

Fecha de recepción: 14/03/2014
Fecha de aceptación: 02/05/2014

VOLUMEN 8 , No 1
JULIO 2014
Páginas 64 - 69

**DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DEL
VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO**

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Odalís Beatríz Astudillo González*

Carlos Flores Montesinos**

María Rosa Espinoza Salamea***

* Bioquímica Farmacéutica,
Docente de la Universidad
Católica de Cuenca

** Médico Infectólogo, Clínica
Latino, Docente de la Universidad
Católica de Cuenca

*** Bachelors's Degree in Biology,
estudiante de la Facultad de Medicina
de la Universidad Católica de Cuenca

CORRESPONDENCIA:
BQF. Odalis Astudillo
(odalisa16@hotmail.com)

RESUMEN

Se estima que el virus del papiloma virus (VPH) es la infección por transmisión sexual (ITS) más frecuente en el mundo, afectando a hombres y mujeres por igual. En mujeres, el VPH es el factor etiológico del cáncer cervical (CC). Actualmente, el principal acercamiento para la prevención del CC ha sido a través de programas de detección oportuna del cáncer, lo cual se ha realizado mediante un estudio citológico del Papanicolaou (Pap) para la detección de lesiones precursoras.

Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de la prueba de Pap depende de la destreza del observador en el reconocimiento y clasificación de diferentes anomalías en las células. El desarrollo de sistemas de diagnóstico temprano para la detección de la infección por VPH ha sido problemático debido a que tanto la citología como la colposcopia identifican la lesión cervical en estadios muy avanzados. De esta forma, la aplicación de las pruebas moleculares ha sido exitosa en el diagnóstico temprano del CC. Existen diferentes compañías que han desarrollado, manufacturado y comercializado pruebas diagnósticas basadas en identificación de genes para el tamizaje, monitoreo y diagnóstico de VPH. Estas técnicas moleculares se basan en el reconocimiento de secuencias de ADN de VPH por medio de hibridación del ADN, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), captura de híbridos (hybrid capture) y el sistema de línea reversa (reverse line blot). Nuestra revisión se enfoca a las técnicas moleculares utilizadas para detectar el VPH, como factor de riesgo del CC.

Palabras claves: Virus del papiloma humano, infección cervical, cáncer cervical, diagnóstico de cáncer cervical.

ABSTRACT

It is estimated that human papilloma virus (HPV) is a sexually transmitted infection (STI) most frequent in the world, affecting men and women equally. In women, HPV is the etiological factor for cervical cancer (CC). Currently, the main approach for prevention of CC has been through programs of early detection of cancer, which have been carried through Pap cytology (Pap) for the detection of precursory lesions. However, the sensitivity and specificity of the Pap test depends on the skill of the observer in the recognition and classification of different cell abnormalities. The development of systems for early detection of HPV infection diagnosis has been problematic because both cytology and colposcopy methods identify cervical lesion in advanced stages. Thus, the application of molecular testing has been successful in the early diagnosis of CC. There exist several companies that have developed, manufactured and marketed diagnostic tests based on identification of genes for screening,

monitoring and diagnosis of HPV. These techniques rely on molecular recognition of HPV DNA sequences by hybridization of DNA, PCR (chain reaction polymerase), hybrid capture and reverse line blot systems. Our review focuses on the molecular techniques used to detect HPV, as risk factor for CC.

Key words: Human papillomavirus, cervical infection, cervical cancer, diagnosis of cervical cancer.

INTRODUCCIÓN:

El CC es uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo y es responsable de 231.000 muertes cada año. Más del 80 % de los 500.000 nuevos casos de CC se diagnostican en los países en desarrollo y en América Latina es la región con las tasas de incidencia más altas del mundo (1), en Ecuador 4 millones de mujeres están en riesgo de desarrollar cáncer cervical siendo la tasa de incidencia de 20 casos por cada 100.000 según Datos del Registro Nacional de Tumores de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (Solca) (2,3).

El VPH factor etiológico del CC pertenece a la familia Papillomaviridae y al género Papillomavirus, son un grupo de virus de ADN divergentes, de los cuales un grupo selecto(4) Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus y Gamma-papillomavirus infectan humanos. En la actualidad, más de 200 tipos de VPH han sido identificados, los cuales tienen tropismo por epitelios escamosos estratificados, infectando piel, mucosa oral y/o del tracto ano-genital.(5)

Los tipos de VPH transmitidos por vía sexual son aproximadamente 40, y se pueden clasificar según la homología de sus genomas, y de acuerdo al riesgo de transformación maligna de la siguiente forma: alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 56, 59, 66, 68 y 70, riesgo intermedio: 50, 51, 52, 53, 58 y 83, y bajo riesgo: 6, 11, 32, 42, 43, 44, 54 y 81. Estos tipos virales son los más comunes en lesiones cervicales y han sido utilizados como sondas para el diagnóstico molecular.(4,5,6)

Estudios recientes han demostrado que el ADN del VPH se puede encontrar en el 99,7 % de

todos los carcinomas cervicales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido el VPH - 16 y HPV- 18 como agentes cancerígenos para los humanos.(1,7) Un ensayo clínico tradicional para el diagnóstico de la infección por VPH es la técnica de tinción Papanicolaou (Pap) para los programas de despistaje y tamizaje, esta técnica es una herramienta muy útil, por su fácil realización y su bajo costo, no obstante tiene poca reproducibilidad y una sensibilidad y especificidad variable dependiente de la experiencia del personal que la realiza. Como consecuencia, se estima que aproximadamente el 50 % de las infecciones VPH positivas pasan desapercibidas por Pap; es entonces, su alta tasa de falsos negativos su limitación más importante, según Franco y Col. un tercio de los diagnósticos falsos-negativos se pueden atribuir a errores en la interpretación de la lámina y los otros dos tercios a la calidad de la preparación de la misma. (4,8)

De esta manera, el uso de técnicas moleculares son sumamente sensibles y específicas, sin embargo, estas técnicas no se aplican con frecuencia debido a los costos. El objetivo de este trabajo es enfocar las técnicas moleculares utilizadas para detectar el VPH, como factor de riesgo del CC su utilización para el diagnóstico y la tipificación de VPH en pacientes con antecedentes clínicos y patológicos de infección por VPH.(1,9). La asociación de los resultados de prueba citológico convencional con las técnicas moleculares es de gran importancia y ayuda para entender mejor la evolución de la infección por VPH en diferentes contextos epidemiológicos.(10)

DESARROLLO:

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae posee un ADN circular de doble hebra con 7.900 pares de bases, que se encuentra asociado con histonas formando un complejo similar a la cromatina, no posee envoltura, su cápside icosaédrica está compuesta por 72 capsómeros. (9) El genoma de VPH contiene en promedio ocho marcos de lectura abierta (ORF) importantes que son expresados a través de ARNm policistrónicos, transcritos de una sola hebra de ADN, su ADN se puede dividir en tres secciones: una región de control (LCR, long control region) una región temprana E (early) y una región tardía L (late). La

región LCR contiene un centro promotor llamado p97 (en VPH16) o p105 (en VPH 18) que permite potenciar o silenciar secuencias que regulan la replicación del ADN mediante el control de la transcripción de los ORF(11), además esta región contiene la mayor variación genética entre un tipo viral y otro. Las proteínas E1 y E2 transcritas a partir de la región temprana son responsables de la replicación viral y expresión génica, la región tardía codifica para las proteínas L1 y L2, componentes de 95 y 5%, respectivamente, de la cápside viral. Las proteínas E6 y E7 de los virus de alto riesgo son las principales mediadoras de la carcinogénesis, debido a su interacción con varios blancos celulares.(5,12,13)

En la actualidad no existe un ensayo serológico confiable que permita diagnosticar la infección por VPH y el desarrollo de este ensayo tiene que enfrentar graves obstáculos, en primer lugar, el poco conocimiento que se tiene sobre los mecanismos de respuesta inmune del huésped a la infección y la evasión de esta respuesta por parte del virus, en segundo lugar, el hecho de no poder disponer de una proteína viral suficientemente antigénica en cantidades abundantes para desarrollar el ensayo; y por último la incapacidad de poder cultivar el virus in vitro, debido a que éste sólo prolifera en células diferenciadas permisivas y éstas no pueden mantenerse en cultivo. Puesto que el VPH se considera el agente etiológico del CC, surge la necesidad de disponer de ensayos que permitan el diagnóstico temprano de la infección por VPH.(4)

La prueba de Papanicolaou es el método más utilizado en el diagnóstico precoz de las lesiones cervicales, como se mencionó anteriormente según resultados de los meta-análisis sugieren que la prueba de Papanicolaou tiene una gran variación en la sensibilidad para detectar lesiones histológicas, por lo que métodos alternativos y tecnológicamente diferentes, han sido sugeridos para el cribado de cáncer de cuello uterino, entre ellas pruebas de virus del papiloma humano (VPH) por medio de la biología molecular.(14)

La detección de ADN de VPH se ha utilizado como un marcador de la presencia del virus en una lesión cervical, aunque esto no es indicativo de una infección productiva o presencia de una

lesión cervical, por lo tanto, lesiones clínicas y alteraciones citológicas siguen siendo los métodos más frecuentes utilizados para identificar lesiones precancerosas, algunos de los cuales pueden estar asociados con la presencia de infección por VPH. Sin embargo, hoy en día los médicos están haciendo mal uso de pruebas de Papanicolaou y la colposcopia para diagnosticar las lesiones virales. Por esta razón, las técnicas moleculares se han introducido recientemente para detectar el ADN del VPH en muestras cervicales que en combinación con pruebas de Papanicolaou y la colposcopia, tienen como objetivo identificar a las mujeres infectadas por el VPH en riesgo de desarrollar CC. (1)

Hay varias técnicas moleculares utilizadas para la detección de ADN de VPH, la mayoría de los cuales se utilizan para fines de investigación. Estos incluyen:

PCR:

Las técnicas de detección y genotipificación de VPH se basan, principalmente, en la amplificación del genoma del virus mediante PCR, para posteriormente desarrollar un método complementario que permita discriminar, ya sea, los grupos de VPH de alto o bajo riesgo, o los genotipos individuales.(16) La PCR es una técnica molecular poderosa, se ha utilizado en el campo del diagnóstico desde sus inicios por su sensibilidad y especificidad, capaz de detectar entre 10 y 200 copias de genoma viral por muestra. (10) Esta técnica es capaz de detectar el ADN diana mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores que complementan de forma específica con las regiones flanqueantes del ADN a amplificar, mediante ciclos sucesivos de desnaturalización, anclaje y extensión, el ADN es amplificado muchas veces hasta obtener una señal fácilmente visible en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Puesto que el anclaje de los oligos es específica, la señal se obtiene si el ADN diana está presente en la muestra.

La PCR es una prueba para detectar presencia de VPH, mientras que el análisis histopatológico busca determinar la presencia de lesiones más allá de si éstas se encuentran asociadas o no al VPH.(4) En la actualidad, varios cebadores de

diferentes genes de VPH han sido diseñados, pero las más populares se basan en el gen L1.(1,4) La infección productiva genera numerosas partículas virales fácilmente detectables por la PCR, generalmente ocurre en lesiones de bajo grado, mientras que en estado de latencia el virus no se replica activamente permaneciendo en las células infectadas en una copia en estado episomal o integrada a un cromosoma del genoma celular, en ambos casos no hay replicación del genoma viral, esto puede ocurrir en lesiones de alto grado. El estado de latencia afecta la sensibilidad de la PCR, sobre todo si la muestra fue tomada de una zona donde las células portadoras son escasas o están ausentes. Esto puede explicar que muestras resulten negativas por PCR.(15)

HIBRIDACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO.

Moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla que son complementarias entre sí formarán híbridos en condiciones apropiadas. Pruebas de hibridación se basan en este fenómeno y que emplean moléculas etiquetadas (sondas) para detectar moléculas específicas diana complementaria. La hibridación de ácidos nucleicos es el método más sensible para la detección de VPH en muestras clínicas y el único capaz de identificar los tipos específicos del VPH. Hay muchos formatos de ensayo de hibridación alternativos; la hibridación Southern blot sigue siendo la prueba más sensible y específica para el ADN del VPH, pero tiene el inconveniente de ser también el que más tiempo consume.(12)

Entre las varias técnicas de biología molecular utilizadas esta la hibridación dot blot, donde sondas de oligonucleótidos de VPH específicos se inmovilizan sobre una fase sólida y se hibridaron a un producto de PCR en la fase líquida. Este procedimiento es complicado, especialmente cuando se trata de detectar los tipos de VPH separadas, porque requiere rondas separadas de hibridación para cada tipo detectado. Por otro lado, los sistemas de hibridación inversa proporcionan una herramienta atractiva para la hibridación simultánea de un producto de PCR de múltiples sondas de oligonucleótidos (17), es la técnica más sensible en una sola reacción es capaz de detectar hasta 40 genotipos virales en 40 muestras al mismo tiempo, lo cual no ocurre con

otras metodologías. Además un mismo ensayo puede determinar infecciones múltiples, sin dificultad en la lectura e interpretación.(16)

CAPTURA DE HÍBRIDOS

Captura de híbridos es uno de los métodos más utilizados para detectar VPH en muestras de citología cérvico-uterina, cuenta con la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) de E.U.A, es un ensayo de amplificación de la señal que utiliza una combinación de captura de anticuerpo y quimioluminiscencia, para la detección de señales utilizando un pool de oligosondas de ARN complementarias a algunos genotipos de VPH, formando una unión única entre ADN-ARN que es reconocida por un anticuerpo específico. Se utiliza como método de tamizaje, aunque sólo permite discriminar entre tipos virales de alto y bajo riesgo oncogénico, sin informar sobre el genotipo viral específico (5,17), por lo que debe acompañarse de otra técnica de análisis que permita la tipificación del virus, como por ejemplo, la hibridación con sondas tipo-específicas, análisis de secuencia o análisis de restricción (4), este ensayo tiene entre sus ventajas la sencillez de su ejecución.(17)

CONCLUSIONES

La detección precoz a través de los programas de tamizaje basados en citología, han mostrado una impresionante reducción en la incidencia de cáncer de cuello uterino, sin embargo mujeres con un historial de resultados de Papanicolaou normales

todavía desarrollan cáncer cervical, es ahí donde se encuentran algunos de los puntos débiles de la prueba, la sensibilidad y especificidad variable, la necesidad frecuente de repetición de la prueba, lo que aumenta los costos considerablemente y la eficacia de la prevención. Considerando estos elementos publicados en estudios anteriores, se hace indispensable buscar nuevas estrategias para prevenir este cáncer, tales como la incorporación de pruebas moleculares.

Métodos sensibles para detectar ADN del VPH mencionados anteriormente, en adición de una prueba de la citología, aumentan la sensibilidad de detección. Si un paciente es negativo para ADN de VPH y tiene una prueba de Papanicolaou negativo, el médico puede estar seguro de que no hay riesgo de enfermedad neoplásica.

Las mujeres que tienen el ADN del VPH positivo, pero que no tienen una prueba de Papanicolaou anormal o evidencia clínica de enfermedad relacionada con el VPH no deben ser vistos como tener pruebas “falso positivo” estas son las mujeres con mayor riesgo de desarrollar una prueba anormal de Papanicolaou y cáncer cérvico uterino en un futuro, como lo demuestra el Portland, Copenhague, y los investigadores Reims. Estas mujeres pueden ser manejadas por un seguimiento cercano y repetir la prueba.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses de ningún tipo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA:

Referencias Bibliográficas

1. Gutiérrez-Xicoténcatl Lourdes, Plett-Torres Tanya, Madrid-González Claudia L, Madrid- Marina Vicente. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. Salud pública Méx [revista en la Internet]. 2009 [citado 2014 Abr 03]; 51(Suppl 3): s479-s488. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900014&lng=es.
2. Agencia pública de noticias Andes. En Ecuador, 20 de cada 100.000 mujeres padecen cáncer uterino. En prensa 2013. Disponible en: <http://www.andes.info.ec/es/sociedad/ecuador-20-cada-100000-mujeres-padecen-cancer-uterino.html>
3. Marco Antonio Pino, María Augusta Albán. Análisis de la situación del cáncer de cérvix uterino en el Ecuador, REV ESP PATOL 2008 [citado 2014 Abr 04]; Vol. 41, n. 01: 41- 47, 2006. URL disponible en: <http://www.pgmaonline.es/revpatologia/volumen41/vol41-num1/pdf%20patologia%2041-1/41-01-07.pdf>
4. Quintero Vega Militza, Cruz Gómez Jhon Fredy, Bastidas Marco, Márquez Lusmary, Puig Pons Juan. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. Rev Obstet Ginecol Venez [revista en la Internet]. 2008 Mar [citado 2014 Abr 03]; 68(1): 25-31. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S004877322008000100006&lng=es.
5. Silva Ramón, León Daniela, Brebi Priscilla, Ili Carmen, Roa Juan C, Sánchez Raúl. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. Rev. chilena infectología. [revista en la Internet] 30 (2): 186-192. [Citado 2014 Abr 07]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000200009&lng=es <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000200009>. Virus del papiloma humano
6. Karger Ag. Basel. Human papillomavirus genomics: past, present and future;

[citado 2014 Abr 04]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643174>

7. Silva Ramón, León Daniela, Brebi Priscilla, Ili Carmen, Roa Juan C, Sánchez Raúl. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev. chilena infectología*. [revista en la Internet] 30 (2): 186-192. [Citado 2014 Abr 07]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000200009&Ing=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000200009>. Virus del papiloma humano

8. Reigosa Yániz Aldo R. Sobre el Virus del Papiloma Humano (VPH), su historia natural y diagnóstico. *Salus* [revista en la Internet]. 2012 Abr [citado 2014 Abr 15]; 16(1): 3-4. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382012000100002&Ing=es.

9. Cañadas M Paz, Lloveras Belén, Lorincz Attila, Ejarque Maijo, Font Rebeca, Bosch F. Xavier et al. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud pública Méx* [revista en la Internet]. 2006 Oct [citado 2014 Abr 05]; 48 (5): 373-378. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000500003&Ing=es

10. Sotiropoulos Tsiodras, John Georgoulakis, Aikaterini Chranioti, Zanis Voulgaris, Amanda Psyri, Angeliki Tsvilika, John Panayiotides, Petros Karakitsos. Hybrid capture vs. PCR screening of cervical human papilloma virus infections. *Cytological and histological associations in 1270 women*. *BMC Cancer* 2010 [citado 2014 Abr 06]. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2407-10-53.pdf>

11. Gatta LBI, Berenzi A, Balzarini P, Dessy E, Angiero F, Alessandri G, Gambino A, Grigolato P, Benetti. Diagnostic implications of L1, p16, and Ki-67 proteins and HPV DNA in low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2011 [Citado 2014 Abr 06] Nov; 30(6):597-604. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21979598>

12. Miura KI, Mishima H, Kinoshita A, Hayashida C, Abe S, Tokunaga K, Masuzaki H, Yoshiura KI. *J. Med. Virol.* © 2014 Wiley Periodicals. Genome-wide association study of HPV-associated cervical cancer in Japanese women. *J Med*

Virol. 2014 Apr 4. [Citado 2014 Abr 06] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24700089>

13. 17.- Rivera Z René, Delgado D Jorge, Painei P Vicente, Barrero P Raúl, Larraín H Angélica. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev. chil. obstet. ginecol.* [revista en la Internet]. 2006 [citado 2014 Abr 15]; 71 (2): 135-140. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775262006000200011&Ing=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262006000200011>.

14. Gontijo Renata Clementino, Derchain Sophie Françoise Mauricette, Montemor Eliana Borin Lopes, Sarian Luis Otávio Zanatta, Serra Márcia Milena Pivatto, Zeferino Luiz Carlos et al. Citología oncológica, captura de híbridos II e inspeção visual no rastreamento de lesões cervicais. *Cad. Saúde Pública*. [Serial on the Internet]. 2005 Feb [citado en 2014 Abr 11]; 21(1): 141-149. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2005000100016&Ing=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2005000100016>.

15. Snijders PJ, Van Den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity; *J Pathol*. 2003 [Citado 2014 Abr 04] Sep;201(1):1-6 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950011>

16. Lörincz Attila T. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud pública Méx* [revista en la Internet]. 2003 [citado 2014 Abr 11]; 45 (Suppl 3): 376-387. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342003000900012&Ing=es.

17. Clavel C, Masure M, Bory J, Putaud I, Mangeonjean C, Birembaut P, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *British Journal of Cancer* [serial on the Internet]. (2001, June 15), [cited April 9, 2014]; 84(12): 1616. Disponible en: <http://www.nature.com/bjc/journal/v84/n12/full/6691845a.html>

Bibliografía Consultada

18. Marie-Hélène Mayrand, Eliane Duarte, Isabel Rodrigues, Stephen D. Walter, James Hanley, Alex Ferenczy, Sam Ratnam, François Coutlée, and Eduardo L. Franco. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2007; [Citado 2014 Abr 08] 357:1579-1588. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa071430>

19. Aumayr K1, Susani M, Horvat R, Wrba F, Mazal P, Klatter T, Koller A, Neudert B, Haitel A. P16INK4A immunohistochemistry for detection of human papilloma virus-associated penile squamous cell carcinoma is superior to in-situ hybridization. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013 [Citado 2014 Abr 01] Jul-Sep; 26(3):611-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24067458>

20. Miura KI, Mishima H, Kinoshita A, Hayashida C, Abe S, Tokunaga K, Masuzaki H, Yoshiura KI. *J. Med. Virol.* Genome-wide association study of HPV-associated cervical cancer in Japanese women. *J Med Virol*. [Citado 2014 Abr 05]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24700089>

21. Mihret W, Yusuf L, Abebe M, Yamuah LK, Bekele L, Abate E, Wassie L, Engers H, Aseffa A. A pilot study on detection and genotyping of human papilloma virus isolated from clinically diagnosed Ethiopian women having cervical intraepithelial neoplasia. *Ethiop Med J*. 2014 [Citado 2014 Abr 04] Jan; Suppl 1:49-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696989>

22. Prakash P, Singh S, Dhakad C, Pandey S, Kumar M, Pandey LK, Kar AG, Nath G, Gulati AK. Nested Multiplex (NMPCR) Detection of Human Papillomavirus (HPV) 16 and 18 in Pre-invasive Lesions and its Implication in Screening of

Carcinoma Cervix (CaCx). *J Clin Diagn Res*. 2014 Feb; 8(2):110-3. [Citado 2014 Abr 11] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24701497>

23. Michelli E1, Téllez L2, Mendoza JA2, Noguera ME3, Milano M4, Vera R2, Callejas D5. Amplificación de human papillomavirus early genes for detection of nine genotypes in Venezuelan women. [Citado 2014 Abr 06]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24502181>

24. Liang WS, Aldrich J, Nasser S, Kurdoglu A, Phillips L, Reiman R, McDonald J, Izatt T, Christoforides A, Baker A, Craig C, Egan JB, Chase DM, Farley JH, Bryce AH, Stewart A K, Borad MJ, Carpten JD, Craig DW, Monk BJ. Simultaneous characterization of somatic events and HPV-18 integration in a metastatic cervical carcinoma patient using DNA and RNA sequencing. *Int J Gynecol Cancer*. 2014 Feb; 24(2):329-38. [Citado 2014 Abr 12] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418928>

25. Birner P, Bachtiry B, Dreier B, Schindl M, Joura EA, Breitenecker G, Oberhuber G. Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. *Mod Pathol*. 2001 Jul; 14(7):702-9. [Citado 2014 Abr 12] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11455003>

26. Tornesello ML, Buonaguro L., Giorgi-Rossi P, Buonaguro LP. Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *Biomed Res Int*. 2013. [Citado 2014 Abr 10] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24383054>