

Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile

Angélica Melo A^{1a}, Sonia Montenegro H², Terryll Hooper², Italo Capurro V³, Juan Carlos Roa S¹, Iván Roa E¹.

Human papilloma virus (HPV) typing in preneoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix in the IX region-Chile

Background: Uterine cervical cancer (UCC) is an important public health problem in Chile. Although HPV infection has been established as the main cause of UCC, little is known of its frequency and distribution in our population. **Aim:** To determine the presence and frequency of viral genotypes in uterine cervical specimens with preneoplastic and neoplastic lesions. **Material and Methods:** Two nested consensus PCRs followed by identification of amplified product by dot-blot hybridization and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to analyze 175 biopsies. **Results:** Detection of HPV was 40% in cases without histological lesion, 88% in low grade lesions, 89% in high grade lesions (HGL) and 93.5% in invasive carcinoma. Of all HPV positive cases, 89.5% were classified as high risk and only a 4.9% of HPV cases were of low risk type. Six percent of cases had multiple infections. Distribution of viral genotypes according to RFLP was: HPV33 (25.3%), 16 (18.7%), 52 (13.3%), 31 (12%), 35 (6.6%), 18 (2.7%). **Conclusions:** Most HPV found in biopsies with HGL and UCC were of high risk genotype. The elevated presence of high risk HPV in patients without cervical lesions may be a factor that explains the high percentage of UCC cases in our region. Most common viral types were: HPV16, 31, 33 and 52. Viral detection and typing may provide valuable information for patient selection and follow up and for allocation of resources (Rev Méd Chile 2003; 131: 1382-90).

(Key Words: Cervix neoplasms; Papillomavirus, human)

Recibido el 19 de mayo, 2003. Aceptado en versión corregida el 25 de septiembre, 2003. Trabajo financiado por la Universidad de La Frontera a través del Proyecto DIUFRO # 2116. ¹Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ²Molecular Immunogenetics Laboratory, Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, LA USA. ³Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ^a Tecnólogo Médico

Correspondencia a: Dr. Juan Carlos Roa. Casilla 54-D. Fax: 45-216273. Temuco, Chile. E mail: jcroa@ufro.cl

El cáncer de cuello uterino (CCU) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en la población femenina a nivel mundial¹. En Chile, es una neoplasia de alta incidencia y mortalidad, ocupando el cuarto lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres. Se estima una tasa bruta de mortalidad de 10,2 x 100.000 y una tasa de mortalidad de 16,7 x 100.000 en mujeres mayores de 15 años^{2,3}. En la IX región (Servicio Araucanía Sur) el CCU corresponde a 68% de los cánceres ginecológicos y constituye la tercera causa de muerte, con una tasa de mortalidad de 9,46 x 100.000 en el año 2000⁴.

El virus papiloma humano (VPH) es considerado uno de los patógenos más comunes transmitidos sexualmente y el principal agente causal de las neoplasias cervicales intraepiteliales (NCI) y el CCU⁵⁻⁷; y está asociado a tumores de la región anogenital, tracto respiratorio alto y digestivo⁸⁻¹⁰.

Las NCI son clasificadas en lesiones de bajo grado (LBG) y lesiones de alto grado (LAG) según el riesgo de transformación neoplásica¹¹. Clásicamente se han agrupado los genotipos virales de VPH en bajo riesgo (BR), alto riesgo (AR) y riesgo intermedio (RI), dependiendo de la frecuencia con que se encuentran en lesiones benignas, LBG, LAG y carcinomas invasores. Los subtipos virales más frecuentemente asociados al grupo de AR son VPH 16, 18, 45 y 56, detectados principalmente en LAG y carcinomas; al grupo de RI VPH 31, 33, 35, 51 y 52 asociados a todos los grados de NCI y el grupo de BR VPH 6, 11, 34, 42, 43 y 44 detectados más frecuentemente en lesiones benignas^{12,13}. En la actualidad, se ha observado que la asociación cáncer-VPH es igualmente poderosa entre los tipos considerados de AR y RI. De este modo, 15 tipos de VPH han sido clasificados como de AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y por lo tanto, deberían ser considerados con potencial oncogénico⁷.

En la mayoría de los casos, las infecciones por VPH son subclínicas (fase latente) y es difícil detectarlas por examen citológico, histopatológico o por técnicas inmunohistoquímicas. Por esta razón los métodos moleculares como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) son recomendados para tamizaje. Se puede utilizar además, sondas de hibridación o ELISA, para aumentar la sensibilidad y especificidad de los productos de PCR, las que

combinadas con el uso de enzimas de restricción (RFLP) y secuenciación, identifican los distintos genotipos virales¹⁴⁻²⁰. La estrategia de diagnóstico es seleccionar genes de VPH de consenso altamente conservados para la detección de la mayoría de los tipos virales del VPH^{18,21}; luego, utilizando pequeñas diferencias en la secuencia del ADN, lograr la tipificación viral^{18,20}. El gen L1 de la región tardía, codifica proteínas estructurales de la cápside altamente conservadas y similares en todos los tipos de VPH. Los genes E6 y E7 (región temprana) codifican proteínas importantes para la transformación neoplásica de la célula epitelial infectada^{22,23}. El potencial oncogénico de los VPH AR (principalmente 16 y 18) radica en la capacidad de integrar su ADN al genoma de la célula huésped y determinar la expresión continua de las oncoproteínas E6/E7; las cuales son capaces de interferir con las funciones de las proteínas p53 y pRb a nivel del ciclo celular favoreciendo la proliferación neoplásica^{24,25}.

No disponemos de información en nuestro medio, sobre la frecuencia y distribución de los subtipos virales en lesiones preneoplásicas (LBG, LAG) y neoplásicas del cuello uterino. El presente estudio considera el análisis genético-molecular de los genotipos virales de VPH en biopsias de archivo de la IX región.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras. Se seleccionaron 175 biopsias de cuello uterino (biopsias colposcópicas, LEEP (*Loop electro-surgical excision procedure*), conizaciones e hysterectomías) desde el archivo del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de La Frontera, obtenidas entre 1996 y 2001 provenientes del Policlínico de Patología Cervical del Hospital de Temuco, correspondientes a 31 casos de carcinomas epidermoides invasores, 47 casos de LAG y 67 casos de LBG²⁶. Se incluyeron además, 30 casos con histología normal.

Extracción del ADN: se microdisecó manualmente, en 5 cortes de 10 micras, la zona de lesión o zona de transformación en los casos sin lesión. El ADN fue extraído con el Kit Purgene™ DNA Isolation System (*Genra Systems USA*) siguiendo las instruc-

ciones del fabricante. El ADN se almacenó a -20°C hasta su análisis. Para verificar su calidad y excluir muestras con ADN no amplificable, todas las muestras fueron previamente analizadas con un control interno mediante PCR con iniciadores para el gen β -globina²⁷. El flujo de muestras y las técnicas empleadas se esquematizan en la Figura 1.

1. *Detección VPH*: Se utilizó el sistema de PCR L1 en nido, usando iniciadores de consenso de secuencias previamente publicadas^{14,21}. Estos iniciadores permiten amplificar un fragmento del gen L1 (450 y 150 pb) y detectar un amplio espectro de tipos de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51-59 y otros subtipos de VPH aún no caracterizados).

Hibridación Dot Blot: Los productos de PCR L1 fueron hibridados según el protocolo de Jacobs y cols¹⁵ con 2 cócteles de sondas específicas para VPH de AR: (VPH 16, 18, 33, 45 y VPH 31, 35, 51, 52) y un cóctel de BR (VPH 6, 11). Dos (2) μl del producto PCR absorbidos, denaturados y fijados

sobre una membrana de nylon fueron incubados a 55°C por 1 h con cada cóctel de sondas marcadas con residuos múltiples de digoxigenina (Dig) mediante la enzima terminal transferasa (*DIG oligonucleotide 3'-end labeling kit, Roche Applied Science*). Luego de lavados de alta y mediana astringencia las membranas se incubaron con conjugado anti-Digoxigenina-fosfatasa alcalina. El revelado de la reacción se realizó con el substrato NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-cloro-3-indolyl phosphato) (Figura 2).

Definición caso positivo: Se consideró una muestra VPH positiva cuando se observó banda del tamaño esperado amplificada por el sistema PCR L1 o en la membrana de hibridación Dot Blot se observó la aparición de una mancha redondeada de color púrpura.

2. *Tipificación de los subtipos virales*: Se utilizó un sistema de PCR de consenso en nido E6/E7, usando los iniciadores LCRs, E7as, PU1M, PU2R, PU31B cuyas secuencias han sido previamente

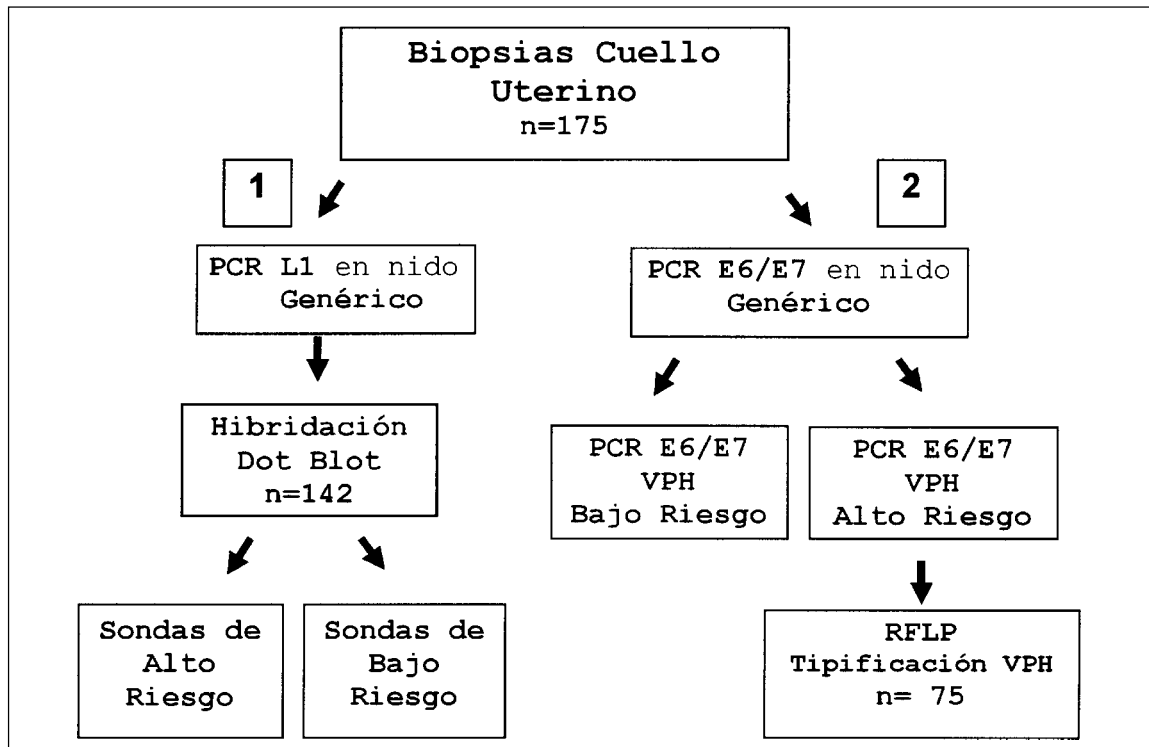


Figura 1. Esquemización del flujo de todas las muestras analizadas: 1. Sistema PCR L1/hibridación Dot Blot. 2. Sistema de PCR E6/E7/RFLP.

descritas^{18,28}. Estos amplifican un segmento de (650-230/270 pb) de los genes E6 y E7 que permiten separar las muestras en 2 subgrupos: AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 52) y BR (VPH 6, 11).

RFLP (Restriction fragment length polymorphism): los productos PCR E6/E7 del subgrupo AR, fueron digeridos con las enzimas de restricción (Promega USA) *AvaII* (corta VPH 16, 18 y 33), *RsaI* (corta VPH 31), *Sau3AI* (corta VPH 52) que cortan una secuencia específica dentro del fragmento amplificado del VPH¹⁸. Se interpretaron los

resultados según el patrón de digestión para cada uno de los tipos virales.

Las condiciones de los PCR en nido (*nested*) fueron: 30 ciclos (primera amplificación) y 40 ciclos (segunda amplificación) y con temperatura de hibridación de 40 a 55°C. Se incluyeron 2 controles positivos (plásmidos VPH 16 y 11), un control blanco y uno negativo (ADN normal). Se visualizó los productos PCR por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% teñidos con bromuro de etidio (Figura 3).

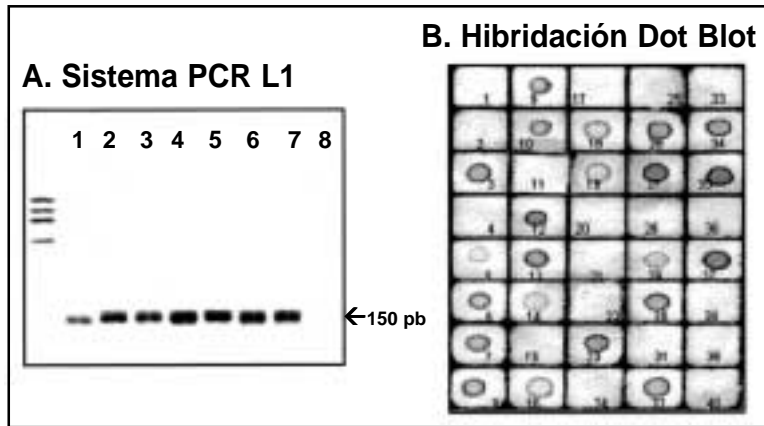


Figura 2. Sistema PCR L1 e hibridación *Dot Blot*: A. Sistema PCR L1, gel de agarosa con producto PCR amplificado indicando muestras positivas (carriles 1-6). Control positivo plásmido VPH16 (carril 7), Control Blanco (carril 8). B. Hibridación *Dot Blot*: membrana de nitrocelulosa mostrando casos positivos y negativos para sondas de AR. Control positivo plásmido VPH 16 (recuadro 37), control negativo (recuadro 39) y control blanco (recuadro 40).

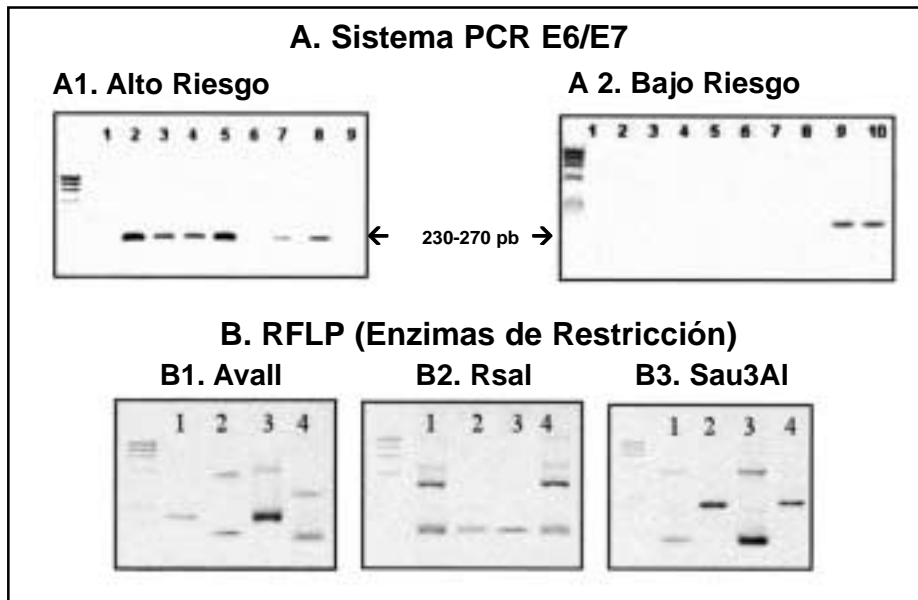


Figura 3. Sistema PCR E6/E7 y RFLP (enzimas de restricción): A1: PCR E6/E7 para alto riesgo. Gel de agarosa muestras positivas (carriles 2-6 y 7). Control positivo AR (carril 8), control positivo BR (carril 9). A2: PCR E6/E7 para bajo riesgo: Gel agarosa muestras negativas, control positivo BR VPH 6 y 11 (carriles 9 y 10). B1.B2 B3: Patrón de digestión de los productos PCR con las enzimas *Ava II* (18, 33, 16), *RsaI* (31) y *Sau3AI* (52).

RESULTADOS

Detección de VPH: La detección del VPH se realizó en 175 muestras. La edad de las pacientes fue entre 18 y 79 años. El sistema de PCR L1 con hibridación *dot blot* detectó VPH en 81% (142/175) de las muestras. Se detectó VPH en 40% de los casos histológicamente normales. Se encontró 88% de casos positivos para VPH en las LBG, 89% en las LAG y en 93,5% de los carcinomas invasores (Tabla 1). Al utilizar los cócteles de sondas AR la positividad para VPH fue de 80,9%, y de 4,9% para el cóctel de sondas de BR, la mayoría encontradas en biopsias con morfología normal. En 7,7% de las muestras, la mayoría en LBG, no fueron reconocidas por los cócteles de

sondas AR y BR. Se observó positividad simultánea para virus VPH AR y BR en 6,3% de los casos, principalmente en LBG (Tabla 2).

Tipificación de los subtipos virales: Con el sistema PCR E6/E7 se obtuvo banda amplificada para virus de AR en 75 de los 175 casos. Las 75 muestras se tipificaron con la técnica de RFLP (Tabla 3). Los tipos de VPH más frecuentes fueron: VPH 33 (25,3%), 16 (18,7%), VPH 52 (13,3%) y VPH 31 (12%). Los tipos VPH 35 y VPH 18 fueron los menos frecuentes con 6,6% y 2,7% respectivamente. Usando RFLP, se observó 10,7% de casos con dos tipos virales. En LBG, 2 casos con los tipos 16/52 y un caso con 45/52. En LAG, 2 casos con los tipos 16/52, un caso con 45/52 y uno con 18/52.

Tabla 1. Detección de infección por VPH en muestras de cuello uterino mediante amplificación del segmento L1 (PCR L1) y detección por hibridación Dot Blot

Histopatología	n	Detección VPH			
		Total Positivos		Total Negativos	
		n	%	n	%
Morfología normal	30	12	40	18	60
Lesión bajo grado	67	59	88	8	12
Lesión alto grado	47	42	89	5	11
Carcinoma	31	29	93,5	2	6,5
Total	175	142	81	33	19

Tabla 2. Frecuencia de grupos de genotipos virales detectados por hibridación Dot Blot

Histopatología	n	Sondas de AR		Sondas de BR	Sondas de AR y BR	No tipificado*
		n	%			
Morfología normal	12	7	58	3	1	1
Lesión de bajo grado	59	45	76	2	5	7
Lesión de alto grado	42	35	83	2	3	2
Carcinoma	29	28	96,6	0	0	1
Total	142	115	80,9	7 (4,9%)	9 (6,3%)	11 (7,7%)

AR (Alto Riesgo): cócteles de sondas VPH 16, 18, 33, 45 y VPH 31, 35, 51, 52.

BR (bajo riesgo): cóctel de sondas VPH 6, 11.

AR+BR: infección mixta o múltiple.

*Casos con PCR L1 positiva que no hibridaron con ningún cóctel de sondas (AR, BR).

Tabla 3. Distribución de los genotipos virales de VPH mediante amplificación de los genes E6/E7 y análisis de fragmentos de restricción (RFLP)

Histopatología	n	Tipos de VPH (%)							Doble Infección	No Tipificado
		16	18	31	33	35	52	45		
Morfología normal	2	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Lesión de bajo grado	25	3	1	5	4	4	4	-	3	1
Lesión de alto grado	29	3	-	4	9	1	5	3	4	-
Carcinoma	19	8	1	-	6	-	1	2	1	-
Total	75	14 (18,7)	2 (2,7)	9 (12)	19 (25,3)	5 (6,6)	10 (13,3)	6 (8)	8 (10,7)	2 (2,6)

Doble Infección: Doble infección con tipos VPH 16/52 (5 casos), VPH 18/52 (1 caso) y VPH 45/52 (2 casos). No tipificado: caso RFLP negativo y PCR L1 positivo. Dot Blot negativo.

En los carcinomas un caso con 16/52. El tipo VPH 45 (8%) se tipificó por descarte en el caso que no cortó con ninguna enzima y fue positivo para el cóctel que contenía las sondas VPH 16, 18, 33 y 45 (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Aun cuando existe abundante información respecto del rol del VPH en la carcinogénesis del cuello uterino, ésta es escasa a nivel local. En los estudios realizados en nuestro país, se han utilizado técnicas de inmunohistoquímica²⁹, hibridación^{30,31} y “captura híbrida”³². Con esta última (que detecta el complejo VPHE6-p53), se diagnosticó VPH en 8% de las muestras citológicas, correspondiendo en 83,8% a VPH AR³².

En el presente estudio, utilizamos dos sistemas de PCR de consenso, en nido. El sistema L1 con hibridación *dot blot* resultó adecuado para muestras de archivo (fijadas en formalina e incluidas en parafina), detectando VPH en 81% de todos los casos y en 93,5% de los cánceres. Estos resultados son similares a lo descrito en un estudio cooperativo multinacional, donde se observó VPH en promedio en 93% de los carcinomas cervicales, con un rango entre 75 y

100% para los diferentes países³³. En dicho estudio se analizaron 80 muestras de nuestro país (región metropolitana) y los porcentajes obtenidos fueron 45% para VPH 16, 5% VPH 18, 8,8% VPH 31 y 8,8% para VPH 45. En nuestro estudio, obtuvimos 42% de VPH 16, 5,2% de VPH 18 y 10,5% de VPH 45 para los carcinomas epidermoides, no detectándose VPH 31 en ningún carcinoma. Estas variaciones geográficas en la distribución genotípica viral reflejan, por un lado, el comportamiento endémico del VPH en poblaciones específicas y, por otro, las condiciones ambientales locales o genéticas de los huéspedes que favorecen o retrasan la aparición de lesiones determinadas.

La técnica de hibridación *dot blot* con cócteles de subtipos virales de AR y BR nos permitió separar estos dos grupos de genotipos virales. Observamos un claro predominio del grupo de AR (80,9%). La detección de infección mixta de AR y BR en 5 de 9 casos en LBG, es interesante ya que su número disminuye en las LAG y desaparece en los carcinomas. Este hecho podría indicar una ventaja competitiva de los virus de AR prevaleciendo debido a su mejor capacidad de integración genómica en la célula huésped. En 58% (7/12) de casos VPH positivos con histología normal lo fueron para VPH AR. Probablemente se trate de una infección viral

en fase latente, donde no es posible apreciar los cambios histopatológicos que causa la infección viral en la fase reproductiva o transformante. Infecciones a VPH de AR se han observado en alrededor del 10% en mujeres normales sin evidencia clínica de lesión cervical³⁴. Agorastos y cols, estudiaron mujeres clínicamente normales y detectaron VPH en 36%, de las cuales 21,9% (18/82) tenían VPH 16 ó 18³⁵. Este hecho indicaría que además de la presencia del virus, se requiere de otros factores para el desarrollo de lesiones premalignas y cáncer, tales como persistencia viral, carga viral y expresión alterada de genes³⁶.

El presente estudio nos ha permitido conocer en forma preliminar la prevalencia de la infección en NCI y CCU y la frecuencia de los tipos de VPH de AR en una muestra representativa de la población de nuestra región. Los tipos VPH 16, 33 y 45 resultaron ser los más frecuentes en LAG y carcinomas. Los genotipos VPH 31, 35 y 52 mostraron una distribución similar en las LBG y LAG. En general se acepta que los tipos virales de AR se definen según la asociación con carcinomas, LAG y LBG en áreas geográficas específicas^{7,37}. En un estudio de metaanálisis de los tipos de VPH y cáncer a través del mundo, se observó que en el carcinoma escamoso el VPH 16 fue el tipo predominante en todas las regiones variando desde 45,9 en Asia a 62,6% en Europa, Norte América y Australia. El VPH 18 fue encontrado entre 10 y 14% seguido por los tipos VPH 45 (2-8%), 31 (2-7%) y 33 (3-5%). Sin embargo, en Asia los tipos VPH 58 y 52 fueron más comúnmente detectados que VPH 45, 31 y 33³⁷. De nuestros hallazgos podemos decir, que los tipos de VPH más frecuentes, en orden decreciente, para los carcinomas fueron los genotipos: 33, 16 y 45 y para las LAG y LBG los tipos 33, 31, 52 y 16. En nuestros carcinomas (100% epidermoides o esca-

mosos) el VPH 16 fue el más frecuente (8/19) no así el VPH 18 (1/19). Este hecho concuerda con lo comunicado, ya que el VPH 16 ha sido identificado como el genotipo viral más común en el carcinoma escamoso, mientras que VPH 18 se ha relacionado más al adenocarcinoma y al carcinoma adenoescamoso³⁷⁻³⁹.

La menor sensibilidad mostrada por el sistema PCR en nido E6/E7 podría deberse al mayor tamaño del fragmento que amplifica (650pb), que no sería eficiente en material de archivo, en que el ADN puede estar parcialmente degradado⁴⁰. Aunque este sistema mostró menor sensibilidad en muestras de archivos que el sistema PCR L1/*Dot Blot*, es de gran utilidad ya que permite en un tamizaje rápido de dos simples PCR, clasificar las muestras en AR y BR siendo posible posteriormente la determinación del tipo de VPH de AR mediante RFLP²⁸.

El programa nacional de detección precoz del CCU recomienda el tratamiento inmediato de todas las lesiones intraepiteliales cervicales, la mayoría de las cuales presenta infección por VPH. La detección temprana de ADN de VPH estaría indicada en la citología ginecológica, en pacientes con PAP atípicos sospechosos (ASCUS) pero no diagnósticas de displasia. La presencia de virus de AR, permitiría priorizar la inversión de recursos para un seguimiento más estricto o incluso tratamientos profilácticos. La tendencia actual en la investigación del VPH y el CCU es al desarrollo de vacunas; sin embargo, la alta variabilidad genotípica cuestiona la eficacia de una vacuna sin conocer los tipos de VPH prevalentes en una población. Por otra parte, el variado curso de la infección en diferentes huéspedes, revela la importancia de otros factores biológicos genéticos y ambientales que podrían estar involucrados en la carcinogénesis del cuello uterino.

REFERENCIAS

1. PARKIN DM, PISANI P, FERLAY J. Estimates of the world wide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-41.
2. Programa de pesquisa de cáncer de cuello uterino en Chile. Logros y Desafíos 1987-1997. Ministerio de Salud, División programas salud de las personas, Unidad de Cáncer. 1998.
3. SERRA I, SERRA L, CASTRO R, GARCIA V, SERRA J, DESINTI E ET AL. Cáncer cervicouterino, un desafío sin resolver. *Rev Chil Obstet Ginecol* 1997; 62: 75-85.
4. CAPURRO I, ROJO J, PINO T, VÁSQUEZ C, GARAY J, VENEGAS M. Programa de detección y control de

- cáncer de cuello uterino en el servicio Salud Araucanía Sur. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2002; 67: 114-20.
5. BOSCH FX, LORINCZ A, MUÑOZ N, MEIJER CJLM, SHAH KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Patol* 2002; 55: 244-65.
 6. KJAER SK, CHACKERIAN B, VAN DEN BRULE A, SVARE E, PAULL G, WALBOMERS J ET AL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: Evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 101-6.
 7. MUÑOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSE S, HERRERO R, CASTELLSAGUE X, SHAH KV ET AL. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
 8. BJORGE T, ENGELAND A, LUOSTARINEN T, MORK J, GISLEFOSS RE, JELUM E ET AL. Human papillomavirus infection as a risk factor for anal and perianal skin cancer in a prospective study. *Br J Cancer* 2002; 87: 61-4.
 9. SYRJANEN KJ. VPH infection and lung cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 885-91.
 10. SHEN ZY, HU SP, LU LC, TANG CZ, KUANG ZS, ZHONG SP ET AL. Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma. *J Med Virol* 2002; 68: 412-6.
 11. BRESCIA R, BENNET J, LANCASTER W, KUMAN R. The role of human papillomaviruses in the pathogenesis and histologic classification of precancerous lesions of the cervix. *Human Pathol* 1986; 17: 552-92.
 12. LORINCZ AT, REID R, JENSON AB. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 329-37.
 13. MATSUKURA T, SUGASE M. Identification of genital human papillomavirus in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathological lesions. *Int J Cancer* 1995; 61: 13.
 14. DE RODA AM, WALBOOMERS JMM, VAN DEN BRULE AJC, MEIJER CJ, SNIJDERS PJ. The use of the general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76: 1057-62.
 15. JACOBS MV, DE RODA AM, VAN DEN BRULE AJ, SNIJDERS PJ, MEIJER CJ, WALBOOMERS JM. Group specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primers mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 901-5.
 16. ZEHBE I, WILANDER E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: a study of sensitivity. *Human Pathol* 1996; 27: 812-5.
 17. QU W, JIANG G, CRUZ Y, CHANG CH, HO G, KLEIN R ET AL. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1304-10.
 18. NODA T, SASAGAWA T, DONG Y, FUSE H, NAMIKI M, INOUE M. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol Res* 1998; 26: 165-9.
 19. JACOBS M, SNIJDERS P, VOORHORST F, DILLNER J, FORSLUND O, JOHANSSON B ET AL. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol* 1999; 52: 498-503.
 20. NELSON J, HAWKINS G, EDLUND K, EVANDER M, KJELLBERG L, WADELL G ET AL. A novel and rapid PCR- based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 688-95.
 21. MANOS M, TING M, WRIGHT D, LEWIS A, BROKER T, WOLINSKY S. Use polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells (Molecular diagnostics of Human Cancer)* 1989; 7: 209-14
 22. PFISTER H, FUCHS PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 1994; 37: 143-9.
 23. WHITE AF, LIVANOS EM, TLSTY T. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Develop* 1994; 8: 666-77.
 24. HENGSTERMANN A, LINARES LK, CIECHANOVER A, WHITAKER NJ, SCHEFFNER M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1218-23.

25. HELT AM, FUNK JO, GALLOWAY DA. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol* 2002; 76: 10559-68.
26. TOKI T, YAJIMA A. HPV Score, a scoring system for histological diagnosis of human papillomavirus infection in dysplasia of the uterine cervix. *Acta Pathol Japon* 1987; 37: 449.
27. SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA ET AL. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-4.
28. FUJINAGA Y, SHIMADA M, OKASAWA K, FUKUSHIMA M, KATO I, FUJINAGA K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991; 72: 1039-44.
29. DABANCENS A, OJEDA J, PRADO R, CAPETILLO M, DONOSO I, SALAS O. Evaluación diagnóstica de infecciones de cuello uterino asociadas a infección por virus papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol* 1990; 55: 50-3.
30. SALAS O, TISNÉ J, OSORIO O, WAISSBLUTH A, CAPETILLO M, OJEDA J ET AL. Carcinoma *in situ* e infección por virus papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol* 1991; 56: 189-93.
31. OJEDA J, GODOY J, AGUAYO F, DONOSO I, NAPOLITANO C, OLAVE E ET AL. Detección e identificación de virus papiloma en muestras cervicales mediante técnicas moleculares. *Rev Chil Infect* 1992; 2: 98-102.
32. SOCÍAS M, GONZÁLEZ J, FIGUEROA J, FERNÁNDEZ F. Perfil epidemiológico y clínico de la tipificación del HPV captura híbrida, método DIGENE. *Rev Chil Obstet Ginecol* 1997; 62: 167-73.
33. BOSCH FX, MANOS MM, MUÑOZ N, SHERMAN M, JANSEN AM, PETO J ET AL, AND THE IBSCC STUDY GROUP. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
34. KJAER SK, VAN DEN BRULE AJ, BOCK JE, POLL PA, ENGHOLM G, SHERMAN ME ET AL. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997; 6: 799-805.
35. AGORASTOS T, BONTIS J, LAMBROPOULOS AF, CONSTANTINIDIS TC, NASIOUZIKI M, TAGOU C ET AL. Epidemiology of human papillomavirus infection in Greek asymptomatic women. *Eur J Cancer Prev* 1995; 4: 159-67.
36. ARENDS MJ, BUCKLEY CH, WELLS M. Aetiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51: 96-103.
37. CLIFFORD GM, SMITH JS, PLUMMER M, MUÑOZ N, FRANCESCHI S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal Cancer* 2003; 88: 63-73.
38. IWASAWA A, NIEMINEN P, LEHTINEN M, PAAVONEN J. Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer* 1996; 77: 2275-9.
39. LO KW, WONG YF, CHAN MK, LI JC, POON JS, WANG VW ET AL. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China. *Int J Cancer* 2002; 100: 327-31.
40. WRIGHT DK, MANOS M. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T. ed. *PCR protocols. A guide to Methods and Applications*. San Diego, California. Editorial Academic Press, Inc. 1990; 153-8.