

Infección cervical por virus del papiloma humano: genotipificación por hibridación *in situ* y análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión

ARTURO BARRÓN,^a CARLOS ARANDA,^b
SERGIO VALENZUELA,^c YURIDIA PAREDES^d, HILDA VILLEGAS^d

RESUMEN

Introducción: El virus del papiloma humano (VPH) es el virus que más frecuentemente se transmite por contacto sexual y está fuertemente asociado con el cáncer cérvicouterino. Los tipos virales que se documentan con mayor frecuencia en el epitelio cervical son 6, 11, 16, 18, 31 y 33, los cuales difieren en su capacidad oncogénica; los dos primeros presentan bajo potencial y los últimos alto potencial oncogénico.

Objetivo: Identificar los tipos de VPH presentes en biopsias de cervix con evidencia citológica, colposcópica e histopatológica de infección viral, y realizar un análisis ultraestructural de los cambios celulares asociados.

Material y métodos: Usamos la hibridación *in situ* (HIS) con sondas biotiniladas para identificar los tipos virales, y las biopsias positivas se procesaron para análisis ultraestructural por microscopía electrónica.

Resultados: Se analizaron por HIS 63 biopsias cervicales, 24 (38%) resultaron positivas para alguno de los tipos virales probados, los más frecuentes fueron los tipos 6/11 (24%), los cuales en el análisis ultraestructural se asociaron a la presencia de varios nucléolos en núcleos con bordes crenados, en tanto que los tipos oncogénicos se asociaron con la presencia de partículas virales en núcleos, que frecuentemente se presentan multilobulados y con inclusiones citoplasmáticas. En ambos casos es evidente la desorganización de los desmosomas.

Conclusiones: La prevalencia de VPH encontrada en este estudio concuerda con lo reportado para esta infección viral en otros estudios donde se usa la misma técnica, los tipos virales concuerdan con el diagnóstico inicial, y el estudio ultraestructural arroja evidencias sobre las principales alteraciones celulares asociadas a la infección viral.

PALABRAS GUÍA: Virus del papiloma humano, genotipificación, hibridación *in situ*, microscopía electrónica de transmisión.

^a Departamento de Infectología e Inmunología, del Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

^b Servicio de Oncología, INPer.

^c Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico, INPer.

^d Departamento de Microscopía Electrónica, INPer.

Correspondencia:

Dr. Arturo Barrón González

Departamento de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología.

Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes,

C.P. 011000, México, D.F.

Teléfono: 5520-9900, ext. 520

Fax: 5520-0034

Correo electrónico: ayaxbarron@hotmail.com

Recibido: 9 de noviembre de 2004.

Aceptado: 11 de diciembre de 2004.

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es uno de los factores etiológicos más comunes en enfermedades de transmisión sexual y es el virus que más frecuentemente se transmite por esta vía¹. La infección genital por VPH es silente y su prevalencia e incidencia son desconocidas; sin embargo, se estima que la incidencia en los Estados Unidos es de 1 a 5.5 millones/año y la prevalencia es de 20 millones.^{2,3}

El VPH pertenece a la familia *papovaviridae*, conformada por virus relativamente pequeños (55 nm de diámetro), sin envoltura membranal externa y que presentan una cápside proteica externa de forma icosaédrica. El genoma viral consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena de 7.9 Kpb asociado con histonas, que presenta tres regiones principales; 1) la región larga de control (LCR), una secuencia de 400-1000 pb no codificante que regula la transcripción de las regiones codificantes; 2) la región de expresión temprana (E), implicada en replicación viral y oncogénesis y que codifica para proteínas reguladoras de la expresión del genoma viral, y 3) la región de expresión tardía (L), que codifica para las proteínas de la cápside. Los viriones son ensamblados en el núcleo y liberados en las células de las capas superiores del epitelio.⁴⁻⁶

El VPH está asociado con una variedad de condiciones clínicas que van desde las lesiones inocuas hasta el cáncer, aunque la mayoría de las infecciones son benignas. Inicialmente el VPH fue identificado como el agente causal de las verrugas cutáneas comunes, pero posteriormente se ha establecido que ciertos tipos que infectan la cara incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de piel, y los que infectan la mucosa interna de la boca producen pequeños nódulos que pueden degenerar en cánceres de células escamosas, además de la fuerte asociación que existe entre la infección cervical con algunos tipos de VPH y el cáncer cérvicouterino.^{1,7}

La relación entre infección genital por VPH y cáncer cervicouterino ha sido demostrada claramente desde hace más de dos décadas y ahora se sabe que la asociación entre VPH y este tipo de cáncer es mayor que la que existe entre tabaquismo y cáncer pulmonar.⁸

El cáncer cervicouterino es el tercero más común en las mujeres en Estados Unidos, sólo superado en frecuencia por el cáncer de piel y de mama, pero en los países en desarrollo es el cáncer femenino más frecuente y puede llegar a constituir el 25% de todos los cánceres en mujeres. En México –para el año 2000– se registraron 16,500 nuevos casos y 6,700 muertes, de hecho ocupa el primer lugar de mortalidad

por cáncer.⁹ En el ámbito mundial, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres, y se ha demostrado que el VPH está implicado en 99.7% de los casos de cáncer cervical de células escamosas en todo el mundo;¹⁰ los casos de adenocarcinomas de cervix también están relacionados a VPH, pero de manera menos pronunciada y esta relación depende de la edad, ya que en mujeres de menos de 40 años el virus está presente en 89% de los casos y en mujeres de más de 60 se ha observado sólo en el 43%.¹¹

Actualmente se han identificado y caracterizado totalmente 85 tipos virales, además de aproximadamente 120 tipos más que han sido caracterizados potencialmente como nuevos genotipos; asimismo, se han documentado hasta 30 tipos diferentes de VPH que infectan el tracto genital femenino y que se contagian por contacto sexual, pero sólo seis de ellos son los que más frecuentemente se identifican en tracto genital: los tipos 6 y 11, que presentan bajo riesgo oncogénico, y los tipos 16, 18, 31 y 33, los cuales presentan un alto potencial oncogénico.^{1,2,7}

El potencial oncogénico del VPH se ha asociado a dos proteínas virales denominadas E6 y E7 que se sabe interactúan con p53 y pRB, respectivamente, y que actúan bloqueándolos, con lo cual impiden que cumplan su función protectora del ADN, por lo que eventualmente las células infectadas acumulan errores genéticos que en un momento determinado pueden conducir a la malignización celular.^{4,12}

El método de detección primaria para la infección cervical por VPH es la citología exfoliativa cervical con tinción de Papanicolaou (Pap), la cual ha propiciado una disminución en la incidencia del cáncer cervical y las tasas de mortalidad entre 50 y 65%, ya que es una herramienta que detecta los cambios celulares, asociados a infección por VPH en la zona de transformación del cervix.¹³ El informe de la clasificación de la tinción de Pap ha evolucionado y se ha refinado con el tiempo. El sistema de informe utilizado actualmente es el de Bethesda, que fue creado para uniformizar la terminología diagnóstica descriptiva, incluyendo las condiciones de la muestra como



una parte integral del reporte. Este sistema clasifica las anomalías de células escamosas en cuatro categorías: 1) células escamosas atípicas (CEA); 2) lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG); 3) lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG), y 4) carcinoma de células escamosas.¹⁴

Debido a que se han identificado genotipos de VPH cervical que presentan un mayor potencial oncogénico y a que no es posible tipificarlos con los métodos de rutina, se hace necesario identificar los genotipos de VPH que se encuentran en las lesiones cervicales, y así evaluar el riesgo de las pacientes de desarrollar cáncer cervicouterino. Es por esta razón, que en este trabajo decidimos usar la hibridación *in situ* (HIS) para identificar los genotipos más frecuentes (6, 11, 16, 18, 31 y 33) en infección cervical, ya que aunque no es la técnica más sensible, nos permite identificar el tipo viral que se encuentra infectando las células del epitelio cervical y ubicar en qué región del tejido y en qué tipo celular se encuentra el ADN viral; también se decidió realizar un análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión (MET), de las biopsias positivas por HIS, que nos permitiera explorar cuáles son las principales anomalías celulares asociadas a la infección viral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Las mujeres con examen de Pap sugestivo de infección por VPH se canalizaron a estudio colposcópico donde se diagnosticó la lesión y se tomó biopsia dirigida, de acuerdo con la prueba de ácido acético 5%, inmediatamente los especímenes se fijaron en formol neutro 4% (buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4) por tiempo menor a 24 horas. Posteriormente las biopsias se procesaron para inclusión en parafina con las técnicas habituales para estudio histopatológico. En la fase final de esta etapa se realizó el diagnóstico histopatológico de la biopsia y las que mostraron evidencia tisular (presencia de coilocitos y anomalías nucleares) de infección por VPH, se enviaron para tipificación por HIS.

Hibridación *in situ*

Se realizó en cortes histológicos de 5 mm de grosor montados en portaobjetos silanizados (3-amino-propil-Trietoxi-silano, DAKO), se desparafinaron y rehidrataron por medio de lavados en xileno/alcohol/agua. Se les aplicó un paso de predigestión con pepsina (0.8%)-HCl (0.2N) durante 10 minutos a 37 °C. La hibridación ADN/ADN se realizó desnaturando tanto el ADN de la muestra, como el de las sondas, a 90 °C durante 5 minutos, e incubando a 37 °C durante 60 minutos en cámara húmeda. Se usaron sondas individuales de ADN marcadas con biotina, específicas para los tipos virales 6, 11, 16, 18, 31 y 33 (DAKO). Posteriormente se aplicaron los lavados de alta astringencia por 30 minutos a 58 °C. El revelado se llevó a cabo con el sistema estreptavidina/fosfatasa alcalina (SA-PA, DAKO), usando como sustrato 5-bromo-4-cloro-3-Indolil-fosfato (BCIP, DAKO), y nitroazul de tetrazolio (NBT, DAKO) como cromógeno, finalmente los especímenes se contrastaron con rojo rápido nuclear 1% (SIGMA) y se montaron permanentemente con medio de montaje hidrosoluble Faramount (DAKO). Cada ensayo se corrió en presencia de controles positivos (ADN humano) y negativos (ADN de pBr322) de las condiciones de hibridación. El resultado de la prueba se analizó en un microscopio óptico Axioskop (Carl Zeiss), considerando únicamente la región nuclear de las células epiteliales como marca de hibridación.

Microscopía electrónica de transmisión

Las biopsias positivas por HIS para cualquiera de los tipos virales fueron reprocesadas para análisis ultraestructural por MET; inicialmente fueron desparafinadas y rehidratadas con el método xilol/etanol/agua, y se posfijaron en glutaraldehído 3% y tetraóxido de osmio 1%, posteriormente se deshidrataron en etanol a concentraciones ascendentes y fueron incluidas en una mezcla 1:1 de óxido de propileno-resina acrílica Polibed 812 polimerizadas a 60 °C durante 24 horas. Se realizaron cortes semi-finos (1 µm de espesor) que se

Tabla 1
Frecuencia de tipos virales detectados por HIS y diagnósticos de referencia

Tipo VPH	Núm. de casos (%)	Dx histopatológico	Dx colposcópico
6	8 (12.7)	NIC I	NIC I
11	7 (11.1)	NIC I	NIC I
16	2 (3.2)	NIC I	NIC I
18	4 (6.3)	NIC I (3), NIC III (1)	NIC I
31	1 (1.6)	NIC I	NIC I
33	2 (3.2)	NIC I	NIC I
Total	24 (38.0)		

tiñeron con azul de toluidina y se analizaron con un microscopio óptico Axioskop, con la finalidad de seleccionar las zonas del tejido más apropiadas para el análisis ultraestructural del tejido. Los cortes finos (60-80 nm de espesor) se realizaron en un ultramicrotomo LKB modelo NOVA, se montaron en rejillas de 300 mesh y se contrastaron con el sistema citrato de plomo/acetato de uranilo. El análisis ultraestructural se realizó con un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM10-C a 80Kv de diferencia de potencial.

RESULTADOS

Se procesaron 63 biopsias cervicales con evidencia citológica y colposcópica de infección por VPH, la edad promedio de las pacientes fue 30.3 ± 4.7 años (intervalo 15-56 años), el diagnóstico de las lesiones cervicales fue realizado alternativamente por colposcopia e histopatología. El diagnóstico colposcópico más frecuente (61 casos, 97%) fue neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC I), y sólo en dos casos (3%) se diagnosticó lesión de alto grado (NIC III), asimismo, el diagnóstico histopatológico de la biopsia reportó NIC I en 58 casos (92%) y sólo en cinco casos (8%) lesión de alto grado (NIC III).

Se detectó por HIS la presencia de ADN viral en 24 biopsias (38%) y los tipos virales más frecuentes fueron los de bajo riesgo (6/11), la tabla 1 muestra los resultados de la HIS y se comparan con ambos diagnósticos, en

donde podemos ver que sólo una de las biopsias positivas para VPH tipo 18 fue diagnosticada por histopatología como lesión de alto grado.

La figura 1 muestra imágenes del epitelio ectocervical procesado por hibridación *in situ*.

Asimismo, la figura 2 muestra los resultados obtenidos en biopsias positivas. En todas las imágenes es evidente la marca de hibridación

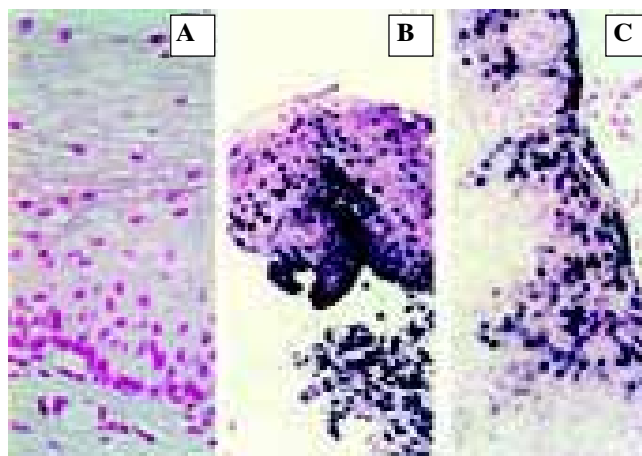


Figura 1
Fotografías de epitelio ectocervical procesado por hibridación *in situ*.
A. Control negativo (ADN pBr322) (100X);
B. Control positivo (ADN humano) (20X);
C. Biopsia positiva para ADN de VPH tipo 16 (40X)

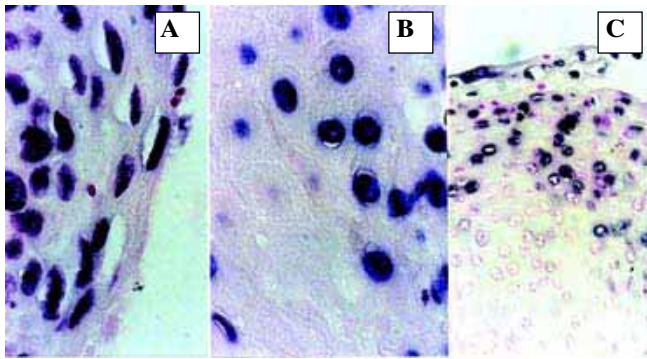


Figura 2
Fotografías de epitelio cervical
con reacción de hibridación
positiva para:
A. ADN de VPH, tipo 6 (100X);
B. ADN de VPH, tipo 11 (100X); C. ADN de
VPH, tipo 33 (40X)

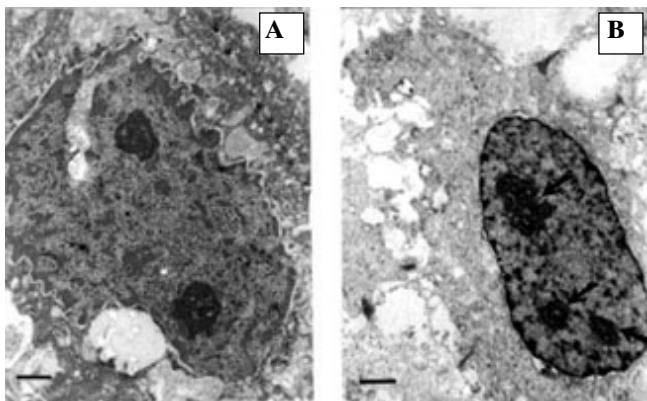


Figura 3
Micrografías electrónicas
que muestran:
A. El núcleo de una célula
epitelial con borde muy
irregular y con dos nucléolos
(barra 0.6 mm);
B. El núcleo de otra célula
epitelial con tres nucléolos
(flechas) (barra 2.0 mm).
Biopsias positivas
para ADN de VPH, tipo 6

nuclear positiva en la región epitelial del tejido, en donde el resultado de la reacción enzimática es un precipitado de color azul oscuro en la zona de hibridación.

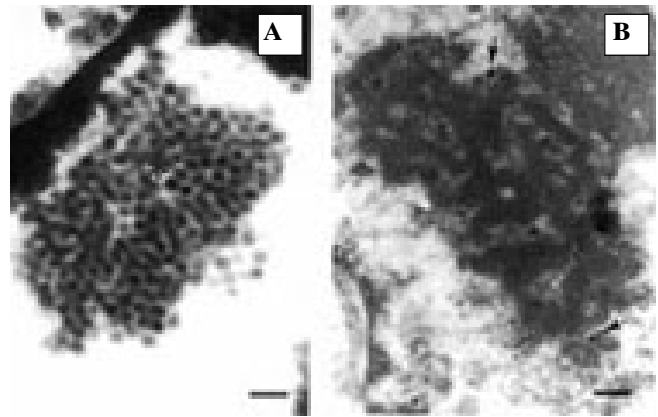


Figura 4
Micrografías electrónicas
donde se puede observar:
A. Núcleo de una célula
epitelial con un agregado
casi-cristalino de partículas virales
(asterisco) (barra 85 nm);
B. Núcleo de otra célula epitelial
con partículas virales aisladas
(flechas) (barra 170 nm).
Biopsias positivas para
ADN de VPH, tipo 16

En todas las biopsias positivas para cualquiera de los tipos virales de VPH la señal de hibridación siempre se encontró en los estratos más superficiales del epitelio estratificado.

En el análisis ultraestructural fue evidente la presencia de núcleos de borde muy irregular (crenado) (Figura 3A) y varios nucléolos por núcleo (Figura 3B) que se asocian preferentemente a los tipos virales de bajo riesgo oncogénico (tipos 6 y 11); asimismo, en las biopsias positivas para los tipos de alto riesgo oncogénico fue posible observar la presencia de partículas virales en arreglo casi-cristalino (Figura 4A) en el núcleo de células epiteliales y también fue evidente la presencia de partículas virales en forma aislada (Figura 4B). En las biopsias positivas para los tipos virales de alto riesgo oncogénico, fue posible identificar núcleos multilobulados (Figura 5A) con seudoinclusiones citoplasmáticas (Figura 5B).

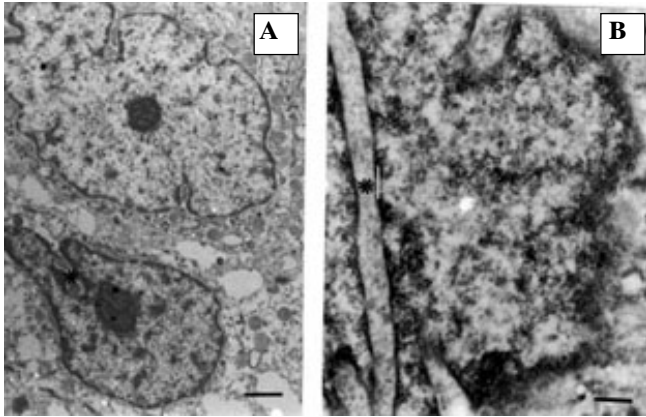


Figura 5
Micrografías electrónicas de transmisión en las que se observan núcleos multilobulados con seudoinclusiones citoplásmicas en dos células de epitelio ectocervical [barra: A. 1.1 μ m, B. 270 nm]. Biopsias positivas para ADN de VPH, tipo 18

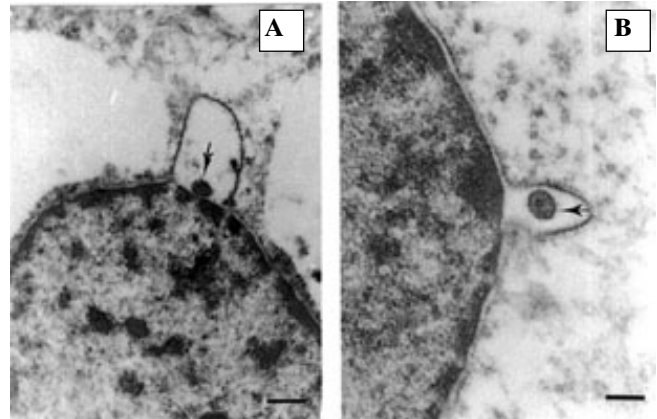


Figura 7
Núcleos de dos células epiteliales donde se observan partículas electrodensas (flecha) entre las capas interna y externa de la envoltura nuclear [barra: A. 0.5 μ m, B. 250 nm]. Biopsia positiva para ADN de VHP, tipo 16

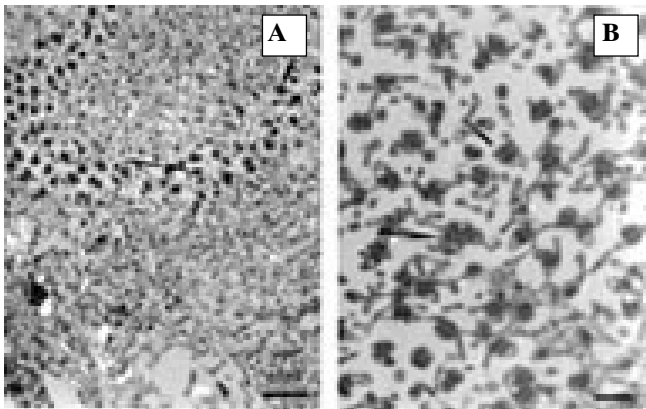


Figura 6
Imagen de microscopia electrónica que muestra:
A. Visión de bajo aumento de las uniones celulares desmosomales desorganizadas (flechas) (barra 1.3 μ m).
B. Imagen de gran aumento de los desmosomas (flechas) en donde se puede apreciar el incremento tan importante en número y en desorganización (barra 0.5 μ m).
Biopsia positiva para ADN, tipo 6

En casi todas las biopsias es evidente la desorganización de las uniones celulares denominadas desmosomas como se muestra en la figura 6.

Un hallazgo sorprendente en biopsias positivas para ADN de VPH de los tipos 16 y 18 fue la presencia de partículas electrodensas de aproximadamente 100 nm de diámetro, que se encuentran entre ambas capas de la envoltura nuclear y que, aparentemente, están abandonando el núcleo (Figuras 7A y 7B). Desafortunadamente, dadas las condiciones en que se planteó y desarrolló este estudio, no fue posible establecer el significado de estas partículas, que pudieran representar una característica morfo-funcional de las células infectadas por ADN de VPH.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio se analizó la presencia de los genotipos de VPH más frecuentemente asociados a infección cervical, en biopsias de cervix en pacientes con evidencia citológica, colposcópica e histopatológica de infección



viral, para ello se usaron sondas de ADN marcadas con biotina y se reveló el resultado de la reacción de hibridación con un sistema enzimático de estreptavidina acoplada con fosfatasa alcalina. Posteriormente se analizaron ultraestructuralmente las biopsias que resultaron positivas para alguno de los tipos virales.

El diagnóstico colposcópico e histopatológico más frecuente fue neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC I) lo cual concuerda, en principio, con los resultados de la hibridación que indican una mayor frecuencia de los tipos virales de bajo riesgo oncogénico (15/24, 62.5% de todos los casos positivos).

Los resultados de las pruebas de hibridación indican una prevalencia de 38% de infección por VPH, estos datos pueden parecer bajos si consideramos el sistema de selección de las pacientes; sin embargo, no lo son tanto si lo comparamos con los datos publicados por Tamayo y cols. en los que, usando PCR en células de descamación, identifican la presencia de los tipos 6, 11, 16, 18 y 33 en pacientes con evidencia citológica de infección por VPH y que informan una prevalencia del ADN viral de 8.6% para los casos y de 5.3% para los controles.¹⁵ Asimismo, al aplicar la misma técnica de detección, aunque para casos de cáncer cervical, Hernández y cols. reportaron una prevalencia del ADN viral cercana al 50%, tanto para los casos de carcinoma *in situ* como invasivo, y para sus controles encuentran que 13% es positivo para el ADN viral.¹⁶ Aunque la hibridación *in situ* no es la técnica más sensible que se conoce para la detección de ADN viral, ya que actualmente existen otros métodos que reportan una sensibilidad mayor. Como la reacción de polimerasa en cadena (PCR),¹⁷⁻¹⁹ Southern Blot,²⁰ que captura de híbridos ADN/ARN,^{21,22} e incluso los microarreglos,^{23,24} tiene la ventaja sobre cualquier otra técnica de detección de ADN viral que es la única que permite identificar los tipos celulares infectados por el ADN viral e identificar las regiones del tejido en las que la expresión del ADN viral es mayor.

En este sentido es importante mencionar que en todos los casos positivos para ADN

viral, la señal de hibridación es más intensa en las capas superiores y más diferenciadas del epitelio escamoso, lo cual concuerda con resultados experimentales que indican que la expresión del genoma viral, y la formación misma de partículas virales se ve incrementada con la diferenciación que se lleva a cabo en las células epiteliales conforme avanzan hacia los estratos más superficiales del tejido.⁴

Asimismo, se decidió realizar la HIS en condiciones de alta astringencia, ya que aunque esto disminuye la sensibilidad, se logra un incremento importante en la especificidad, y como el objetivo del trabajo es tipificar lo más fielmente posible el ADN de HPV presente en este tipo de biopsias, se consideró necesario realizar los ensayos de hibridación en estas condiciones.

En cuanto al análisis ultraestructural, desafortunadamente existen muy pocos antecedentes de los cambios ultraestructurales asociados a infección genital por VPH, el único referente con que se cuenta es un reporte de Sato y cols., de 1987, donde muestran datos de 37 pacientes que incluyen toda la gama de lesiones asociadas a infección genital por VPH, desde condiloma acuminado hasta carcinoma *in situ*, pero dado que el objetivo del estudio es comparar la capacidad de detección de la inmunocitoquímica, microscopía electrónica de transmisión y Southern Blot, no se reportan los hallazgos ultraestructurales, solamente el número de casos en los que fueron capaces de detectar partículas virales por microscopía electrónica.²⁵

El presente estudio constituye, quizá, uno de los pocos intentos por identificar y describir las alteraciones en la ultraestructura celular asociadas a infección genital por VPH. Los resultados indican que las principales alteraciones celulares se observan en el núcleo, por ejemplo, en las células positivas para los tipos de bajo riesgo oncogénico es frecuente encontrar núcleos de borde muy irregular y varios nucléolos; por su parte, en el caso de los tipos de alto riesgo fue más frecuente la presencia de núcleos multilobulados con sudeoinclusiones citoplasmáticas, así como partículas virales en localización nuclear y otras partículas electro-

densas que se encuentran entre las dos capas de la envoltura nuclear y que, aparentemente, están dirigiéndose hacia el citoplasma. Es importante mencionar que en todas las biopsias son evidentes las alteraciones a nivel de organización de los desmosomas.

Éste es un campo prometedor; sin embargo, es necesario que se implementen metodologías y técnicas de detección que permitan incrementar la sensibilidad de la tipificación del VPH, conservando la posibilidad de establecer

una correlación de tipo morfológico. Para estos fines quizá una excelente alternativa sea el PCR *in situ* con sondas específicas que incluyan una variedad más amplia de tipos virales genitales. Estos trabajos podrían ser complementados con el uso de la microscopía electrónica de transmisión y la implementación de técnicas de histoquímica e inmunocalización, que aporten datos para apoyar las conclusiones a que se puede llegar con este tipo de estudios.

ABSTRACT

Introduction: Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted virus, is strongly associated with cervical cancer. HPV genital types differs in oncogenic potential, types 6/11 are low-risk and, types 16/18, 31/33 are high-risk. In situ Hybridization (ISH) analysis has advantage of being able to detect both, the specific cellular types infected with viral DNA and the HPV types in cervical biopsies and therefore, cervical cancer patient's risk.

Objective: This work was performed in order to typing HPV in cervical biopsies with cytological, colposcopic and histopathological evidence of HPV infection, and to search ultrastructural changes associates with viral infection.

Results: We analyzed, by ISH, 63 cervical biopsies, 24 (38%) positives to some viral type, HPV types 6/11 were more common types (24%) consistent with the more frequent, both colposcopic and histopathological diagnostic; Low-grade intraepithelial lesion. Ultrastructural analysis showed cellular alteration in association with low-risk types, principally irregular nucleus and several nucleolus for nucleus, as long as cells infected with oncogenic types DNA showed multilobulated nucleus, cytoplasmic inclusions and viral particles in nucleus. In both cases is clear an disorganization of cellular junctions desmosomes.

Conclusions: The HPV prevalence in this study was consistent with other reported, using ISH analysis, the more common types were low-risk types in agreement with previous diagnostic, and electron microscopy analysis provide evidence on the main cell alterations associated with viral infection.

KEY WORDS: Genital human papillomavirus, genotyping, in situ hybridization, transmission electron microscopy.

REFERENCIAS

1. Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 1-17.
2. Koutski L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 3-8.
3. Cates W. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. The American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis* 1999; 26: S2-S7.
4. Zur Hausen H. Papillomavirus infection –a major cause of human cancers–. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1288: F55-78.



5. Kisseljov FL. Virus-associated human tumors: carcinomas and papillomaviruses. *Biochemistry* 2000; 65: 68-77.
6. Einstein M, Goldberg G. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest* 2002; 20: 1080-5
7. Muñoz N, Bosch J, Sanjosé S, Herrero R, Castellsange X, Shah K, Snijders P, Meijer C. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New Eng J Med* 2003; 348: 518-27.
8. Franco E. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natn Cancer Inst* 1995; 87: 779-80
9. International Agency for Research on Cancer 2001. Disponible en www.iarc.fr
10. Walboomers M, Meijer J. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol* 1999; 181: 253-4.
11. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfvervard C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinomas carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2001; 37:246-50.
12. Breutner K, Tying S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* 1997;102: 9-15.
13. Kurman R, Henson D, Herbst A, Noeller K, Schiffman M. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Workshop. *JAMA* 1994; 271: 1866-9.
14. Salomon D, Davey D, Kurman R, Morierty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Young N. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-9.
15. Tamayo E, Echaniz G, Cruz A, Camacho G, Calderón E. Infección por el virus del papiloma humano en mujeres con y sin citología anormal. *Ginec Obstet Mex* 1993; 61: 27-34.
16. Hernández M, Lazcano C, Beruman J, Cruz A, Alonso P, González G. Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: A case-control study. *Arch Med Res* 1997; 28: 265-71.
17. Sato S, Maruta J, Ito K, Konno R, Yajima A, Sasaki H. Prognostic features of cervical dysplasia associated with specific types of HPV DNA and cytologic features characteristic of HPV infection in dysplasia. *Acta Cytol* 1998; 42: 1377-81.
18. Brown D, Legge D, Qadadri B. Distribution of human papillomavirus types in cervicovaginal washings from women evaluated in a sexually transmitted diseases clinic. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 763-8.
19. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, Hankis K, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, the Canadian women's HIV study group, Franco E. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 902-7.
20. Wilczinski S, Bergen S, Walker J, Liao S, Pearlman L. Human papillomavirus and cervical cancer. *Hum Pathol* 1988; 19: 697-704.
21. Zamora A, Terrés M. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y hombres mexicanos. Identificación por el sistema de captura de híbridos. *Rev Mex Patol Clin* 1998; 45: 9-16.
22. Crum C, Berkowitz R. Human papillomavirus; Applications, caveats and prevention. *J Reprod Med* 2002; 47: 519-28.
23. An H, Lee S, Kim I, Lee C, Kim S, Mun M, Kim S, Jeong J. Correlation of cervical carcinomas and precancerous lesion with human papillomavirus (HPV) phenotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. *Cancer* 2003; 97: 1672-80.
24. Kim C, Jeong J, Park M, Park T, Park T, Namkoong S, Park J. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 210-7.
25. Sato S, Okagaki T, Clark B, Twiggs L, Fukushima M, Ostrow R, Faras A. Sensitivity of koilocytosis, immunocytochemistry, and electron microscopy as compared to DNA hybridization in detecting human papillomavirus in cervical and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1987; 5: 297-307.