupo etario fue del 47,1 %, en el grupo de 35 a 49 años de edad. Concluyen que la base de la pirámide resume desde el punto de vista epidemiológico, en cuanto la morbilidad apreciada en el elevado porcentaje del NIC I reportados, en contraposición al mínimo reporte de cáncer *in situ*, con posterior repunte en el aumento de cáncer infiltrante.

Los cambios en el cuello uterino son con frecuencia causados por una infección con el virus del papiloma humano. De hecho, casi todos los cánceres de cuello uterino (más del 99 %) están relacionados con el VPH (15).

Considerando, que los papiloma virus son virus pequeños y sin envuelta, constituidos por dos proteínas estructurales, ambas codificadas por el virus, que se unen y estabilizan la cápsida mediante puentes disulfuro (la proteína mayor L1, que tiene un peso molecular de 5 %Kd y representa el 80 % del total de la cápsida, cada cápsomero presenta 5 copias idénticas y; la proteína menor L2, que está en menor proporción que L1 y tiene un peso molecular de aproximadamente de 75 Kd) (17).

A partir de un promotor temprano (PE) se generan las proteínas virales tempranas: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que son proteínas no estructurales, relacionadas con el control de la replicación, la transcripción y la expresión genética del virus. Su expresión está estrechamente regulada tanto por factores celulares específicos de tejido, como por las propias proteínas virales. Mientras que los genes de expresión tardía, se expresan en las células diferenciadas del epitelio a partir de un promotor tardío (PL) para sintetizar las proteínas estructurales de la cápsida viral: L1 y L2 (17).

Ahora bien, la infección por papiloma virus ocurre a través de abrasiones en el epitelio, que exponen las células de la capa basal a la entrada de las partículas virales. Una vez en el interior, el ciclo del virus está íntimamente unido al programa de diferenciación de las células y aprovechando la maquinaria celular se replica y se propaga. Se puede hablar de infección productiva, cuando el virus expresa los genes tempranos en las capas basal y parabasal y los genes tardíos en las capas suprabasales, de manera paralela

a la maduración del epitelio cervical dando lugar a la producción de partículas infecciosas; y de infección latente (persistente) cuando el virus permanece en el núcleo de las células de la capa basal replicándose como un plásmido multicopia estable (episoma) pero sin la producción de virus infeccioso. Solo bajo la influencia de ciertos factores endógenos y exógenos (inmunodepresión local o general) no demasiado conocidos todavía, esta latencia evoluciona a infección productiva (17).

El VPH se clasifica en relación con su asociación con cáncer cervical y lesiones precursoras y se dividen en tipos de bajo riesgo: 6, 11, 42, 43, y 44. Los tipos de alto riesgo: el 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82. Y los de riesgo intermedio: 26, 30, 61 y 64 (4,5).

El modo de transmisión del VPH genital se transmite principalmente mediante el contacto directo de piel a piel durante el sexo vaginal, oral o anal. No se propaga a través de la sangre o fluidos corporales. De hecho, la transmisión mediante contacto genital sin penetración (sin coito) no es común, pero puede ocurrir. En cuanto a la transmisión del virus de una madre a hijo durante el parto es poco común, pero puede ocurrir y causar verrugas en las vías respiratorias (tráquea y bronquios) y los pulmones, causándole papilomatosis respiratorias (18).

Entre los factores de riesgo para adquirir el virus se encuentra la paridad, número de parejas sexuales, tener menos de 25 años de edad, uso de anticonceptivos orales por más de 5 años, hábitos tabáquicos, iniciar relaciones sexuales a una edad temprana (16 años o menos) y en mujeres que tienen una pareja que ha tenido numerosas parejas sexuales diferentes y/o que su pareja masculina que no ha sido circuncidado (4,17).

Para el diagnóstico se encuentra la historia clínica: anamnesis y examen físico; citología; colposcopia; biopsia y estudios: como la microscopia electrónica, inmunohistoquímica, los métodos de detección de ADN (*southern blot*, filtros de hibridación, solución de hibridación con detección enzimática, hibridación *in situ* y PCR) (9).

Con respecto a la citología, es un procedimiento para detectar células atípicas en el frotis del cuello uterino y así se pueden detectar precozmente lesiones precursoras del carcinoma invasor (15). Mientras que la colposcopia se emplea para el examen visual del cuello uterino bajo aumento como auxiliar en el diagnóstico de las neoplasias cervicales. La indicación más común para la colposcopia es un resultado positivo en las pruebas de tamizaje por ejemplo,

citología positiva. Un elemento clave del examen colposcópico es la observación de las características del epitelio cervical después de la aplicación sucesiva de solución salina isotónica, solución de ácido acético del 3 % al 5 % y solución yodoyodurada de Lugol. Las características de los cambios acetoblanos en el cuello uterino después de la aplicación del ácido acético diluido son útiles en la interpretación de la colposcopia y para dirigir las biopsias. Los cambios de color del cuello uterino tras la aplicación de solución yodoyodurada de Lugol dependen de la presencia o ausencia de glucógeno en las células epiteliales (16).

Aunado a ello, mediante la biopsia la lesión por virus papiloma consiste en hiperplasia del epitelio con papilomatosis, acantosis, queratinización de células aisladas, células binucleadas y una forma característica de citolisis parcelar en las células intermedias: la coilocitosis, que no son otra cosa que células con citoplasma de aspecto vacío y núcleo retraído, oscuro, a menudo excéntrico, sin aumento de la relación núcleo-citoplasma. En esta fase el ADN viral flota en el núcleo constituyendo el episoma y hace que se manifieste histológicamente sobre todo por coilocitosis (que representa la fase productiva de infección viral), y como neoplasia intraepitelial cervical, que si afecta más allá del tercio inferior del epitelio corresponde a una neoplasia intraepitelial cervical I (NIC I). Cuando son más acentuadas y abarcan hasta los dos tercios basales del epitelio, se trata de una neoplasia intraepitelial cervical II (NIC II). Cuando son aún más acentuadas y comprometen más allá de los dos tercios inferiores del epitelio, pero no todo el espesor, la lesión corresponde a una neoplasia intraepitelial cervical III (NIC III) y cuando compromete el 100 % del espesor sin ningún signo de maduración de las células hacia los estratos superiores, se trata de un carcinoma *in situ* (17).

En relación, con la tecnología disponible para la detección molecular del ADN viral, se cuenta con sistemas de hibridación directa en soporte sólido (hibridación *in situ*), hibridación en soporte líquido (captura de híbridos) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos sintéticos específicos y/o consenso para su aplicación, la cual existe una variante de PCR denominada en Tiempo Real (usado para estudio de VPH) que se basa en la detección de la emisión de fluorescencia durante cada ciclo de amplificación, lo cual permite el monitoreo continuo de la reacción de PCR, y un rayo láser excitador es transmitido a la muestra por una fibra óptica. Es decir, que los procesos

de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior, ya que, la detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación y así la cantidad de ADN formado (19).

Así pues, se comprende que, la detección y tipificación del VPH mediante PCR se ha convertido en los últimos años en una herramienta importante y necesaria para el clínico, para esclarecer y determinar si los cambios neoplásicos del cérvix en determinados casos, pueden estar relacionados etiológicamente con este agente, y que de esta manera, permitirá definir las conductas terapéuticas y de control en los casos que se identifique la presencia del virus dependiendo de su genotipo.

Por lo anteriormente expuesto surgió la inquietud de la realización del siguiente estudio con el objetivo de determinar los tipos de virus papiloma humano mediante la técnica de cadena polimerasa en lesiones preneoplásicas y neoplásica (cáncer *in situ*).

MÉTODOS

Fue un estudio de tipo descriptivo transversal, no experimental y de campo, realizado desde el 01 de noviembre 2013 hasta el 31 de julio 2014 en pacientes que acudieron a la consulta de patología cervical del Hospital Universitario "Dr. Pedro Emilio Carrillo" Valera Estado Trujillo con diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico de VPH asociados a NIC I, II, III y cáncer *in situ*. De igual manera, se les informó a las pacientes de los objetivos y carácter de la investigación, garantizándoles la confiabilidad de los datos que se recolectaron, con previo consentimiento de ellas. Posteriormente, se les aplicó una entrevista estructurada y se procedió a la toma de muestra. Por tal motivo, se incluyeron todas las pacientes con: diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico de VPH asociado a NIC I, II, III y cáncer *in situ*, de cualquier edad. Mientras que se excluyeron las que tenían: antecedente de relaciones sexuales en las 24 horas previas al examen, antecedente de uso de duchas vaginales o lubricantes en las 24 horas previo al examen, antecedente de tratamiento farmacológico vía vaginal de 1 a 6 días previos, paciente con la menstruación o sangrado al momento de tomar la muestra, el uso de ácido acético o lugol para identificar lesiones al momento de tomar la muestra, puérperas y pacientes

con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) positiva.

Se diseñó un instrumento de recolección de datos, que se constituyó en dos partes. La primera parte, contuvo los datos de identificación, donde se plasmó los antecedentes personales, familiares y gineco - obstétricos. Mientras tanto, la segunda parte, estuvo conformada por la citología, colposcopia, biopsia y tipificación mediante PCR.

Se ejecutó el instrumento mediante la entrevista, luego, se procedió a tomarle a cada paciente una muestra de exfoliado cervical por la técnica de hisopado, y fueron recogidas en un tubo recolector, otorgado por el laboratorio clínico e inmunodiagnóstico BRIMED. C. A. RIF: J-31737423-1. Dicha muestra se mantuvo refrigerada (4-8 °C) hasta su envío, sin exceder 72 horas. Posteriormente, se procedió mediante un kit de diagnóstico de alto riesgo para virus del papiloma humano mediante reacción de cadena polimerasa con fluorescencia para la cuantificación del mismo. La amplificación del ADN del virus es detectada como un incremento de la fluorescencia.

Análisis estadísticos

Al obtener la información, se realizó una tabulación de los datos a través del vaciamiento del instrumento de recolección, en una matriz editora de datos del programa informático SPSS; donde se analizaron las variables establecidas utilizando cifras absolutas, porcentuales y medias más desviación estándar, expresándose en tablas.

RESULTADOS

Se incluyeron 102 pacientes de la consulta de Patología cervical, de las cuales se excluyeron 60 correspondientes al 58,8 % ya que cumplían con los criterios de exclusión anteriormente expuestos, por lo que la muestra final se conformó por 42 pacientes (41,2 %). De esa muestra, el mayor número se ubicó entre los 34 a 39 años de edad con 10 pacientes. Entre los factores de riesgo, la menarquía fue entre 12,4 años, con una duración de 4,4 días y un ciclo de 29,4 días, con un inicio de la primera relación sexual a los 17,2 años de edad, y con solo dos embarazos el número de gestas. Con el uso de anticonceptivos orales 38 pacientes (90,48 %) si consumían dicho medicamento,

TIPIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

mientras que en los hábitos tabáquicos 41 pacientes (97,62 %) no poseían el hábito. En relación con los antecedentes oncológicos, 33 pacientes (78,57 %) no tenían familiares con patologías oncológicas.

En cuanto a la citología cervicovaginal por grupo etario (Cuadro 1) el LIEbg fue el más común en un total de 22 pacientes, mayormente entre las edades de 46 a 51 años en 5 pacientes, sin embargo, del LIEag fue sobresaliente entre las edades de 34 a 39 años, con un número de 7 pacientes, con una calidad satisfactoria de la muestra en un 100,00 %, con observaciones positivas de células coilocíticas en 41 muestras (97,62 %).

Con respecto a la colposcopia por grupo etario (Cuadro 2) dieron positivas en 37 pacientes, siendo el mayor número entre las edades de 28 a 33 años con 9 pacientes (24,32 %), mientras que las pacientes con colposcopia negativa fueron ubicadas entre las edades de 34 a 39 años con 3 pacientes (60,00 %). Aportando de esta manera, una sensibilidad de 11,9 % y una especificidad del 88,1 %.

Por su parte, en la biopsia dirigida de cuello uterino por grupo etario, el NIC I fue el más frecuente con un total de 20 pacientes, dispuesto entre las edades de 46 a 51 años con 6 pacientes, y el menos frecuente el cáncer *in situ* con un total de 4 pacientes, ubicado entre las edades de 22 a 33 años con 2 pacientes, y entre 34 a 39 y 46 a 51 años con 1 sola paciente respectivamente. Reportando en 40 pacientes (95,24 %) positivo para células coilocíticas compatible con VPH.

En relación al estudio mediante PCR para VPH por grupo etario (Cuadro 3), reportó que dieron positivo para VPH un total de 24 pacientes, dentro de las cuales el mayor número se encuentra entre las edades de 34 a 39 años con 7 pacientes (29,17 %). Mientras que dio negativo para VPH en 18 pacientes, ubicándose frecuentemente entre las edades de 46 a 51 años con 6 pacientes (33,33 %). Lo que indica que la técnica por PCR para VPH obtuvo una sensibilidad de 57,1 % y especificidad de un 42,9 %.

En cuanto a los genotipos de VPH por grupo etario (Cuadro 5) el genotipo de riesgo bajo (el genotipo 6) fue el más común en un total de 12 pacientes, ubicándose mayormente entre las edades de 34 a 39 años con 4 pacientes. El de riesgo intermedio tuvo un total de 2 pacientes comprendidas entre las edades de 22 a 27 y 28 a 33 años con 1 paciente en cada grupo respectivamente. El de riesgo alto tuvo un total de 10 pacientes, siendo el más común los de otros genotipos en 7 pacientes; mientras que el genotipo 16 fue el menos común con un total de 3 pacientes. Encontrándose mayormente los de otros genotipos entre las edades de 28 a 33 años con 3 pacientes. Mientras que el genotipo 16 se ubicó entre las edades de 34 a 39 años con 2 pacientes y entre las edades de 28 a 33 años con 1 paciente.

Cuadro 1
Citología cervicovaginal por grupo etario

| Edad | LIE bajo grado | LIE alto grado | Total | Total % |
|---------|----------------|----------------|-------|---------|
| 22 - 27 | 4 | 1 | 5 | 11,90 |
| 28 - 33 | 4 | 5 | 9 | 21,43 |
| 34 - 39 | 3 | 7 | 10 | 23,81 |
| 40 - 45 | 2 | 4 | 6 | 14,29 |
| 46 - 51 | 5 | 3 | 8 | 19,05 |
| ≥52 | 4 | 0 | 4 | 9,52 |

Cuadro 2
Colposcopia por grupo etario.
Reporte colposcópico

| Edad | Positivo | | Negativo | | Total | |
|---------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| | Absoluto | Porcentual | Absoluto | Porcentual | Absoluto | Porcentual |
| 22 - 27 | 4 | 10,81 | 1 | 20,00 | 5 | 11,90 |
| 28 - 33 | 9 | 24,32 | 0 | 0,00 | 9 | 21,43 |
| 34 - 39 | 7 | 18,92 | 3 | 60,00 | 10 | 23,81 |
| 40 - 45 | 6 | 16,22 | 0 | 0,00 | 6 | 14,29 |
| 46 - 51 | 7 | 18,92 | 1 | 20,00 | 8 | 19,05 |
| ≥52 | 4 | 10,81 | 0 | 0,00 | 4 | 9,52 |

Sensibilidad = 0,119 = 11,9 %

Especificidad = 0,881 = 88,1 %

Cuadro 3
Biopsia dirigida de cuello uterino por grupo etario

| Edad | Cervicitis | NIC I | NIC II | NIC III | CA <i>In situ</i> | Total | Total % |
|---------|------------|-------|--------|---------|-------------------|-------|---------|
| 22 - 27 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 5 | 11,90 |
| 28 - 33 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 9 | 21,43 |
| 34 - 39 | 0 | 4 | 3 | 2 | 1 | 10 | 23,81 |
| 40 - 45 | 0 | 2 | 3 | 1 | 0 | 6 | 14,29 |
| 46 - 51 | 0 | 6 | 1 | 0 | 1 | 8 | 19,05 |
| ≥52 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 9,52 |

Cuadro 4
PCR para VPH por grupo etario

| VPH Edad | Negativo | | Positivo | | Total | |
|-------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| | Absoluto | Porcentual | Absoluto | Porcentual | Absoluto | Porcentual |
| 22 - 27 | 1 | 5,56 | 4 | 16,67 | 5 | 11,90 |
| 28 - 33 | 3 | 16,67 | 6 | 25,00 | 9 | 21,43 |
| 34 - 39 | 3 | 16,67 | 7 | 29,17 | 10 | 23,81 |
| 40 - 45 | 3 | 16,67 | 3 | 12,50 | 6 | 14,29 |
| 46 - 51 | 6 | 33,33 | 2 | 8,33 | 8 | 19,05 |
| ≥52 | 2 | 11,11 | 2 | 8,33 | 4 | 9,52 |

Sensibilidad = $0,119 = 57,1 \%$

Especificidad = $0,881 = 42,9 \%$

Cuadro 5
Genotipos de VPH por grupo etario

| Genotipos de VPH Edad | Riesgo Bajo 6 | Riesgo Interm Int | Riesgo Alto | | Total Absoluto | Total Porcentual |
|-----------------------------|------------------|----------------------|-------------|------|-------------------|---------------------|
| | | | 16 | Otro | | |
| 22 - 27 | 3 | 1 | 0 | 0 | 4 | 16,67 |
| 28 - 33 | 1 | 1 | 1 | 3 | 6 | 25,00 |
| 34 - 39 | 4 | 0 | 2 | 1 | 7 | 29,17 |
| 40 - 45 | 1 | 0 | 0 | 2 | 3 | 12,50 |
| 46 - 51 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 8,33 |
| ≥52 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 8,33 |

Y por último, en el Cuadro 6, se presenta la distribución de los genotipos de VPH por tipo de lesión cervical, de las 12 pacientes positivas para el genotipo 6, se encontró el NIC I como el tipo de lesión cervical más afectado por ese genotipo con 5

pacientes. Asimismo, solo se reportaron 2 genotipos de riesgo intermedio ubicándose en el NIC I y el NIC III con 1 paciente respectivamente. A su vez, de las 10 pacientes positivas para genotipos de riesgo alto, y de las 7 pacientes que fueron identificadas con otros

TIPIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

Cuadro 6

Genotipos de VPH por tipo de lesión cervical

| Genotipos de VPH Tipo De Lesión | Riesgo Bajo | Riesgo Interm | Riesgo Alto | | Total | |
|------------------------------------|-------------|---------------|-------------|------|----------|------------|
| | 6 | Int | 16 | Otro | Absoluto | Porcentual |
| Cervicitis | 3 | 0 | 0 | 2 | 5 | 20,83 |
| NIC I | 5 | 1 | 0 | 1 | 7 | 29,17 |
| NIC II | 3 | 0 | 0 | 2 | 5 | 20,83 |
| NIC III | 1 | 1 | 2 | 1 | 5 | 20,83 |
| Ca <i>in situ</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 8,33 |

genotipos como los más comunes, las lesiones tipo cervicitis y NIC II fueron los más habituales, con 2 pacientes en cada grupo. Sin embargo, el genotipo 16 fue hallado frecuentemente en el NIC III. Con el cáncer *in situ* se identificaron los genotipos de riesgo alto con un total de 2 pacientes, siendo el genotipo 16 y el de otro genotipo los más comunes, con 1 paciente en cada grupo.

DISCUSIÓN

Debido a que actualmente el cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte oncológica en mujeres venezolanas (2), la detección y tipificación del VPH mediante PCR se ha convertido en una herramienta importante y necesaria para el clínico, para definir las conductas en los casos que se identifique la presencia del virus, esto lo estipuló Melo y col. (8) en su estudio, demostrando que la detección y tipificación viral pueden proporcionar información valiosa para la selección de pacientes, seguimiento y asignación de los recursos.

Por consiguiente, en este trabajo de investigación de tipo descriptivo transversal, no experimental y de campo, se pudo determinar los tipos de VPH mediante la técnica PCR en lesiones preneoplásicas y neoplásica (cáncer *in situ*) en las 42 pacientes estudiadas, dentro de las cuales 24 pacientes fueron positiva, mientras que 18 dieron negativas, arrojando que la técnica es altamente sensible y adecuada para la detección del virus.

Aunado a ello, de la muestra estudiada, el mayor número de pacientes se ubicó entre las edades de 34 a 39 años, lo que permite comprender que se debe llevar

un control y seguimiento riguroso, a todas las mujeres y muy especialmente aquellas entre estas edades. Entre los factores de riesgo como la menarquía, duración, ciclo menstrual, primera relación sexual, número de gestas, uso de anticonceptivos orales, hábitos tabáquicos y antecedentes oncológicos familiares, no fueron significativos en el estudio.

En cuanto a la citología cervicovaginal por grupo etario, Abreu (7) y García (12) demostraron que la LIEbg fue más frecuente entre las pacientes estudias, de manera similar, se demostró en esta investigación con un total de 22 pacientes, mayormente entre las edades de 46 a 51 años, sin embargo, es importante destacar, que a pesar de que el LIEag fue el menos frecuente, si fue el más sobresaliente entre las edades de 34 a 39 años.

Con respecto a la colposcopia por grupo etario resultó que fue sensible en un 11,9 % y específica en un 88,1 %, encontrándose 37 pacientes positivas en el estudio, hallándose mayormente entre las edades de 28 a 33 años, mientras que las pacientes con colposcopia negativa fueron ubicadas entre las edades de 34 a 39 años, resultado que no concuerda si se relaciona con lo hallado la citología en esas mismas edades, sin embargo, Martínez (13) en su investigación determinó que en cuanto a los resultados de amplificación; y los encontrados en biopsias, citología y colposcopias, algunos no fueron concordantes.

Por su parte, en la biopsia dirigida de cuello uterino por grupo etario, Abreu (7) y Lugo (9) obtuvieron al NIC I como la lesión cervical más frecuente. En este trabajo el NIC I fue el más destacado, dispuesto entre las edades de 46 a 51 años, y el menos frecuente el cáncer *in situ*, ubicado habitualmente entre las edades de 22 a 33 años.

En relación al estudio mediante PCR para VPH por grupo etario, dieron positivo para VPH un total de 24 pacientes, dentro de las cuales el mayor número se encuentra entre las edades de 34 a 39 años, mientras que dieron negativo para VPH 18 pacientes, ubicándose frecuentemente entre las edades de 46 a 51 años, mostrando que la técnica tuvo una sensibilidad de 57,1 % y una especificidad de un 42,9 % para el total de la muestra. Esto lo corroboran Susana y col. (10) y Quintero y col. (11) en sus estudios, donde concluyeron de que la técnica es apropiada para el diagnóstico y tipificación de VPH en muestras del área genital.

En cuanto a los genotipos de VPH por grupo etario, Quintero y col. (11) demostraron que el VPH de riesgo bajo es el más frecuente, específicamente el genotipo 6, esto mismo se verificó en este trabajo, en un total de 12 pacientes, ubicándose mayormente entre las edades de 34 a 39 años. Por su parte, el de riesgo intermedio tuvo un total de 2 pacientes ubicadas entre las edades de 22 a 27 y 28 a 33 años, por lo que son menos frecuentes entre el total de las pacientes estudiadas. Por otro lado, el de riesgo alto tuvo un total de 10 pacientes, siendo el más común los de otros genotipos encontrándose mayormente entre las edades de 28 a 33 años, por lo que Suárez y col. (4) concluyeron que en sus pacientes la tipificación del VPH no reflejaron aquellos reportados en otros países, y por tal motivo plantearon la necesidad de realizar estudios epidemiológicos a gran escala que incluyan otros genotipos de riesgo alto, situación similar que se pudiera plantear para el Estado Trujillo. Por su parte, el genotipo 16 fue el menos común ubicándose entre las edades de 34 a 39 años y entre las edades de 28 a 33 años. Aunque, Susana y col. (10), Quintero y col. (11) y Ríos y col. (14) en sus investigaciones reportaron que el genotipo 16 fue el más común, concluyendo de que existe una alta tasa de infección con este tipo de genotipo entre esas mujeres estudiadas.

A su vez, en relación con la distribución de los genotipos de VPH por tipo de lesión cervical, Lugo (9) reporta como el NIC I la lesión histopatológica más frecuente, resultando el genotipo indeterminado como el más común y solo el genotipo 6 representó el 25 %, sin embargo, en este trabajo el genotipo 6 fue el más destacado, encontrándose el NIC I como el tipo de lesión cervical más afectado en este genotipo. Asimismo, solo se reportaron 2 genotipos de riesgo intermedio ubicándose en el NIC I y el NIC III. Por su parte, de los genotipos de riesgo alto, los de otros genotipos diferentes al 16 y 18, fueron los

más comunes, encontrándose principalmente en las lesiones tipo cervicitis y NIC II. Sin embargo, en el NIC III se encontró mayormente el genotipo 16, por lo que corresponde a lo estudiado por Melo y col. (8) quienes concluyeron que en la mayoría de las lesiones de alto grado los virus de VPH más comunes son los genotipos de riesgo alto. Por otro lado, en relación al cáncer *in situ* los genotipos de riesgo alto solo se identificaron con esta lesión, siendo el genotipo 16 y el de otro genotipo los más comunes. García (12) concluye que los VPH de alto riesgo están presentes en todos los casos de cáncer de cérvix, siendo el genotipo 16 el más frecuente.

AGRADECIMIENTOS

A los adjuntos del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario “Dr. Pedro Emilio Carrillo”, así como también al Dr. Hugo Calderas, Dr. Indalecio Rivero y la Dra. Tineo, por su disposición y ayuda desinteresada para el desarrollo de esta investigación.

Y en especial a la Licenciada Ana María Briceño, quien junto con su laboratorio clínico e inmunodiagnóstico BRIMED, C.A.; hizo posible la elaboración de esta investigación.

REFERENCIAS

1. La infección por el VPH: Un problema de salud pública en Venezuela. [En línea]. 2009. Nro. 38. Academia Biomédica Digital. [Fecha de acceso 27 de diciembre 2013]. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=71&n=3575&m=2&e=3577>.
2. Epidemiología y estadísticas del cáncer de mama en Venezuela. [En línea]. 2012. Senocuidado, servicios médicos mastológicos. [Fecha de acceso 15 de agosto 2015]. Disponible en: <http://www.senocuidado.com/cancer-de-mama/epidemiologia-y-estadistica.html>
3. Molano M, Murillo R, Cano A, Gamboa O, Ardila J, Mejía J, et al. Detección y Tipificación del virus del papiloma humano (VPH) en mujeres con cáncer de cuello uterino en Bogotá y Barranquilla. Procedimientos técnicos y de diagnóstico. Rev Colomb Cancerol. 2010;14(2):78-87.
4. Suárez C, Briñez A, Marrero L, Briceño J. Tipificación del VPH en cáncer de cuello uterino en la población venezolana. Scielo. Revista Venezolana de Oncología. [En línea]. 2006. [fecha de acceso 26 de diciembre 2013]. Vol. 18. Nro. 4. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798->

TIPIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

- 05822006000400004&script=sci_arttext
5. Cavazza M, Correnti M. Actualidades sobre el virus papiloma humano. *Dermatología Ibero-Americana online*. [En línea]. 2010. [fecha de acceso 26 de diciembre 2013]. Disponible en: <http://piel-l.org/libreria/item/792>
 6. Segovia E, Mendoza L. Tipificación del virus del papiloma humano en muestras cervicales de 15 mujeres atendidas en el Instituto nacional del cáncer, Año 2007. *Mem Inst Investig Cienc. Salud*. [En línea]. 2009. [fecha de acceso 26 de diciembre 2013]. Vol. 5 (1). Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v7n1/v7n1a08.pdf>
 7. Abreu, F. Estudio transversal de correlación cito-colpo-histopatológica en la consulta de patología cervical en el Hospital Universitario Dr. Pedro Emilio Carrillo. [Tesis doctoral]. Valera, Estado Trujillo. Universidad de Los Andes, ULA Extensión Valera. 2013.
 8. Melo A, Montenegro S, Hooper T, Capurro I, Roa J, Roa I. Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones pre neoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile. *Scielo*. [En línea]. 2003. [fecha de acceso 26 de diciembre 2013]. Vol. 13. Nro. 12 1382-1390. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0034-98872003001200004&script=sci_arttext&tlng=es
 9. Lugo Carrillo E. Tipificación de Virus de Papiloma Humano mediante la técnica de reacción de cadena polimerasa (PCR). Hospital Central “Antonio María Pineda” consulta de patología cervical. Barquisimeto. junio – diciembre 2002. [Tesis doctoral]. Barquisimeto. [En línea]. 2004. [fecha de acceso 26 de diciembre 2013]. Disponible en: http://bibmed.ucla.edu.ve/edocs_bmucla/TextoCompleto/TQW165%P2L832004.pdf
 10. Susana A, Melo A, García P, Guzmán P, Capurro I, Roa J. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones pre neoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Scielo*. [En línea]. 2007. [fecha de acceso 26 de diciembre 2013]. Vol. 135. Nro. 2. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872007000200004&script=sci_arttext
 11. Quintero Vega M, Cruz Gómez J, Bastidas M, Márquez L, Puig Pons J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez*. [En línea]. 2008. [fecha de acceso 27 de diciembre 2013]. Vol. 68. Nro. 1. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0048-77322008000100006&script=sci_arttext
 12. García González A. Detección y Tipificación de los virus del papiloma humano de alto riesgo en pacientes con lesiones pre invasivas e invasivas del cérvix por medio de PCR. [Tesis doctoral]. Guatemala. Proyecto FODECYT Nro. 06-2007. [En línea]. 2008. [fecha de acceso 27 de diciembre 2013]. Disponible en: <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202007.06.pdf>
 13. Martínez M, Ivette C. Detección de virus del papiloma humano en mujeres y sus parejas sexuales. Consulta de patología cervical del servicio autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), Cumaná, Estado Sucre. Agosto 2006 - abril de 2007. [Tesis doctoral]. [En línea]. 2009. [fecha de acceso 27 de diciembre 2013]. Disponible en: http://ri.bib.udo.edu.ve/bitstream/123456789/4165/1/TEISIS_IM.pdf
 14. Ríos M, Menéndez M, Aguilar F, Silveira M, Amigó M, Aguilar K. Tipos de papilomavirus humanos más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical. *Scielo. Revista Cubana Obstetricia y Ginecología*. Abril – Junio 2010. [Fecha de acceso 29 de diciembre 2013]. Vol. 36. Nro. 2. Ciudad de la Habana – Cuba. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-600X2010000200009&script=sci_arttext
 15. Chuaqui R. Patología especial del cuello uterino. *Lecciones de anatomía patológica*. [En línea]. 2006. [Fecha de acceso 28 de diciembre 2013]. Capítulo 6. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ>