ARTICULO

Virus Papiloma Humano (VPH) en contexto ecológico venezolano. (I): diagnóstico citológico y molecular.

Lucrecia Contreras Irazabal [1,2], María Correnti [3], Maira Avila [3], Arkady Guerrero[1], Anais León[2].

[1] Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales "Dr. J. Witremundo Torrealba", (CIET-UC) San Carlos. Estado Cojedes.

[2] Servicio de Patología, Hospital General "Dr. Egor Nucete H." Ministerio del Poder Popular para la Salud. San Carlos. Estado Cojedes.

[3] Instituto de Oncología y Hematología. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas. Venezuela.

Correspondencia: Lucrecia Contreras.
E-mail: lecontreras@uc.edu.ve.
Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales "Dr. J. Witremundo Torrealba" (CIET-UC). Final Av. Ricaurte, adyacente al Hospital General "Dr. Egor Nucete H." San Carlos. Estado Cojedes. Venezuela.
Tel.: +58-258-4337089 – 4334021 – 416 5480780.
Financiamiento: Fonacit G2005000408 y CDCH-UC 2395-2004.

Recibido: Mayo 2008 **Aprobado**: Octubre 2008

RESUMEN

A nivel mundial, la infección genital por VPH es considerada la infección de transmisión sexual más frecuente y el factor etiológico más importante para cáncer de cuello uterino. La prevalencia del VPH y sus distintos genotipos es variable en diferentes poblaciones. El propósito de este trabajo fue generar conocimientos autóctonos acerca de la infección por VPH en la comunidad de Macapo, Estado Cojedes. Este es el primer estudio en Venezuela, de campo, descriptivo, transversal y prospectivo con participación voluntaria después de intervención educativa. Previo consentimiento informado se realizó entrevista y examen ginecológico con toma de muestra para citología convencional y diagnóstico molecular por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utilizando oligonucleótidos cebadores de consenso MY09/MY11 y genotipaje con el kit de Multiplex RCP. Fueron evaluadas 74 mujeres entre 17 y 70 años de edad; 12% (9/74) presentaron citologías alteradas: ASCUS 78% (7/9); LEI-BG 22% (2/9). La prevalencia de VPH fue 27% (20/74), de los cuales 30% (6/20) correspondieron a mujeres en rango de edad entre 45 a 54 años y 20% (4/20) a las pacientes menores de 25 años. Nosotros observamos 85% (17/20) de casos VPH positivos con diagnóstico citológico negativo para lesión intraepitelial o malignidad y sólo 33% (3/9) de VPH positivos en citologías con células epiteliales anormales. El genotipaje mostró: 85% de bajo riesgo oncogénico (tipos 6 / 11 o ambos); 5% de alto

riesgo (tipo 18) y 10% no tipificables. Estos resultados, con carácter preliminar, proporcionan datos útiles sobre el estado de la infección por VPH en la comunidad rural evaluada.

Palabras clave: Infección VPH, cuello uterino, estudio poblacional, Macapo, Estado Cojedes, Venezuela.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) in the Venezuelan ecological context. (I): conventional cytology and molecular diagnosis.

HPV genital infection has been considered the most frequent sexually transmitted disease worldwide, and it is an important etiologic factor for cervical cancer. HPV prevalence and genotype variability in various populations have been reported. The aim of this work was to generate knowledge about our actual situation regarding HPV infection in the Macapo community of Cojedes State. This is the first time in Venezuela that a descriptive, cross-sectional study and prospective study has had voluntary participation of the community after an educational intervention. With informed consent, interview and a gynecological examination, samples for conventional cytology and molecular diagnosis were taken. PCR was used for HPV detection with consensus primer MY09/MY11 and PCR Multiplex assay for HPV genotyping.74 women aged 17-70 were evaluated; 12% (9/74) presented impaired cytology results: ASCUS 78% (7/9); LSIL 22% (2/9). HPV prevalence was 27% (20/74), 30% of which (6/20) were in the 45-54 age range, and 20% (4/20) were in the under-25 age group. We observed that 85% (17/20) of HPV-positive cases had negative cytological results for intraepithelial lesions or malignancy, and only 33% (3/9) were HPV-positive, with epithelial-cell abnormalities. The genotyping assay showed: 85% low oncogenic risk (types 6 /11 or both), 5% high risk (type 18), and 10% with no typification. These preliminary results provide useful data about the state of HPV infection in the rural community assessed.

Key Words: HPV Infection, cervix, population-based study, Macapo, Cojedes State, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El interés clínico concedido a la investigación sobre Virus Papiloma Humano (VPH) en los últimos años se ha sustentado en el desarrollo de tecnología altamente reproducible y clínicamente accesible para la detección de infecciones subclínicas, lo cual ha permitido describir una parte desconocida de la historia natural de estas infecciones y el establecimiento de la relación etiológica entre algunos tipos de VPH y los cánceres de cuello uterino (CaCu), vagina, vulva, pene, canal anal, laringe y boca (1,2). Se ha estimado que el CaCu representa 12% de todos los casos de cáncer, es el segundo más común en mujeres en todo el mundo, cada año 500.000 mujeres desarrollan cáncer cervical y cerca de 250.000 mueren por esta causa (3). Aproximadamente, 83% de los casos ocurren en países en desarrollo, donde el CaCu representa 15% de las neoplasias malignas en mujeres (4).

Se ha descrito gran variación en la distribución geográfica de las tasas de incidencia estandarizadas por edad del CaCu. Latinoamérica y región Subsahariana de África, son las regiones del mundo con más alta incidencia, así como el sureste de Asia (5). Estas diferencias pudieran explicarse a través de variaciones geográficas en la prevalencia de diferentes tipos de VPH y prácticas locales en la estrategia de pesquisa (6,7,8). En Venezuela el CaCu representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en edad reproductiva, con incidencia de 3.659 casos diagnosticados y 1.612 muertes registradas para el año 2.005 y tasa de mortalidad promedio de 12 x 100.000 mujeres, manteniéndose estable en los últimos diez años. Siendo el estado

Cojedes uno de los más afectados por esta patología, con tasa de mortalidad de 17,81 x 100.000 para el año 2005, por encima del promedio nacional (9).

La infección del aparato genital por el VPH es considerada como el factor etiológico más importante para CaCu hasta ahora conocido (1-4). Asimismo, el VPH es el responsable de una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes en el mundo (3), estimándose que 75% de los adultos de ambos géneros, sexualmente activos, adquirirán la infección alguna vez en su vida (10) y más del 40% de mujeres jóvenes se infectarán en los tres años siguientes al inicio de su actividad sexual (11).

Actualmente el diagnóstico de la infección por VPH en Venezuela se realiza por clínica, citología tradicional mediante la técnica de Papanicolau y estudios histopatológicos como el estándar de oro para corroborar los diagnósticos citológicos (12,13). Un reducido número de mujeres tienen acceso a pruebas de detección de ADN en laboratorios privados o en grupos de investigación y menos de 30% de mujeres en edad de riesgo participa en el programa de pesquisa de cáncer cervical (14). Por tanto es muy poco lo que se conoce en cuanto al comportamiento biológico de la infección por VPH en nuestro ecosistema, a pesar del esfuerzo de varios grupos de investigación en diferentes zonas del país (12,15). De aquí que conocer la prevalencia y la incidencia de infección por tipos específicos de VPH y por edad en diferentes contextos es una información necesaria para establecer nuevas estrategias de prevención secundaria y primaria del cáncer cérvico-uterino adaptadas a cada realidad (16).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó estudio de campo, descriptivo, transversal y prospectivo, en la Parroquia Macapo, capital del Municipio Lima Blanco, ubicada al norte del Estado Cojedes, a 40 km de San Carlos. Ahí se contó con el apoyo del ambulatorio rural tipo II, del Ministerio del Poder Popular para la Salud y un ambulatorio de la Alcaldía del Municipio con servicio de laboratorio clínico y consultas especializadas, ambos con personal médico y auxiliar motivado para trabajar en equipo con el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Carabobo (CIET-UC) en interacción con la comunidad.
Durante el segundo semestre del año 2006 fue actualizado el censo de la población femenina sexualmente activa, de los sectores centrales de la Parroquia, registrando 632 mujeres entre 15 y 70 años de edad. Simultáneamente, se efectuó intervención educativa, mediante reuniones quincenales con el personal de salud de ambos ambulatorios, maestros comunitarios y algunos representantes de los consejos comunales para la presentación del proyecto, a través de exposición oral y discusión utilizando lenguaje sencillo y apoyo visual desarrollando la temática de estudio, propósito, justificación y diseño de investigación, tipos de intervenciones a realizar, criterios de inclusión – exclusión, y aspectos bioéticos.

Adicionalmente se difundió información por la emisora de radio local, promoviendo la participación voluntaria de las mujeres con vida sexual activa. Con la colaboración de un promotor de salud, médicos, enfermeras, personal auxiliar del ambulatorio, de la Fundación San Isidro de la Alcaldía Lima Blanco

y estudiantes de medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, se entregaron dípticos informativos en visitas domiciliarias, se colocó propaganda en sitios públicos y se perifoneó invitación recorriendo las calles del poblado.

En abril del 2007, se inició la atención de las participantes, en el consultorio de ginecología, utilizando los siguientes criterios de inclusión: género femenino con vida sexual activa residente en la comunidad en estudio que desee participar. Asimismo, criterios de exclusión: mujeres embarazadas o histerectomizadas. Previo consentimiento informado, a cada paciente se asignó un código numérico, se aplicó entrevista acerca de factores de riesgo y se realizó examen físico con exploración ginecológica y toma de muestras para citología convencional: exocérvix con espátula de madera, endocérvix con hisopo de algodón. Una segunda muestra citológica (exo-endo), destinada a diagnóstico molecular fue obtenida con cepillo estéril y sumergida en tubo con medio de transporte de la corporación DIGENE, siendo preservadas a 4°C, hasta su traslado al laboratorio para su procesamiento.

Las muestras para citología convencional fueron coloreadas con tinción de Papanicolaou modificada por Martinez (Pap-Mart) (17) y se adoptó la terminología propuesta por el sistema Bethesda (18,19) para la evaluación de ellas e interpretación diagnóstica. La prueba molecular utilizada fue la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), empleando oligonucleótidos cebadores de consenso que permiten amplificar un fragmento correspondiente a la región L1 del genoma viral, que por ser altamente conservada, admite detectar un amplio espectro de VPH. De la suspensión citológica, se procedió a la extracción del ADN, por incubación del sedimento celular en 100 µL de proteinasa K (1000 µg/mL) + 100 µL de buffer lisis (100 mmol/L de Tris HCL, pH 8,0 + 0,1 % de Sarcosina) a 55 ºC durante una noche. Inactivación de la proteinasa K mediante incubación de los tubos a 95° por 5 minutos. Purificación y precipitación del ADN con solución de cloroformo-fenol isoamílico. Resuspensión del ADN con agua libre de nucleasas para posterior amplificación.

Para la amplificación del genoma viral, se incubó 1 µg de ADN con los siguientes reactivos: 0,4 µL dNTP's (100 mmol/L); 0,2 µL de los oligonucleótidos MY09/MY11; 1,2 µL Primers ß-Globina; 6,25 µL Buffer 10X; 4,0 µL $MgCl_2$ (50mmol/L); 0,5 µL Taq. Polimerasa (5U/ µL); 27,25 µL H_20 destilada. Las condiciones de amplificación fueron**:** Temperatura inicial de desnaturalización 94ºC por 4 min, seguido de 40 ciclos. Temperatura de desnaturalización 94ºC por 15 seg. Temperatura de anillamiento 55ºC por 30 seg. Temperatura de extensión 72ºC por 45 seg y temperatura de extensión final: 72ºC por 7 min. El producto amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 2 % teñido con Bromuro de Etidio y expuesto a la luz ultravioleta.

Interpretación de los resultados: Muestra positiva: observación en el gel de dos bandas, una de 450 pb correspondiente al producto amplificado del VPH y otra de 268 pb correspondiente a la banda de ß-Globina (control interno). Muestra negativa**:** observación en el gel una sola banda de 268 pb correspondiente al gen ß-Globina.

A las muestras que resultaron positivas se les realizó RCP para genotipaje del

virus, utilizando el Kit de Multiplex RCP (Maxim Biotech, Inc.), que detecta simultáneamente 5 genotipos en un mismo tubo de reacción, tipos 6 (263 pb) y 11 (144 pb) de bajo riesgo oncogénico y los tipos 16 (601 pb), 18 (360 pb) y 33 (413 pb) de alto riesgo. La reacción se llevó a cabo incubando 5 µL del ADN extraído con los siguientes reactivos: 25 µL de Buffer 2X MPCR, 5 µL de Primers 1OX MPCR, 0.5 µL de Taq DNA Polimerasa y 14.5 µL de H_20. La visualización de los productos amplificados, se realizó en un gel de agarosa al 2 %, teñido con Bromuro de Etidio. Posteriormente se visualizó el gel en el transiluminador para su registro fotográfico.

El conjunto de variables se analizaron mediante procesamiento de estadísticos descriptivos con el programa SPSS versión 10.0 entorno Windows, organizando los datos registrados en cuadros de distribución de frecuencias absolutas y relativas porcentuales.

RESULTADOS

Entre abril y noviembre del 2007 se atendieron 80 participantes de los sectores centrales de la Parroquia Macapo, de las cuales consideramos en esta oportunidad los diagnósticos citológicos convencionales y moleculares de 74, debido a que en dos casos fue diferida la toma de la muestra por presentar signos de sangrado menstrual, en tres casos la muestra para diagnóstico molecular resultó insuficiente, y una paciente estaba histerectomizada.

La edad promedio de las participantes fue 37±13 años, con rango entre 17 y 70 años. En la Tabla 1, se observa la frecuencia de los diagnósticos citológicos.

Tabla 1. Diagnósticos citológicos

Diagnósticos	f	%
Normales (DLN)	2	3
Cambios Reactivos Inespecíficos (CRI)	36	49
Infección Bacteriana	16	22
Infección Mixta: Bacterias + Tricomonas	4	5
Infección Candida sp.	4	5
Infección Mixta: Bacterias + Candida sp.	2	3
Infección Mixta: Candida sp.+ Tricomonas	1	1
Células Epiteliales Anormales (CEA)	9	12
Total	74	100

En 97% de los frotis analizados se observó algún tipo de condición reactiva, inflamatoria o atípia: 85% presentó cambios reactivos inespecíficos (CRI) o condiciones infecciosas y 12% células epiteliales anormales (CEA), de los cuales 78% (7/9) fueron ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) y 22% (2/9) LEIBG (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado). La mayor prevalencia de casos con alteraciones citológicas 19% (4 ASCUS/21 mujeres evaluadas) se observó en el grupo de 35 a 44 años de edad, ocupando el segundo lugar con 16,6% (2/12) el grupo de menores de 25 años (una ASCUS y una LIEBG). No se identificó lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

De las 74 muestras evaluadas para el diagnóstico molecular de VPH, 27% resultaron positivas para la infección viral. En la Tabla 2, se observa la prevalencia de infección por VPH y los genotipos detectados distribuidos según grupos de edad

Tabla 2. Prevalencia de VPH y genotipos según edad en años

.

Grupos etarios	Total evaluado	Total positivas	Prevalencia (%) VPH	Tipo 11	Tipo 6	Tipos 6+11	Tipo 18	No tipificable
> 25	12	4	33,3	2	1	-	1	-
25-34	24	4	16,6	2	-	1	-	1
35-44	21	4	19,0	-	2	1	-	1
45-54	9	6	66,6	3	2	1	-	-
55-65	4	-	-	-	-	-	-	-
> 65	4	2	50	1	-	1	-	-
Total	74	20	27	8	5	4	1	2

Genotipos de bajo riesgo 85%, de las cuales infecciones simples 65%, infecciones mixtas 20%. La Tabla 3, permite relacionar la prevalencia de infección por VPH y los diferentes genotipos de VPH con el diagnóstico citológico.

Tabla 3. Genotipo de VPH según diagnóstico citológico

Diagnóstico citológico	Total evaluadas	Total positivas	Tipo 11	Tipo 6	Tipos 6+11	Tipo 18	No tipificable	Prevalencia (%)
Normales	2	-	-	-	-	.	-	0
CEA	9	3	-	2	-	1	-	33,3
CRI/ infecciones	63	17 (85%)	8	3	4	-	2	26,9
Total	74	20	8	5	4	1	2	27

DISCUSIÓN

La incidencia y la prevalencia de las infecciones por VPH en la población general son muy diversas (20). A pesar del gran número de reportes publicados, los datos disponibles son de utilidad limitada debido a la variedad de los sistemas de detección y a las muestras parciales examinadas, generalmente conformadas por participantes de edad restringida en los programas de tamizaje u otras consultas (21). Tradicionalmente las alteraciones en las células del cuello uterino producidas por el VPH son reveladas por estudio citológico (Papanicolaou) y recientemente por la detección de secuencia viral por métodos de biología molecular. En Venezuela la prevalencia y distribución de tipos de VPH es poco conocida.

En nuestro estudio, 12% (9/74) de las mujeres evaluadas tuvo CEA en la citología, frecuencia similar ha sido reportada en otro estudio realizado en área urbana de Venezuela: 12,4% en la ciudad de Barquisimeto, Estado Lara (22). Igualmente, en otras latitudes: Europa: 11,1%, Irlanda (23); y 10,8% en pacientes voluntarias del estudio poblacional de Gran Canarias – España (24). Sin embargo, este porcentaje es mayor al reportado por el mismo método, durante el quinquenio 1999 – 2004, en el Municipio Lima Blanco, Estado Cojedes-Venezuela de 5,3% (25) y otras poblaciones latinoamericanas: 8,8% São Paulo, Campinas y Porto Alegre, Brasil (26); 3,6% Chile (27); 1,2% Uruguay (28) y 0,6% en una región rural de la Amazona Boliviana (29).

En cuanto al tipo de alteración celular, en este estudio predominaron las consistentes con ASCUS 78% (7/9) y LEIBG 22% (2/9), frecuencia similar a la reportada en Gran Canarias (24); diferente a la de Barquisimeto con 22,2% de ASCUS y 77,8% de LEIBG. (22). La frecuencia porcentual de estas alteraciones fue ligeramente mayor en el grupo etáreo de 35 a 44 años, en relación con el grupo de mujeres menores de 25 años, en contraste con los estudios ya mencionados (22,24) que reportan mayor frecuencia de alteraciones citológicas en mujeres menores de 25 años. Por otro lado, se evidenció un porcentaje elevado de mujeres con cambios reactivos inespecíficos en la citología (49%), o procesos infecciosos de diversa etiología (36%), los cuales han sido considerados condicionantes de alteración en la ecología vaginal (30) que

eventualmente pudieran favorecer la instalación y persistencia de infección por VPH; siendo además indicio de deficiencia en la salud ginecológica de este grupo. Similares hallazgos han sido reportados en otras poblaciones rurales de América Latina (27,29).

La prevalencia total de infección por VPH en el presente estudio fue 27%, similar a la detectada en Norteamérica 26,8% (31). Sin embargo, es menor a la reportada en otras ciudades de países latinoamericanos como: Posadas-Argentina 61% (32), Rio de Janeiro-Brasil 50,1% (33); Ushuaia-Argentina 41% (34), y Cauca-Colombia 36% (35); mientras fue mayor que en otras regiones latinoamericanas como: Concordia-Argentina 16,6% (36), México 14,4% (37), Chile 14% (27), áreas urbanas de Colombia 10-15% (35), Guacanaste-Costa Rica 8,6% (38) y Europa: Irlanda 19,8% (23) Gran Canarias 11,4% (24).

La distribución por edad de la infección por VPH y sus genotipos ha sido variable en regiones del mundo y aún en diferentes grupos de una misma área geográfica (39). En nuestro estudio detectamos dos picos de prevalencia, el primero en menores de 25 años (33,3%) y el segundo en el grupo de 45 a 54 años (66,6%), con ligera disminución (50%) en el grupo de mayores de 65 años; no observamos casos entre 55 a 65 años. Los genotipos predominantes (85%) son de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR), en el siguiente orden de frecuencia: 11, 6 y coinfección 6+11. Consistente con estos datos, otros autores han referido un patrón epidemiológico de distribución similar para VPH-BR (27, 36). Cabe destacar, que se detectó un solo caso con VPH de alto riesgo (VPH-AR), tipo 18, en una paciente de 22 años. No obstante, el 10% de los casos positivos, no pudieron ser tipificados por la metodología empleada y estos pueden pertenecer a cualquiera de los tipos VPH-AR o BR (conocidos o desconocidos) con afinidad por el tracto genital, que no se encuentran en el Kit utilizado.

Al relacionar los genotipos de VPH con los diagnósticos citológicos, observamos que las dos mujeres con citología dentro de limites normales (DLN) resultaron negativas para ADN de VPH. Asimismo, 27% de las pacientes con citologías negativas pero con cambios reactivos o infecciosos y 33% de las mujeres con CEA, resultaron positivas para la presencia de genoma viral: dos con infección por VPH-BR (tipo 6) diagnosticadas como ASCUS y una VPH-AR (tipo 18), LEI-BG.

Por otro lado, 85% de los casos positivos para VPH correspondieron a pacientes con citologías negativas para malignidad y 15% a pacientes con CEA. Diversos estudios han comunicado la asociación de la infección por VPH, tanto en citologías normales como alteradas, pero fundamentalmente con genotipos de AR (12,26), estando directamente relacionada con la gravedad de la alteración citológica: 14,3% en citologías inflamatorias, 43% en ASCUS, 63% en LEIBG, 78% en LEIAG y 100% en CaCu (26). Investigadores venezolanos han reportado 70% y 45% de positividad para VPH-AR en LEI-BG/LEI-AG corroboradas por biopsia y citologías normales respectivamente (12).

Adicionalmente, 67% (6/9) de las mujeres con CEA en la citología, resultaron negativas para ADN de VPH, un caso con diagnóstico de LEI-BG. VPH negativo en LEI-BG, utilizando la misma metodología, ha sido reportada en África (40) y en Costa Rica (41).

Esta investigación representa el primer estudio de campo en Venezuela, descriptivo, transversal y prospectivo en mujeres de 17 a 70 años de edad de una comunidad rural. Los resultados obtenidos tienen carácter preliminar, proporcionan datos útiles acerca del estado de la infección por VPH en el grupo evaluado. Los diagnósticos citológicos evidencian carencia de salud ginecológica; la prevalencia total de la infección por VPH es relativamente alta (27%); predominan genotipos de BR distribuidos en dos picos de frecuencia en los grupos etáreos extremos y hay mayor porcentaje de infección en mujeres con citologías negativas (85%) que en citologías alteradas (15%). El seguimiento del subgrupo de casos positivos para la presencia de genoma viral proporcionará datos regionales relevantes acerca de la dinámica de la infección por VPH, aspecto de suma importancia para establecer alternativas en programas de prevención secundaria y primaria adaptados a la realidad local.

AGRADECIMIENTOS*: a todas las pacientes participantes; a los Dres Miguel Carolino, Pedro Manuel Sánchez y María Malaspina por la toma de muestras celulares; al Sr. Hernán José Fernandez promotor de salud; a todo el personal paramédico de los ambulatorios de salud; al personal del laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital General de San Carlos; a la Lic. Laura García del área de informática del CIET-UC y muy especialmente al Fonacit proyecto G2005000408 y CDCH 2395-2004.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Muñoz N, Castellsagué X. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine 2006; 24 (Supl 3): 1-
2. Bosch FX, Lorinez A, Meijer CJL, Shad KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002; 55: 244-265.
3. WHO. Incidence and natural history of cervical cancer: Progress in Reproductive Healt. Cancer Researh 2004; 65: 1-2.
4. Parkin DM, Bray F. The burden of HPV – related cancers. Vaccine 2006; 24 (Supl 3): 12-25.
5. Schiffman M, Castle P. The promise of global cervical-cancer prevention. N Engl J Med 2005; 353: 2101-2104.
6. Muños N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Eng J Med 2003; 348: 518-527.
7. Denny L, Quinn M, Sankaranarayanan R. Screening for cervical cancer in developing countries. Vaccine 2006; 24 (Supl 3): 71-77
8. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Achievements and limitations of cervical cytology sceening. Vaccine 2006; 24 (Supl 3): 63-70.
9. Ministerio de Salud. Dirección General de Epidemiología. Anuario de Mortalidad 2005. República Bolivariana de Venezuela. Disponible en: www.msds.gov.ve
10. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Am J Med. 1997; 102: 3-8
11. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 1998; 338: 423-4
12. Correnti M, Cavazza M, Alfonso B, Lozada C. La Infección por el Virus de Papiloma Humano: un problema de salud pública en Venezuela. VITAE Academia Biomédica Digital 2002; 13. Disponible en: http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeTrece/Articulos/Infectologia/HTML/
13. Camaro J. Importancia de la Tipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH). Rev Venez Oncol 2002; 14: 175-177

14. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. División de Oncología. Manual de procedimientos para el funcionamiento de los laboratorios de citología adscritos al programa de control de cáncer de cuello uterino. Venezuela; 1999.

15. García Tamayo J. Actualización sobre la historia del virus del papiloma humano en Venezuela y su relación con el cáncer cervical. VITAE Academia Biomédica Digital. 2006; 27. Disponible en: http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=7&n=228

16. Contreras Irazabal L. Vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH) ¿Cual será su impacto en Venezuela?. Tópicos de actualidad. Salus 2007; 11: 3-4.

17. Blandenier C, Montenegro E. Compendio de coloraciones histológicas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas: BOD, 2004.

18. Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. Definitions, criteria, and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag;1994.

19. Solomon D, Davey D, Kurgan R, Moriarty A, O´Connor D, Prey M, et al. Terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA 2002; 287: 2114-2119.

20. Barboza Quintana O, Garza Guajardo R. Virus Papiloma Humano (VPH). En: Alonso P, Lazcano E, Hernández M, editores. Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control, 2da ed. México: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2005.p.57-64

21. Bosch FX. Epidemiología de las infecciones por el virus del papiloma humano: nuevas opciones para la prevención del cáncer cervicouterino. En: Alonso P, Lazcano E, Hernández M, editores. Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control, 2da ed. México: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2005.p 203-218.

22. Alterio G, Mendoza I, Mendoza R, Peraza E, Pérez H, Sanchez A. Hallazgos citológicos y factores de riesgo para patología preinvasora e invasora de cuello uterino. Área de influencia del ambulatorio urbano tipo II "Dr. Rafael Pereira". Barquisimeto, Estado Lara (Venezuela). RESPYN 2007.Disponible en http://www.respyn.uanl.mx/viii/3/index.html.

23. Keegan H, Ryan F, Malkin A, Griffin M, Lambkin H. Human Papillomavirus Prevalence and genotypes in an opportunistically screened Irish female population. British Journal of Biomedical Science 2007. Disponible en: http://findarticles.com/p/articles/mi_qa3874/is_200701/ai_n19512090/print

24. Andujar M, Pavcóvich M, Sánchez MA, Torres A, Arias MD, De Lera JM, et al. Prevalencia de la infección cervical por el virus papiloma humano en la población femenina de Gran Canaria. Estudio Poblacional. Resultados preliminares. VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet. Disponible en: http://www.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion.asp?id_trabajo=558

25. Pandare M, Padilla B. Lesiones precursoras de cáncer de cuello uterino en el municipio Lima Blanco. Estado Cojedes, 1999-2004. [Tesis de Grado]. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo; 2005

26. Rama CH, Roteli-Martins CM, Mauricette SF, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Zanatta Sarian LO, et al. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer. Rev Saúde Pública 2008; 42: 1-7.

27. Ferreccio C, Prado R, Luzoro A, Ampuera S, Snijders P, Meijers C, et al. Prevalencia poblacional y distribución por edad del Virus Papiloma Humano entre mujeres en Santiago, Chile. Boletín de la Escuela de Medicina 2005; 30: 34-39.

28. Rodríguez G, Barrios E, Vasallo J. Características epidemiológicas de una población que accedió al programa de prevención de cáncer de cuello uterino en Uruguay Rev Med Uruguay 2005; 21: 200-206.