

ARTÍCULO ORIGINAL

1. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4984-4656>
2. Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Regional Lambayeque, Chiclayo, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4141-9719>

Contribuciones de los autores: SI y LS fueron responsables de la concepción del estudio. SI recolectó los datos. SI contribuyó al análisis de los datos. SI escribió el borrador inicial con todos los autores proporcionando comentarios críticos y ediciones para revisiones posteriores. Todos los autores aprobaron el borrador final del manuscrito. Todos los autores son responsables de todos los aspectos del trabajo para garantizar que las preguntas relacionadas con la precisión o integridad de cualquier parte del trabajo se investiguen y resuelvan adecuadamente.

Fuentes de financiamiento: autofinanciado.

Conflicto de interés: se señala no tener conflictos de interés.

Recibido: 4 junio 2020

Aceptado: 17 agosto 2020

Correspondencia:

Sebastian Iglesias-Osores

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII, Lambayeque, Perú

991547292

sebasiglo@gmail.com

siglesias@unprg.edu.pe

Citar como: Iglesias-Osores S, Serquén-López LM. Virus papiloma humano y factores asociados en pacientes con citología desconocida atendidas en el norte del Perú. Rev Peru Ginecol Obstet. 2020;66(3). DOI: <https://doi.org/10.31403/rpgo.v66i2275>

Virus papiloma humano y factores asociados en pacientes con citología desconocida atendidas en el norte de Perú

Human papillomavirus and associated factors in patients with unknown cytology treated in northern Peru

Sebastián Iglesias-Osores¹, Luis Miguel Serquén-López²

DOI: <https://doi.org/10.31403/rpgo.v66i2275>

RESUMEN

Introducción. El virus papiloma humano es el causante del cáncer de cuello uterino, uno de los cánceres más comunes en las mujeres. **Objetivo.** Determinar la prevalencia del virus papiloma humano y los factores asociados en mujeres con citología desconocida. **Métodos.** En pacientes de ginecoobstetricia con citología desconocida atendidas en el Hospital Regional Lambayeque, en la costa norte del Perú, entre abril y junio 2019, se realizó la extracción de ADN para identificar el virus del papiloma humano basada en el método de *salting out*. Se procesaron las muestras mediante reacción en cadena de la polimerasa y se amplificaron para los *primers* MY09 y MY11, y PC04/GH20. Se empleó el análisis bivariado mediante la prueba de chi cuadrado y t-student. **Resultados.** Se encontró que 29,9% de las pacientes atendidas en el área de gineco-obstetricia con citología desconocida tuvieron el virus del papiloma humano. No se encontró diferencia estadística significativa entre la infección por virus del papiloma humano con la edad, edad de primera relación sexual, promiscuidad, número de partos vaginales, lesión de cuello uterino, antecedente de ITS, uso de anticonceptivo hormonal, uso del condón y tabaquismo.

Palabras clave. Papilloma virus humano, Reacción en cadena de la polimerasa, Técnicas de laboratorio clínico.

ABSTRACT

Background: Human papillomavirus is cause of cervical cancer, one of the most common cancers among women. **Objective:** To determine the prevalence of human papillomavirus and associated factors in patients with unknown cytology. **Methods:** In gynecology patients with unknown cytology attended at Lambayeque Regional Hospital, at the northern coast of Peru, from April through June 2019, DNA extraction for human papillomavirus identification performed on cervical samples was based on the salting out method. Samples were processed by polymerase chain reaction. All samples were amplified for MY09 and MY11 primers, and PC04 / GH20 primers. Bivariate analysis used the chi-square and t-student tests. **Results:** 29.9% of the patients studied were infected with human papillomavirus. No statistically significant difference was found between human papillomavirus infection and age, age at first sexual intercourse, promiscuity, number of vaginal deliveries, cervical lesion, history of sexually transmitted infections, use of hormonal contraceptive or condoms, and smoking.

Key words: Human papillomavirus, Polymerase chain reaction, Clinical laboratory techniques.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es uno de los cánceres más comunes en las mujeres del mundo⁽¹⁾. Se pronostican 585 278 casos nuevos y 327 899 muertes atribuibles en el 2010, presentándose más de 80 % de los casos en países en desarrollo. El cáncer de cuello uterino invasivo representa 15 % de los cánceres en las mujeres y ocupa entre el primer o segundo lugar entre los cánceres en las mujeres en 13 de las 23 regiones del mundo⁽²⁾. El cáncer de cuello uterino es causado por el virus del papiloma humano (VPH) y el conocimiento epidemiológico de la distribución de la infección por este virus en la población general es fundamental. Los virus del papiloma humano representan una familia heterogénea de virus de ADN doblemente distribuidos de la familia taxonómica *Pa-*



pillomaviridae⁽³⁾. Algunos tipos de papiloma humano tienen tropismo positivo por la piel y desempeñan un papel en el cáncer⁽⁴⁾. La técnica con más sensibilidad y especificidad en la detección del VPH, considerada el estándar de oro durante muchos años, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores de consenso MY09 y MY11, seguidos de secuenciación genética⁽⁵⁾. Los ensayos moleculares, específicamente la PCR, son muy eficaces en el diagnóstico del VPH⁽⁶⁾.

El objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia de virus papiloma humano y factores asociados en pacientes de gineco-obstetricia con citología desconocida del norte del Perú.

MÉTODOS

El presente es un estudio descriptivo de corte transversal. Se aplicó el muestreo no probabilístico consecutivo por conveniencia, el cual consistió en reclutar a todas las pacientes que cumplieron con los criterios de selección durante el periodo abril a junio del 2019. Las pacientes llenaron un cuestionario de preguntas cerradas con datos reproductivos, demográficos y de historia clínica sexual. Se recolectaron las muestras de cuello uterino del servicio de ginecoobstetricia durante el periodo, que fueron procesadas en el laboratorio de biología molecular del área de investigación del hospital.

El protocolo y el trabajo de investigación fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Regional Lambayeque, Perú. Todas las mujeres participantes firmaron un consentimiento informado individual, previa explicación e información para la realización del estudio.

En la caracterización molecular de muestras, para el tratamiento previo se agitó con vórtex el tubo que contiene el citocepillo, a fin de desprender todas las células que pudieran quedar en el mismo. Se retiró con cuidado el citocepillo y la solución restante fue traspasada a un tubo de 1,5 mL. Se concentró la muestra por centrifugación a 12 000 rpm por 5 minutos, luego se eliminó todo el sobrenadante y se añadió el tubo blanco de extracción.

Para la extracción y purificación, se adicionó a la muestra 360 μ L de buffer de lisis y 3 μ L de β -mercaptoetanol. Se incubó durante 1 hora en

baño maría a 65°C, agitando en vórtex cada 10 minutos. Se adicionó 90 μ L de acetato de potasio 8 M y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos; luego, se recuperó el sobrenadante en otro tubo de 1,5 mL (se repitió este paso dos veces).

En la precipitación, se añadió 450 μ L de isopropanol y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos; se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 450 μ L de etanol al 70% y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos. Luego se dejó secar hasta eliminar la humedad. Se resuspendió en 25 μ L de H₂O PCR.

La evaluación de calidad e integridad del ADN genómico se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa, cuya concentración fue de 1% preparado con *buffer* tris-acetato-EDTA (TAE). Para esto se disolvió la agarosa en *buffer* tris-acetato-EDTA y se calentó en un microondas hasta su ebullición. En seguida se vertió en un soporte con el peine, esperando que gelificara. El gel listo fue colocado en la cámara de electroforesis conteniendo *buffer* tris-acetato-EDTA 1X. En los pocillos del gel de agarosa se cargó 1 μ L de muestra previamente mezclado con 1 μ L de tampón de carga y 8 μ L de H₂O PCR. Con la fuente de poder se aplicó corriente a 30V por 10 minutos, 70V por 30 minutos y 30V por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, el gel se tiñó en una solución con bromuro de etidio a concentración de 0,5 mg/mL. Luego se visualizó y capturó la imagen del ADN con la ayuda del foto-documentador Pharos Fx Plus. La calidad y cantidad de ADN fue determinado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La cuantificación se realizó usando un marcador con una concentración conocida.

El ADN que se extrajo fue amplificado mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Todas las muestras fueron amplificadas para los primers MY09 y MY11, y un control interno de calidad para verificar si fue ADN amplificable (betaglobina humana) con los primers PC04/GH20, para observar sus componentes. Todas las muestras se amplificaron para las enzimas consenso de restricción de 450 pb del gen L1 del VPH, MY09: (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') y MY11: (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3')⁽⁷⁻¹⁰⁾, y se usó como control interno, hemoglobina subunidad beta (HBB) GH20: (5'-GAAGAGCCAA-GGACAGGTAC-3') y PC04: (5'-CAACTTCATCCACG-TTACC-3') de 268 pb⁽¹¹⁾. Si una muestra contenía



TABLA 1. CONCENTRACIONES Y VOLÚMENES BGH TAQ PLATINUM-IN-VITROGEN.

	1 reacción		
	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial
Buffer 10x	10	1	1,25
Cebador de avance 10 mM	10	0,2	0,25
Cebador de regresión 10 mM	10	0,2	0,25
dNTPs* 5 mM/C	5	0,2	0,5
MgCl ₂ 50 mM	50	1,5	0,375
Platinum Taq 5 U/μL	5	0,625	0,125
ADN	>100 ng		3
Agua			6,75
Volumen final			12,5

*dNTPs=desoxinucleótidos trifosfatos

TABLA 2. CONCENTRACIONES Y VOLÚMENES MY09-II TAQ PLATINUM-IN-VITROGEN.

	1 reacción		
	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial
Buffer 10x	10	1	1,25
Cebador de avance 10 mM	10	0,2	0,25
Cebador de regresión 10 mM	10	0,2	0,25
dNTPs* 5 mM/C	5	0,2	0,5
MgCl ₂ 50 mM	50	2,75	0,6875
Platinum Taq 5 U/μL	5	0,625	0,125
ADN	>100 ng		5
Agua			4,4375
Volumen final			12,5

*dNTPs=desoxinucleótidos trifosfatos

ADN de β-globina detectable, entonces el ADN del VPH estaba intacto y amplificable durante la reacción en cadena de la polimerasa⁽¹²⁾.

La preparación del *mix* para reacción en cadena de la polimerasa β-globina y virus papiloma humano se llevó a cabo según las tablas 1 y 2, a un volumen final de 12,5 μL en cada reacción.

Las reacciones de amplificación para reacción en cadena de la polimerasa VPH se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf y la secuencia de oligonucleótidos MY09 / MY11 con la secuencia MY09 (CGTCCMARRGGAWACTGATC), MY11 (GC-MCAGGGWCATAAYAATGG) y PC04/GH20. Las condiciones termodinámicas óptimas constaron de los siguientes pasos: pre-naturalización 3 minutos a 94 °C; anillamiento 35 ciclos por 45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a

72 °C; extensión a 72 °C por 7 minutos.

Con relación a la electroforesis y visualización de banda, las muestras resuspendidas fueron examinadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, usando un marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Posteriormente, se llevó a corrida electroforética a 70 V por 10 minutos y luego a 120 V por 45 minutos. Luego los gels fueron teñidos por 10 minutos en una solución de concentración 0,5 mg/mL de bromuro de etidio. Para su visualización, se empleó un escáner molecular marca Pharos FX plus. Para identificar la asociación entre la infección por virus papiloma humano y las características demográficas (edad, grado de instrucción, estado civil, número de parejas sexuales), se realizaron las pruebas t-student y Mann-Whitney, utilizando el programa de Stata versión 15.

RESULTADOS

Se analizaron 186 muestras de pacientes; de ellas, 53 tuvieron un resultado positivo para virus del papiloma humano (29,9 %) (tabla 3) y 124 fueron negativas para la prueba (70,1 %).

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE PACIENTES.

Características generales		
	Número	Porcentaje
Edad*	45,1	11,9
Primera relación sexual+	18	16 a 21
Número de parejas sexuales+	1	1 a 2
Parejas en los últimos 6 meses+	1	1
Número de partos vaginales*	2,2	1,5
Procedencia		
Chiclayo	79	44,6
José Leonardo Ortiz	26	14,7
La Victoria	16	9,0
Fuera de Chiclayo	56	31,6
Lesión cervical	23	12,9
Antecedente de ITS	5	2,8
Anticonceptivo hormonal	135	76,3
Uso de condón		
Nunca	90	50,9
Frecuentemente	82	46,3
Siempre	5	2,8
Fumadora	22	12,4
Resultado positivo	53	29,9

*Se usó la media y desviación estándar. +Se usó la mediana y rango intercuartílico. ITS=infección de transmisión sexual



No se encontró diferencia estadística significativa entre los factores edad, primera relación sexual, número de partos vaginales, lesión de cuello uterino, antecedente de infección de transmisión sexual (ITS), uso de anticonceptivo hormonal y de condón, promiscuidad, fumadora y resultado positivo (tabla 4).

DISCUSIÓN

Un pequeño grupo de los papilomavirus son los agentes etiológicos de varios tipos de cánceres humanos, incluidos los carcinomas del tracto anogenital⁽¹³⁾. En el estudio que llevamos a cabo en una localidad en la costa norte de Perú, en la ciudad de Chiclayo, en pacientes con citología desconocida, se obtuvo una prevalencia de presentación del virus papiloma humano en el cuello uterino de 29.9 %, es decir, casi en un tercio de las participantes. Un estudio similar con las mismas características metodológicas realizado por Serquén-López en la misma ciudad de Chiclayo en trabajadoras sexuales, se encontró una prevalencia similar⁽¹⁴⁾. Estudios llevados a cabo en otras ciudades del Perú, como el de Valderrama y col. (2007) en estudiantes de Lima, Perú, la prevalencia fue 8.4 %⁽¹⁵⁾. Sullcahuaman-Allende y col., en un estudio en el Instituto Nacional de En-

fermedades Neoplásicas, Lima, Perú, halló que 32.5 % dieron positivo⁽¹⁶⁾. Manrique-Hinojosa y col. encontraron alta prevalencia en estudiantes limeñas (43.4 %)⁽¹⁷⁾ mientras Iwasaki y col., 34.5 % en población urbana limeña⁽¹⁸⁾. Santos y col. detectaron ADN del VPH en 95.3 % de las mujeres con carcinoma de células escamosas y en 92,0 % de las mujeres con adenocarcinoma / carcinoma adenoescamoso, en comparación con 17,7 % en las mujeres control⁽¹⁹⁾. Estos resultados asemejan a los de Mendoza y col.⁽⁸⁾, en 2012, con prevalencia de 21 % en mujeres con citología negativa en una localidad paraguaya, y de Winer y col., en 603 estudiantes universitarias en el estado de Washington, EE UU, a intervalos de 4 meses entre 1990 y 2000; a los 24 meses, la incidencia acumulada de infección por primera vez fue 3,3 %⁽²⁰⁾. La prevalencia en el estudio de Brot y col. fue 63 % en una población brasileña⁽²¹⁾, e Ingabire y col. hallaron que 8,6 % fueron positivas al VPH al inicio del estudio en 2007⁽²²⁾. Estas diferencias posiblemente se deben a los tipos de estudio llevados a cabo, así como la región en la que se realizó la investigación. En el Perú, las prevalencias de los estudios revisados son muy variadas.

Factores sociodemográficos como la edad y el estado civil sirven con frecuencia como marcadores de riesgo de exposición al VPH y otras infecciones de transmisión sexual⁽¹⁶⁾. Los resultados como la edad, inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales, promiscuidad, número partos vaginales, uso de condón, fumadoras, lesión cuello uterino, antecedentes de infecciones de transmisión sexual, uso de anticonceptivo hormonal no se asociaron a la infección de virus de papiloma humano en nuestro estudio. En otros trabajos sí se ha hallado asociación entre el VPH y estos factores⁽²³⁻²⁹⁾. Sathian y col. y Bosch y col. mencionan que la promiscuidad y el número de parejas sexuales son factores de infección por el VPH^(30,31) y el estudio de Francheschi y col. menciona que existe relación entre la infección por VPH y la edad de primera relación sexual⁽³²⁾.

En nuestro estudio no se encontró significancia estadística entre la infección por virus de papiloma humano y el número de partos vaginales, similar a lo hallado por Rajkumar y col.⁽³³⁾. Tampoco se halló significancia estadística entre el haber tenido alguna lesión de cuello uterino y la infección por VPH, lo que difiere de estudios

TABLA 4. DIFERENCIAS SEGÚN RESULTADO DE PRUEBA DE VPH EN PACIENTES DE GINECO-OBSTETRICIA.

	Positivo	Negativo	p	IC 95%
Edad*	47,4 (10,7)	44,2 (12,2)	0,091	-7,11 a 0,53
Primera RS+	18 (17 a 22)	18 (16 a 21)	0,489	-1,69 a 0,81
Número partos				
vaginales*	2,3 (1,6)	2,2 (1,5)	0,574	-0,62 a 0,35
Lesión cuello uterino				
Sí	6 (26,1)	17 (73,9)	0,665	0,34 a 1,97
No	47 (30,5)	107 (69,5)		
Antecedente ITS				
Sí	1 (20)	4 (80)	0,622	0,66 a 5,11
No	52 (30,2)	120 (69,8)		
Anticonceptivo hormonal				
Sí	40 (26,6)	95 (70,4)	0,87	0,82 a 1,18
No	13 (30,9)	29 (62,1)		
Uso de condón				
Frecuentemente/ Siempre	25 (28,7)	62 (68,9)	0,73	0,67 a 1,31
Nunca	28 (31,1)	62 (71,3)		
Fumadora				
Sí	5 (22,7)	17 (77,3)	0,429	0,26 a 1,76
No	48 (31,0)	107 (69,0)		

*Se usó la media y desviación estándar. +Se usó la mediana y rango intercuartílico. RS=relación sexual



como el de Bosch⁽³¹⁾, Oliveira⁽³⁴⁾, Motoyama⁽³⁵⁾, Naqvi, Wajid y Mitra⁽³⁶⁾ y Harden y Munger⁽¹³⁾. Los antecedentes de ITS, uso de anticonceptivo hormonal y/o condón y fumar no mostraron significancia estadística con el resultado positivo por VPH; esto difiere con los estudios de Hellberg y de Vaccarella, que encuentran relación entre estos factores y la infección por VPH^(23,37,38).

La prevalencia observada en nuestro estudio coincide con la de otros estudios. Si nos referimos a factores asociados, los resultados difieren con los hallados en otros continentes, pero tienen relación con estudios llevados a cabo en Perú. Según nuestros resultados, el número de parejas sexuales y la infección por VPH no tienen relación. Esto puede deberse a que se realizó el estudio en una población con un bajo número de parejas sexuales, una sociedad conservadora, siendo este factor importante en el contagio y la persistencia del virus papiloma humano en el organismo. Un porcentaje significativo de las pacientes fueron violadas, iniciando así su vida sexual. Además, las pacientes tenían tendencia a disminuir el número de parejas sexuales durante la entrevista, al igual que hubo mucho desconocimiento entre los tipos de métodos anticonceptivos.

Se encontró que poca parte de esta población es fumadora, por lo que este factor carcinogénico no se reflejaría en los resultados y necesitaría el estudio de una mayor población.

En estudios similares al presente existe información faltante en los registros médicos de las pacientes. Una fortaleza de nuestro estudio fue la repetición de las pruebas en caso de resultado indeterminado. Los servicios ginecológicos y oncológicos hospitalarios pueden mejorar los programas de tamizaje realizando pruebas moleculares en caso de citología negativa y con fuerte sospecha⁽³⁹⁾. El presente estudio es uno de los primeros llevados a cabo en la región Lambayeque, Perú.

La Organización Mundial de la Salud ha informado que el cáncer cervical es la segunda causa de neoplasia maligna y muerte en mujeres en todo el mundo⁽⁴⁰⁾. Los estudios epidemiológicos han mostrado que los genotipos de alto riesgo de virus de papiloma humano (AR-VPH) son la principal causa de esta enfermedad⁽⁴¹⁾. Es necesario utilizar herramientas de diagnóstico comple-

mentarias que permitan la detección del genoma AR-VPH, con el fin de aumentar el rendimiento de los métodos de diagnóstico morfológicos convencionales generalmente utilizados para detectar el cáncer cervical⁽⁴²⁾. Una debilidad del estudio es no haber genotipificado a las pacientes positivas para virus de papiloma humano ni haber incluido en otro grupo a las pacientes con carcinoma epitelial en cualquiera de sus estadios, lo cual habría dado una mejor visión de los tipos que están circulando por la región. Se recomienda estudios posteriores que incrementen el número de muestra, estratificando mejor a las pacientes y ampliando la prueba a los varones, ya que son los reservorios de la enfermedad. Se han hecho avances con la vacunación a las niñas en Perú, pero este próximamente debería abarcar a los varones y enfocar mejor los tipos que se encuentren circulando en la región y en el país. Se debe fortalecer la investigación en este tema, por ser una importante causa de mortalidad femenina.

Concluimos que se encontró alta prevalencia de pacientes con virus del papiloma humano. No se halló diferencia estadística significativa entre la infección por virus del papiloma humano y la edad, edad de primera relación sexual, promiscuidad, número de partos vaginales, lesión cervical, antecedente de ITS, uso de anticonceptivo hormonal, uso del condón, tabaquismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* [Internet]. 2006 [cited 16 June 2018];2006 Suppl:40470. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16967912>
2. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* [Internet]. 15 December 2010 [cited 14 de agosto de 2019];127(12):2893-917. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269>
3. Segondy M. Classification of papillomaviruses (HPV) [Internet]. Vol. 38, *Revue Francophone des Laboratoires*. Academic Press; 2008 [cited 14 August 2019]. p. 23-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>
4. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* [Internet]. November 2010 [cited 14 August 2019];11(11):1048-56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952254>
5. Gravitt PE, Manos MM. Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. *IARC Sci Publ* [Internet]. 1992 [cited 14 August 2019];(119):121-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1330905>



6. Rymza T, Ribeiro EA, Das Chagas e Silva de Carvalho LF, Bhattacharjee T, de Azevedo Canevari R. Human papillomavirus detection using PCR and ATR-FTIR for cervical cancer screening. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2018 May 5;196:238-46. DOI: 10.1016/j.saa.2018.02.004
7. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000 [cited 16 June 2018];38(1):357-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88724/pdf/jm000357.pdf>
8. Mendoza L, Arbiza J, Páez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G, et al. Características clínico-demográficas y tipificación del virus de papiloma humano en mujeres paraguayas con citologías negativas para lesión escamosa intraepitelial. *Mem Inst Investig Cienc Salud Junio* [Internet]. 2012 [citado 7 de octubre de 2017];10(1):46-55. <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v10n1/v10n1a06.pdf>
9. Stamenković M, Knežević A, Knežević I, Kuzmanović I, Karalić D, Milenković S, et al. High-risk human papilloma virus genotypes in cervical carcinoma of Serbian women: Distribution and association with pathohistological findings. *Biologicals* [Internet]. September 2016 [cited 5 October 2017];44(5):412-6. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105616300264>
10. Mudini W, Palefsky JM, Hale MJ, Chirenje MZ, Makunike-Mutasa R, Mutisi F, et al. Human papillomavirus genotypes in invasive cervical carcinoma in HIV-seropositive and HIV-seronegative women in Zimbabwe. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 1 September 2018 [cited 30 September 2019];79(1):E1-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29781877>
11. Reyna López L, Gonzalez Cabeza J, Araujo Jiménez A, Avila Vereau E, Gómez Castro K, Terán Rojas Y. Detección y genotipificación de papiloma virus humano por PCR-RFLP en pacientes atendidas en el hospital distrital Walter Cruz Vilca La Libertad-2015. *Pueblo Cont* [Internet]. 16 de febrero de 2016 [citado 7 de octubre de 2017];27(2):331-42. <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/687>
12. Kleter B, Van Doorn LJ, Ter Schegget J, Schrauwen L, Van Krimpen K, Burger M, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* [Internet]. December 1998 [cited 30 September 2019];153(6):1731-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846964>
13. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Mutat Res* [Internet]. 2016 [cited 3 December de 2016];772. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28528688>
14. Serquén-López LM, Iglesias-Osores SA, Arce-Gil ZL. Prevalencia de Papilomavirus Humano en trabajadoras sexuales atendidas en dos centros de salud de Chiclayo. *Rev Del Cuerpo Médico Del HNAAA* [Internet]. 2018;10(4):6-9. <https://cmhnaaa.org.pe/ojs/index.php/rcmhnaaa/article/view/21/21>
15. Valderrama MC, Campos FE, Cárcamo CP, García PJ. Factores asociados a lesiones cervicales o presencia del virus del papiloma humano en dos poblaciones de estudiantes de Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2007 [citado 21 de octubre de 2017];24(3):234-9. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342007000300006&script=sci_arttext
16. Sullcahuaman-Allende Y, Castro-Mujica M del carmen, Mejía-Farro R, Castaneda CA, Castillo M, Dolores-Cerna K, et al. Características sociodemográficas de mujeres peruanas con virus papiloma humano detectado por PCR-RFLP. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2015 [citado 5 de octubre de 2017];32(3):509-14. http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000300015&lng=en&nrm=iso&tlng=en
17. Manrique-Hinojosa J, Núñez-Teran MDC, Pretel-Ydrogo L, Sullcahuaman-Allende Y, Roa-Meggo Y, Juárez-Coello P, et al. Detection of the human papillomavirus in samples obtained by self-collection technique in a group of peruvian college students. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2018 [citado 25 de octubre de 2019];35(4):642-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30726431>
18. Iwasaki R, Galvez-Philpott F, Arias-Stella J, Arias-Stella J. Prevalence of high-risk human papillomavirus by cobas 4800 HPV test in urban Peru. *September 2014*;18(5):469-72. doi: 10.1016/j.bjid.2014.01.010
19. Santos C, Muñoz N, Klug S, Almonte M, Guerrero I, Alvarez M, et al. HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer* [Internet]. 28 September 2001 [cited 7 October 2017];85(7):966-71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592767>
20. Winer RL, Lee S-K, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1 February 2003 [cited 8 March 2019];157(3):218-26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543621>
21. De Brot L, Pellegrini B, Moretti ST, Carraro DM, Soares FA, Rocha RM, et al. Infections with multiple high-risk HPV types are associated with high-grade and persistent low-grade intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 1 February 2017 [cited 5 October 2017];125(2):138-43. <http://doi.wiley.com/10.1002/cncy.21789>
22. Ingabire C, Lim MK, Won Y-J, Oh J-K. HPV genotype-specific persistence and potential risk factors among Korean women: results from a 2-year follow-up study. *Cancer Res Treat* [Internet]. 17 August 2017 [cited 4 October 2017];1-26. <http://www.e-crt.org/journal/view.php?doi=10.4143/crt.2017.340>
23. Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJF, Dai M, Thomas JO, Hieu NT, et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol* [Internet]. 1 June 2008 [cited 18 October 2017];37(3):536-46. <https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dyn033>
24. Vieira RC, Valente S, Manso EP, Renata M, Tsutsumi MY, Aoba E, et al. Prevalence of type-specific HPV among female university students from northern Brazil. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2015 [cited 5 October 2017];10:1-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26203300>
25. Müller EE, Rebe K, Chirwa TF, Struthers H, McIntyre J, Lewis DA. The prevalence of human papillomavirus infections and associated risk factors in men-who-have-sex-with-men in Cape Town, South Africa. *BMC Infect Dis* [Internet]. 22 August 2016 [cited 7 October 2017];16(1):440. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27549219>



26. Baloch Z, Yasmeen N, Li Y, Ma K, Wu X, Yang S, et al. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection among Chinese ethnic women in southern of Yunnan, China. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 1 May 2017 [cited 16 June 2018];21(3):325-32. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S141386701630633X?via%3DIihub>
27. Smith JS, Green J, Berrington De Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: A systematic review. *Lancet* [Internet]. 5 April 2003 [cited 9 October 2017];361(9364):1159-67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686037>
28. Green J, Berrington de Gonzalez A, Smith JS, Franceschi S, Appleby P, Plummer M, et al. Human papillomavirus infection and use of oral contraceptives. *Br J Cancer* [Internet]. 2003 [cited 4 October 2017];88(11):1713-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2377143/pdf/88-6600971a.pdf>
29. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 1 August 2010 [cited 19 October 2017];19(8):1893-907. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20647400>
30. Sathian B, Babu MR, Van Teijlingen ER, Banerjee I, Roy B, Subramanya SH, et al. Ethnic variations in perception of human papillomavirus and its vaccination among young women in Nepal. *Nepal J Epidemiol* [Internet]. 13 July 2017 [cited 4 October 2017];7(1):647. www.nepjol.info/index.php/NJE
31. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. April 2002 [cited 7 October 2017];55(4):244-65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>
32. Franceschi S, Plummer M, Clifford G, de Sanjose S, Bosch X, Herrero R, et al. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. *Br J Cancer* [Internet]. 1 September 2009 [cited 7 October 2017];101(5):865-70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654578>
33. Rajkumar T, Cuzick J, Appleby P, Barnabas R, Beral V, Berrington De González A, et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* [Internet]. 1 September 2006 [cited 9 October 2017];119(5):1108-24. <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21953>
34. Oliveira GR de, Siqueira JD, Finger-Jardim F, Vieira VC, Silva RL, Gonçalves C V, et al. Characterisation of complete high- and low-risk human papillomavirus genomes isolated from cervical specimens in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. October 2017 [cited 16 June 2018];112(10):728-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28954002>
35. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* [Internet]. 2004 [cited 21 October 2017];50(1):9-19. <http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/50/9.pdf>
36. Naqvi SH, Wajid S, Mitra AB. Restriction fragment length polymorphism of L1 amplicon using Rsa 1 detects five different human papillomavirus types and their co-infections among women attending a gynaecological outpatient department. *J Virol Methods* [Internet]. April 2004 [cited 6 October 2017];117(1):91-5. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093403004002>
37. Hellberg D, Stendahl U. The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer. *Anticancer Res*. 2005;25(4):3041-6.
38. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* [Internet]. April 2000 [cited 4 October 2017];82(7):1332-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755410>
39. Iglesias-Osores SA, Pando-Sánchez H. Tamizaje en cáncer de cérvix como prevención. *Rev Exp en Med del Hosp Reg Lambayeque* [Internet]. 2017;3(2):82. <http://rem.hrlamb.gob.pe/index.php/REM/article/view/91/82>
40. Carestiatto FN, Silva KC, Dimetz T, Oliveira LHS, Cavalcanti SMB. Prevalence of human papillomavirus infection in the genital tract determined by hybrid capture assay. *Braz J Infect Dis*. October 2006;10(5):331-6.
41. Coico-Vega MM, Iglesias-Osores S, Aguilar-Gamboa FR. Detección de oncoproteínas e6/e7: una alternativa para el tamizaje de cáncer de cérvix. *Rev Exp en Med del Hosp Reg Lambayeque* [Internet]. 2018;4(3). <http://rem.hrlamb.gob.pe/index.php/REM/article/view/245>
42. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. February 2003;348(6):518-27.