

Kasmera 41(2): 145 - 153, julio-diciembre 2013
ISSN 00755222 / Depósito legal 196202ZU39

Determinación del virus papiloma humano y virus herpes simple y su posible relación con la presencia y tipo de lesiones preinvasivas del cuello uterino

Determination of Human Papiloma and Herpes Simplex Viruses and Their Possible Relation to the Presence and Type of Preinvasive Lesions on the Uterine Cervix

**Ricardo Atencio T. ^{1*}, Angela Bracho M.²,
Leticia Porto ¹, Diana Callejas²,
Jennifer Gotera L. ³, Natacha Pirela G.⁴,
Sergio Osorio⁵, María Atencio⁵.**

¹Laboratorio Regional de Referencia Viroológicas (LRRV).
Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia.

²Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

³Laboratorio Regional de Salud Pública del estado Zulia.

⁴Licenciada en Bioanálisis. ⁵Escuela de Medicina. Facultad de
Medicina. Universidad del Zulia. * ratencio40@yahoo.com

Resumen

El Cáncer (Ca) de Cuello Uterino (Cu) persiste como un problema de salud pública a nivel mundial. Entre los agentes infecciosos más estudiados que se han relacionado con los procesos neoplásicos, están los virus, y entre ellos el herpes y el papiloma. Esta investigación se realizó para determinar el Virus Papiloma Humano (VPH) y el Virus Herpes Simple (VHS) y su posible relación con la presencia y tipo de lesiones preinvasivas de Cu. Se seleccionaron 65 muestras de tejido de Cu con lesiones de pacientes de sexo femenino y 10 controles aparentemente sanas, para la detección del VPH y VSH. Se utilizó el método de PCR e Hibridación para la genotipificación del VPH. Se observó un 15,38% de positividad para VPH y un 20% para VSH, un caso de coinfección en una paciente con lesión intraepitelial de alto grado (LIEag), demostrándose una diferencia significativa entre las pacientes VPH positivo con LIEag respecto a aquellas con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEbg). La mayoría de los casos positivos para VHS se detectaron en pacientes con LIEbg. Se demostró una correlación significativa entre el tipo de lesión y la presencia de genotipos de alto y bajo riesgo del VPH.

Palabras clave: Virus Papiloma Humano, Virus Herpes Simple, Cáncer de Cuello Uterino.

Recibido: 10-10-13 / Aceptado: 29-11-13

Abstract

Cervical cancer persists as a public health problem worldwide. Among the most studied infectious agents that have been associated with neoplastic processes are viruses, including herpes and papilloma. This research was carried out in order to determine the possible relation between infection with herpes simplex virus (HSV) and human papilloma virus (HPV) and the presence and type of pre-invasive cervical lesions. Sixty-five samples of cervical tissue with lesions and ten apparently healthy controls were selected from female patients for the detection of HSV and HPV. PCR and hybridization (HC2) methods were implemented for genotyping HPV. For HPV, 15.38% were positive while for HSV, 20.0%. There was one case of co-infection in a patient with a high grade intraepithelial lesion (HSIL), showing a significant difference between HPV-positive patients with HSIL compared to women with LSIL, low grade intraepithelial lesions. Most of the HSV positive cases were detected in patients with LSIL. A significant correlation was proved between the type of lesion and the presence of high and low risk HPV genotypes.

Keywords: Human papilloma virus, herpes simplex virus, cervical cancer.

Introducción

El cáncer de cuello uterino representa una causa frecuente de morbimortalidad en mujeres de edad reproductiva, se ha estimado que representa el 12% de todos los casos de cáncer. Con un número estimado de 529.800 casos nuevos y 275.100 muertes por cáncer cervical, se sitúa en las tercera y cuarta posiciones en cuanto a incidencia y mortalidad por cáncer de la mujer en el mundo, teniendo en cuenta que el 85% de los casos se producen en los países menos desarrollados, con tasas de incidencia y mortalidad del 17,8 y del 9,8%, respectivamente, comparadas con los países desarrollados, en los que se reduce al 9,0 y al 3,2% (1).

En los Estados Unidos aproximadamente el 40% de las mujeres jóvenes se infecta con el VPH dentro de los tres años desde que comienzan a tener relaciones sexuales y, en todo el mundo, de 50% a 80% de las mujeres sexualmente activas se infecta con el VPH al menos una vez en sus vidas (2,3).

Afortunadamente, en la mayoría de los casos, estas infecciones desaparecen gracias a respuestas inmunológicas naturales. La gran mayoría de las infecciones por VPH son temporales, y dejan de ser detectables en

análisis moleculares después de un periodo de 4 a 18 meses (4).

La evidencia epidemiológica sugiere, desde hace varios años, que el cáncer cervical se comporta como una enfermedad de transmisión sexual (ETS), por lo que sus factores de riesgo tienden a ser similares a los de este grupo de enfermedades, a saber: el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, múltiples compañeros sexuales, bajo nivel socioeconómico, y antecedentes de ITS, como son las causadas por el virus papiloma humano (VPH) y el virus de herpes simple tipo 2 (VHS-2) (5).

Estudios recientes han demostrado que el cáncer cervical invasivo de la mujer es causado por cepas oncogénicas del Virus Papiloma Humano (VPH). El ADN del VPH es detectable en más del 95% de los casos; los genotipos 16 y 18 son responsables de más del 70% del cáncer cervical, y junto con el genotipo 45 contribuyen al 94% del adenocarcinoma de cérvix (1,6).

Por otro lado, el estudio del Virus Herpes Simple (VHS) es de especial importancia en las mujeres por varias razones, entre las cuales, está implicado en el cáncer de cuello uterino cuando se encuentra presente en combinación con el Virus Papiloma Humano (7).

En tal sentido, se decidió llevar a cabo este estudio con el objetivo de determinar la posible relación entre la infección por el Virus del Papiloma Humano y Virus de Herpes Simple y con la presencia y tipo de lesiones preinvasivas de cuello uterino.

Materiales y Métodos

Pacientes y Métodos

Se trata de un estudio experimental, de corte transversal, realizado entre Enero del 2004 hasta Junio de 2007. El estudio se realizó en una población de pacientes del sexo femenino, sin discriminar edad, etnia y paridad. La toma de muestra se realizó en la consulta ginecológica del Ambulatorio La Victoria, de la Policlínica Amado, del Servicio médico de la Alcaldía de Maracaibo, del Ambulatorio Cujicito, del Ambulatorio Los Olivos, del Laboratorio Regional de Referencia Viroológica de la Facultad de Medicina y del Servicio Médico Odontológico (SMO) de los Empleados Administrativos de la Universidad del Zulia, todos centros asistenciales pertenecientes al municipio Maracaibo y del Hospital Manuel Noriega Trigo del municipio San Francisco.

Se tomaron 360 muestras de tejido de cuello uterino de pacientes de sexo femenino y de estas se seleccionaron 65 con lesiones preinvasivas y 10 sin lesiones visibles de cuello utilizadas como controles.

Cada muestra estuvo acompañada de una historia clínica diseñada para la identificación de las características epidemiológicas y posibles factores de riesgo asociados a la presencia de infección por VHS y VPH. Entre las variables que la historia clínica permitió identificar están: la edad, edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales y tipo de relación sexual más frecuente; se solicitó además el consentimiento por

escrito, y el protocolo del mismo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

En posición ginecológica, se le practicó un reconocimiento general de la vulva y la vagina, además de un examen exhaustivo del cuello uterino, para ello se realizó una visualización directa del cuello uterino mediante un espejito vaginal. Se tomó una primera muestra para el estudio citológico o test de Papanicolau, posteriormente se realizó un estudio colposcópico, y se tomó una segunda muestra utilizando una torunda de alginato la cual se introdujo en el canal cervical con giros de 360° para el diagnóstico de VPH y VHS, guardándose en un tubo de transporte sin ningún aditivo y se almacenaron a - 20°C hasta el momento de su procesamiento.

A las pacientes con atipias colposcópicas se les tomó una biopsia incisional del Cu, la cual se preservó en formol tamponado y fue enviada al Servicio de Anatomía Patológica de la Policlínica Maracaibo para su estudio histopatológico.

Análisis Genético

La extracción del ADN viral del VPH y VHS se realizó según las instrucciones del fabricante (Wizard Genomic purification Kit), una vez finalizada la extracción las muestras fueron guardadas a - 20°C hasta el momento de su procesamiento (8).

La amplificación del ADN del VHS, se realizó utilizando los primers HSV1+ (CGCATCATCTACGGGGACCGGA) y HSV1- (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT), para la primera PCR, y para la segunda amplificación HSV2+ (GTGTTGTGCCGCGGTCGCAC) y HSV2- (GTGAACGTCTTTTCGAATC), (Casas y col., 1997). Se usó la MASTER MIX como mezcla de PCR (400µM dATP, 400 µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP), MgCl₂, (3mM), Taq polimerasa 5 U/ul (8).

El ADN del VPH se amplificó con primers genéricos MY09 (CGTCCMARRGGA-WACTTATC) Y MY011 (GCMCAGGGWCA-TAAYAATGG) (9). Para el control de la amplificación para ambos virus se utilizaron primers genéricos de s-globina PCO4 (CA-ACTTCATCCACGTTCCACC) y GH20 (GAGGCCAAGGACAGGTAC), visualizándose una banda de 268pb (10). Como control positivo para herpes simple se utilizó una muestra de lesión ocular y bucal, y para VPH una muestra de verruga en boca, la cual resulto positiva para VPH; y como control negativo se utilizó agua de PCR.

Electroforesis del VPH y VHS

La primera electroforesis del VHS arrojó una banda de 190pb, esta representó la región UL del Herpesvirus, altamente conservada y similar para la familia Heperviridae. El producto de la segunda amplificación fue de 120pb, región específica para Herpes Simple 1 y 2. Para el VPH se detectó una banda de 450pb, la cual representó la región L1 de marco abierto de lectura (ORF) del virus. Esta región está conformada por proteínas codificadas y constituyentes capsulares dominantes totalmente conservados, lo cuales son similares en todos los tipos de VPH.

La detección y tipificación del VPH se realizó a través del Kit VPH-Fast del Laboratorio FARMA-GEN (España) (11) y el test de Captura de Híbrido 2 (HC2) (DIGENE): consistió en una prueba de hibridación de ácido nucleico in vitro con amplificación de señal, detectando por quimioluminiscencia de forma cualitativa dieciocho (18) tipos de ADN del VPH. La HC2 VPH ADN, identificó entre dos (02) grupos de ADN de VPH: los tipos de VPH de bajo riesgo 6/ 11/42/ 43/ 44; y los tipos de VPH con riesgo intermedio/alto 16/ 18/ 31/ 33/ 35/ 39/ 45/ 51/ 52/ 56/ 58/ 59/ 68, pero no determina el tipo de VPH específico presente.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron ordenados y analizados estadísticamente mediante el programa GraphPad InStat Versión 4 (San Diego, CA, USA). Se aplicaron determinaciones de estadística descriptiva (media aritmética, desviación estándar, porcentajes, entre otros). Como prueba de asociación de variables cualitativas se utilizó el Ji-cuadrado con conversión de Yates con un límite de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

De un total de 65 pacientes con lesiones preinvasivas de cuello uterino se pudo observar que 10 pacientes resultaron positivos a VPH con un 15,38% y 55 negativas con un 84,61%. Igualmente se muestra la prevalencia de infección por VHS con 20,0% (13/65) de casos positivos y 80,0% (52/65) negativos sin presentar diferencia estadística significativa. Las muestras de tejido cervical de las mujeres controles no fueron positiva para ninguno de los virus estudiados.

La Tabla 1 muestra la prevalencia de VPH y VHS en mujeres con lesiones preinvasivas de cuello uterino distribuidas de acuerdo al tipo de lesión encontrada, donde de las 65 mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas (LIE), el 76,92% (50/65) presentaron LIEbg, con once (11) casos de VHS (22,0%) y cinco (5) casos de VPH (10,0%). Mientras que en las quince (15) (23,07%) mujeres con LIEag, se observaron dos (2) casos de VHS (13,3%) y cinco (5) casos de VPH (33,3%). Demostrándose una diferencia significativa entre las pacientes VPH positivo con grado de lesión LIEag en relación a las mujeres con LIEbg.

Con respecto al genotipo de VPH de alto y bajo riesgo, determinado por el método de captura de híbrido 2, se pudo observar la presencia de uno (1) o varios genotipos de VPH de alto

Tabla 1. Prevalencia de VPH y VHS en mujeres con lesiones preinvasivas de cuello uterino según el tipo de lesión.

Tipo de Lesión	n°/%	VHS +	%	VPH +	%
LIEbg	50/76,92	11	22,0	5*	10,0
LIEag	15/23,07	2	13,33	5	33,33
Total	65/100	13	20,0	10	15,38

*p<0,05 con respecto a VHS positivo – LIEbg.
LIEbg (Lesión intraepitelial escamosa bajo grado).
LIEag (Lesión intraepitelial escamosa alto grado).

riesgo en ambos tipos de lesiones, en tres (3) pacientes (60,0%) con LIEbg y en cinco (5) pacientes (100%) con LIEag, mientras que en solo dos (2) pacientes con LIEbg se obtuvo uno (1) o varios genotipos de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44), con un 40% (Tabla 2).

En la Tabla 3, se evidencia la prevalencia de coinfección de VHS/VPH y su relación con el grado de lesión, encontrándose un (1) caso positivo para ambos virus, el cual corresponde a lesiones del tipo LIEag, no observándose diferencia significativa.

Los resultados obtenidos por estudio citológico, muestran la presencia de forma sugestiva de infección por VPH en un 36,6%, mientras que los resultados obtenidos por PCR fueron un 15,4%, con diferencias significativas (p<0,05) entre ambos resultados (Tabla 4).

En relación a las características epidemiológicas y a los factores de riesgo, se observó que el promedio de edad en las mujeres infectadas por ambos agentes virales fue de 31,76 años (X±DS:15±46 años). Se observó para VHS una incidencia de 37,5% para el grupo etario de 21-25 años (X±DS:22,5 ± 1,5 años), y para VPH una incidencia de 25% (X±DS:22,4 ± 1,4 años). Con el inicio de la primera relación sexual, la mayor incidencia para VHS fue observada en las pacientes entre los 16-20 años (28,2%), y para VPH el grupo de mayor incidencia fue el de 26-30

años con el 33,3% (Datos no mostrados). En cuanto a la presencia de VHS y VPH en relación al número de compañeros sexuales, la mayor incidencia para ambos virus fue observada en mujeres que tuvieron tres (3) o más compañeros sexuales (22,2%).

Según el tipo de relación genital, en el caso de VHS ano-genital fue la más común con 33,3% y para VPH la genital con 18,7% (Datos no mostrados).

Discusión

Los virus oncogénicos (VHS y VPH) desempeñan un papel etiológico de gran importancia del Cu en la mujer. En la presente investigación la incidencia de VHS (20%) y VPH (15,38%) resultó similar a la reportada por Lascano – Ponce y cols. en 2001, con un 14,5% para VPH y un 29,8% en un grupo de mujeres de Ciudad de México (12).

El porcentaje de casos positivos para VHS es similar al reportado por otros investigadores quienes obtuvieron un 29,1% y un 25%, utilizando ambos el método de Inmunofluorescencia Directa (IFD) (13,14), hecho contrario por Benedetti *et al* (15) y Conde *et al.* (16) con 90,9% y 60,5% respectivamente utilizando estas técnicas serológicas. Por otro lado Aryee *et al.* mediante técnicas de PCR en tiempo real reportaron un 43% de prevalencia de VHS de las mujeres estudiadas (17).

Tabla 2. Distribución de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo según el tipo de lesión.

Genotipos de VPH	LIEbg		LIEag	
	n°	%	n°	%
Alto Riesgo	3/5	60,0	5/5	100,0
Bajo Riesgo	2/5	40,0	0,0	0,0

LIEbg (Lesión intraepitelial escamosa bajo grado).
LIEag (Lesión intraepitelial escamosa alto grado).

Tabla 3. Prevalencia de coinfección de VPH y VHS en mujeres con lesiones preinvasivas de cuello uterino según el tipo de lesión.

Tipo de Lesión	VHS+ VPH-	%	VHS+ VPH+	%	VHS- VPH+	%	VHS- VPH-	%
LIEbg	11	91,66	0	0	5	55,55	33	63,46
LIEag	1	8,33	1	100,0	4	44,44	9	17,30
Total	12	16,21	1	1,35	9	12,16	52	70,27

LIEbg (Lesión intraepitelial escamosa bajo grado).
LIEag (Lesión intraepitelial escamosa alto grado).

Tabla 4. Métodos diagnósticos utilizados para determinar la presencia y el tipo de lesión en las mujeres evaluadas

Método Diagnóstico	VPH-		VPH+	
	n°	%	n°	%
Citología	36/65	64,4	29/65	*36,6
PCR	55/65	84,6	10/65	*15,4

* $p < 0,05$ entre ambos métodos de diagnóstico.

La frecuencia de la infección por VPH observada en el presente estudio se apoya en diversas investigaciones a nivel regional, nacional e internacional (11-18). Sin embargo, los resultados obtenidos por Araujo *et al.* (19) con 36,6%, Howaidea *et al.* (20) con 65,9% de positividad para VPH, en todas las investigaciones anteriores las poblaciones estudiadas presentaban características y factores de riesgo similares.

El mayor porcentaje de las mujeres (76,92%) presentó LIEbg y solo en un 23,07% se observó LIEag. Tanto el VHS como el VPH; se observaron en los diferentes grados de lesiones de Cu. Estos resultados sugieren

que la presencia de ambos agentes virales parecen inducir la aparición de lesiones intraepiteliales de bajo grado. La mayoría de los casos positivos para VHS se identificaron en mujeres con LIEbg y solo dos (02) casos se correspondieron con LIEag. Diferentes investigaciones han demostrado que este virus es un cofactor, responsable de importantes alteraciones que están relacionadas con el desarrollo de Cáncer Cervical (21).

Las mujeres con LIEbg presentaron el 40,0% de VPH de bajo riesgo y el 60,0% genotipos de alto riesgo con relación a LIEag, todos los genotipos identificados fueron de alto riesgo. Lo que parece demostrar la cerra-

da relación entre un genotipo de VPH de alto riesgo y la aparición de una displasia cervical de alto grado. Resultados similares a los anteriores fueron descritos por González y cols. (22), ellos reportaron una alta correlación (88%) entre los tipos de VPH de alto riesgo y el LIEag en las pacientes estudiadas, así mismo, Grettell y Bosques (23); sugieren que la infección por VPH es una condición necesaria para el desarrollo de neoplasias intraepiteliales cervico uterinas.

Al correlacionar la presencia de VHS y VPH con los diferentes grados de lesiones, no se encontró ninguna diferencia significativa en relación a la presencia de ambos virus y las lesiones de CU, dado que la suma de ambas infecciones no plantearon un mayor riesgo de lesiones preinvasivas de Cuello uterino, debido a que solamente se encontró un (01) caso de coinfección y este a su vez correspondió a LIEag. Sin embargo, tomando en cuenta que las mujeres infectadas con VHS y VPH de alto riesgo, tienen mayor posibilidad de desarrollar cáncer cervical en relación con aquellas mujeres infectadas con uno de estos virus (24,25). Es importante destacar que a pesar de haberse detectado solo un caso de infección mixta (VHS/VPH), este se encontró en lesiones de alto grado, lo que hace probable que las infecciones con otros agentes etiológicos pueden ser un factor de riesgo en el desarrollo de una neoplasia cervical, esta hipótesis ha sido reportada en otros estudios (26-27). Mott *et al.* (28), en sus investigaciones demostró el potencial oncogénico que posee la coinfección por ambos virus.

En relación al grupo etario, el mayor número de casos de VHS fue entre los 21-25 años igual que en aquellas mujeres VPH positiva. Es bien sabido que la prevalencia de las lesiones preinvasivas ocurren generalmente en el grupo de edad entre 20 y 40 años con un pico de incidencia a los 30 años de edad. Tra-

bajos realizados por María Scuceces *et al.* (29) del Hospital Central de Maracay y Ambulatorio "María Teresa Toro". Estado Aragua; indicaron que el promedio de edad fue 32,9 años. En diversos estudios se ha demostrado que ciertos comportamientos, como el número de compañeros sexuales, el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, la frecuencia y el tipo de relación sexual, aumentan la probabilidad de desarrollar una infección por el VHS-2 y/o VPH (30,31).

Mujeres con más de tres (3) compañeros sexuales aumentaron el porcentaje de infección para VHS-2 (18,1%), mientras que el mayor porcentaje de casos con VPH se observó en pacientes con dos (2) y más de tres (3) compañeros sexuales (32).

La mayoría de los casos positivos de VHS fueron con LIEbg, este hallazgo difiere lo reportado por Smith *et al* (26) quienes han afirmado que el VHS es un cofactor de la etiología como responsable de alteraciones importantes y su relación con el Cáncer Cervical, mientras que otros estudios epidemiológicos han concluido que el VHS-2 no es un factor de riesgo para la aparición de cáncer cervical (26). Los datos aportados por numerosos investigadores sugieren que la infección por VPH es una condición necesaria para el desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer.

Los resultados obtenidos en el reciente estudio mostraron una correlación importante entre el diagnóstico histopatológico y la presencia de genotipos de alto y bajo riesgo del VPH. Los genotipos de alto riesgo estuvieron presentes en las pacientes que presentaron LIEag, mientras que los de bajo riesgo fueron localizados en las biopsias con LIEbg. La aparición conjunta de la infección por el VHS y el VPH aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar Cáncer de Cuello Uterino, aunque este, se desarrolla lentamente, con el paso de los años, la detección periódica

ca, junto con la eliminación de cualquier lesión, es muy eficaz para la prevención del Cáncer invasivo.

Referencias Bibliográficas

- (1) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Lyon, France International Agency for Research on Cancer. 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.
- (2) Crum CP, Abbott DW, Quade BJ. Cervical cancer screening: from the papanicolaou us near to the vaccine era. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21:224-230.
- (3) US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Genital HPV infection: CDC Fact Sheet. 2009; 24. Disponible en: www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm.
- (4) Brown D, Shew M, Qadadri B, et al. A Longitudinal Study of Genital Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Closely Followed Adolescent Women. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005; 19:182-192.
- (5) Herrera-Ortiz A, Arriaga-Demeza C, Conde-González J, Sánchez Alemán M. Conocimiento sobre el virus herpes simple tipo 2 y virus del papiloma humano y percepción de riesgo a adquirir las infecciones entre estudiantes universitarios. *Gaceta Médica de México*. 2013; 149:16-26.
- (6) De Sanjose S, Quint WC, 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*. 2010; 11:1048-56.
- (7) Núñez J, Carrero Y, Gotera J, Delgado M, Callejas D, Araujo M y cols. Virus del Herpes simple tipo 2: influencia en el origen de las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 2006; 66:159-168.
- (8) Promega Corporation. Manual Técnico para Purificación del ADN, Madison, WI USA. 2005.
- (9) Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Zhang T. Persistence of Type-Specific Human Papillomavirus Infection Among Cytologically Normal Women. *J. Infect. Dis.* 1994; 169: 235-40.
- (10) Burk RD, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual Behavior and Partner Characteristics are the Predominant Risk Factors for Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *J. Infect. Dis.* 1994; 174:679-89.
- (11) Sánchez-Aleman MA, Uribe-Salas F. La Infección por el Virus del Papiloma Humano, un Posible Marcador Biológico de Comportamiento Sexual en Estudiantes Universitarios. *Salud Pública Méx.* 2002; 44:442-447.
- (12) Lazcano-Ponce E, Herrero R. Epidemiology of HVP infection among Mexican Women with Normal Cervical Cytology. *Int. J. Cancer*. 2001; 91:412-420.
- (13) Landry M, Ferguson D, Wlochowski J. Detection of Herpes Simplex Virus in Cervical Specimens by Cytospin-Enhanced Direct Immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 302-304.
- (14) Carrero Y, Callejas D, Estévez J, Gotera J, Núñez J, Atencio R, y cols. Relación entre el Herpes Simple tipo 2 y las Lesiones Preinvasivas de Cuello Uterino. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública*. 2006; 23:253-258.
- (15) Benedetti J, Zeh J, Forey L. Clinical Reactivation of Genital Herpes Simplex Virus Infection Decreases in Frequency Over Time. *Ann. Intern. Med.* 1999; 131:14-20.
- (16) Conde-Glez CJ, Juarez-Figueroa L, Uribe-Salas F, Hernandez-Nevárez P, Hernandez-Avila M. Analysis of Herpes Simplex Virus 1 and 2 Infections in Women High Risk Sexual Behaviour in Mexico. *Int. J. Epidemiol.* 1999; 28: 571-6.
- (17) Aryee E, Bailey R, Natividad-Sancho A, Kaye S, Holland J. Detection, quantification and genotyping of Herpes Simple cervico-vaginal secretions by real-time PCR: a cross survey. *Vir J.* 2005; 2:61.
- (18) Rama H, Roteli-Martins CM, Derchein SF, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sanian CO, et al. Prevalence of genital HPV Infection Among a Women Screened Cervical Cancer. *Rev. Sande. Publica.* 2008; 42:123-30.
- (19) Araujo M. Identificación genómica del Virus de Papiloma Humano en células Cervico-

- vaginales. Trabajo de Grado. Universidad del Zulia. 2003; 45p.
- (20) Howayda S, Amany R, and Khadiga D. Prevalence of cervical neoplastic lesions and Human Papillomavirus Infection in Egypt. *Infect. Agent. Cancer.* 2007; 2:12.
- (21) Muñoz M, Mendoza JA, Téllez L, Noguera ME, Moret O, López M, y cols. Detección de VPH-16 Y 18 en Muestras de Cérvis de Mujeres que Acuden a Centros Asistenciales de la Ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev. Biomed.* 2003; 14:61-68.
- (22) González S, Hernández D, Barbila J, Martínez S, García A. Infecciones por virus del papiloma humano de alto y bajo riesgo en mujeres con NIC. Características diferenciales Rv. *Ginecol Obstet.* 2002; 70:11-16.
- (23) Grettell O, Bosques D. Infección por el Virus del Papiloma Humano y Factores Relacionados con la Actividad Sexual en la Génesis del Cáncer del Cuello Uterino. *Rev. Cubana Obstet. Ginecol.* 2005; 31:20-28.
- (24) Fang L, Ward MG, Welsh PA, Budgeon LR, Nelly EB, Howett MK. Suppression of human Papilloma Virus gene expression in vitro and in vivo by Herpes Simplex Virus type 2 infection. *Virology.* 2003; 314:147-50.
- (25) Diestro Tejeda M, Serrano Velasco F, Gómez-Pastrana N. Cáncer de cuello uterino. Estado Actual de las Vacunas al Virus del Papiloma Humano (VPH). *Oncología.* 2007; 30:120-43.
- (26) Smith J, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J. Herpes Simplex Virus 2 A Human Papillomaviruses Cofactor In The Etiology Of Invasive Cervical Cancer. International Agency for Research on Cancer (Iarc) Multicentric Cervical Cancer Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94:1604-13.
- (27) Stuart L, Hebert A, Basarah A, Watt P. Detection of Cervical Infection in Colposcopy Clinic Patients. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:2946-2950.
- (28) Mott P. Papillomaviruses in Human Cancer. *Cancer.* 1996; 1692-6.
- (29) Scuceses M, Panecasio A. Lesión Intraepitelial Asociada a Virus Papiloma Humano. *Rev. Obstet. Ginecon. Venez.* 2001; 61:101-107.
- (30) Kjaer SK. Risk Factors for Cervical Neoplasia in Denmark. *APMIS Suple.* 1998; 80: 1-41.
- (31) Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Liotta DJ. Human Papillomavirus, Cervical Infections and Associated Risk Factors in a Region of Argentina with High Incidence of Cervical Carcinoma. *Infect. Dis. Obstet. Ginecol.* 1999; 7:237-343.
- (32) Manhart L, Holmes K. Randomized controlled trials of individual-level, population-level and multilevel interventions for preventing sexually transmitted infections: what has worked? *J Infect Dis.* 2005; 191:7-24.