

# FRECUENCIA DE DNA-HPV-HR POR MÉTODO AUTOMATIZADO PCR (COBAS®) EN MUESTRAS CERVICOUTERINAS DE UNA POBLACIÓN EN PROBOQUILLA-CARTAGENA, COLOMBIA

Miryam Puerto de Amaya\*, Mercedes Olaya MD\*\*, Carlos Humberto Pérez MD\*\*\*, Sofia Falla\*\*\*\*, Nicole Daniela Castillo\*\*\*\*\*

## Resumen

**Objetivo:** determinar ADN-HPV-HR por método automatizado PCR (cobas®) en muestras cervicouterinas de una población en Proboquilla, Cartagena, Colombia. **Métodos:** serie de casos de mujeres que asistieron a la campaña donde se tomó citología convencional y una segunda muestra en un vial para determinar DNA del HPV-HR mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Resultados:** se recolectaron 31 muestras de citología cérvico-uterina, la prueba PCR fue positiva en seis; 4 casos con infección simple y 2 con infección múltiple. Una de estas últimas fue positiva para los tres grupos (HR-HPV, HPV-16, HPV-18) y la otra para dos (HR-HPV y HPV-18). **Conclusión:** se detectó un grupo de mujeres infectadas por HPVs clasificados de alto riesgo, con infección simple y múltiple, que fueron remitidas a ginecología. Se confirmó la infección por HPV-HR en 5:7 resultados de citología clasificados como ASC-US.

**Palabra clave:** citología, HPV de alto riesgo, neoplasia cervical intraepitelial, atipia indeterminada de células escamosas.

## COBAS® AUTOMATED PCR – BASED DETECTION OF HR-HPV DNA IN CERVIX SAMPLES COLLECTED AMONG A POPULATION IN PROBOQUILLA-CARTAGENA, COLOMBIA

## Abstract

**Objective:** to determine HR-HPV DNA detection using the Cobas® PCR automated method in cervix samples collected among women of Proboquilla, Cartagena, Colombia. **Methods:** case series based on conventional cytology and second samples, in a vial, through polymerase chain reaction (PCR) testing for HR-HPV DNA detection, among women who attended the campaign. **Results:** we collected 31 cervix cytology samples, PCR test was positive in six; 4 cases had a simple infection and 2 a multiple infection. One of the latter was positive for the three types (HR-HPV, HPV-16, HPV-18) and the other for two (HR-HPV and HPV-18). **Conclusion:** high risk HPV infection as well as simple and multiple infections were identified in a group of women and were referred to the gynecology department. HR-HPV infection was confirmed in 5:7 ASC-US cytology results.

**Key words:** cytology, high-risk HPV, intraepithelial cervical neoplasia, atypical squamous cells of undetermined significance

Fecha recibido: febrero 17 de 2014 - Fecha aceptado: junio 3 de 2014

\* Bacterióloga, citohistóloga. Profesor Asistente, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá DC, Colombia.

\*\* Médica patóloga perinatal. Profesora Asistente, Pontificia Universidad Javeriana, Hospital Universitario San Ignacio. Bogotá, DC, Colombia.

\*\*\* Ginecólogo, colposcopista, Hospital de San José, Bogotá DC, Colombia.

\*\*\*\* Estudiantes de Citohistología, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Bogotá DC, Colombia.

\*\*\*\*\* Merideidy Plazas Vargas. Asesora metodológica. Profesora Asociada de Epidemiología, División de Investigaciones, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá DC, Colombia.

## Introducción

Durante varios años, diferentes países del mundo han implementado dentro de sus políticas de salud pública, programas de tamizaje primario en la población femenina, mediante la práctica de citología cérvico-uterina convencional, con la finalidad de aumentar la detección temprana del cáncer de cuello uterino. La citología convencional como prueba de cribado primario, contribuyó a disminuir su frecuencia en cerca de 75% en los países industrializados, en un período de más o menos 20 años (1966 a 1987), no hubo esta misma respuesta en los países menos industrializados.<sup>1,2</sup>

La persistencia de altas tasas de morbilidad y mortalidad en el cáncer de cuello uterino, 80% en países en vías de desarrollo y 20% en países desarrollados<sup>3,4</sup> y una mayor comprensión de los mecanismos etiológicos y de la historia natural de la enfermedad, llevaron a la comunidad científica, a la búsqueda de pruebas diagnósticas más sensibles y reproducibles.<sup>5</sup>

Harald zur Hausen en los años 80 propuso la relación entre el cáncer cérvicouterino y HPV. En 1976 publicó la hipótesis de que el virus jugaba un papel importante en la causa del cáncer de cuello del útero. Por sus trabajos en la sustentación de este descubrimiento y por el aislamiento de estos virus, recibió el premio Nobel de Medicina en 2008.<sup>6</sup>

En la infección latente por HPV, que se caracteriza por un estado subclínico, es poco evidente el cambio morfológico; diferente a la fase productiva donde se crea una intensa expresión de la carga genética viral, que genera cambios citopáticos en el epitelio cervicouterino por la presencia del HPV, como los coilocitos y los disqueratocitos considerados cambios mayores<sup>7</sup> y otros menos específicos llamados criterios menores como macrocitos, seudocoilocitos, células polka, células balón o tipo adipocito y las células cometa o renacuajo.<sup>8,9</sup>

También se han definido factores de riesgo en el desarrollo de esta infección, como la promiscuidad, inicio temprano de relaciones sexuales, uso prolongado de anticonceptivos, coinfecciones con otros microorga-

nismos o virus como el herpes, la persistencia de la infección por HPV oncogénicos, carga viral elevada y también se habla de una disposición genética. Es considerado de relevancia clínica, el cociente de positividad de los tipos de alto y bajo riesgo detectados por la prueba molecular y no por la citología.<sup>10,11</sup>

En Colombia, el cáncer de cuello uterino (CCU) es la segunda causa de mortalidad general por neoplasias en mujeres; para el 2004 esta tasa fue de 9,4 por 100.000 mujeres, colocándola como la primera causa de muerte en la población femenina entre 30 y 59 años.<sup>12</sup> En 1990 se creó en Colombia el Programa Nacional de Detección Precoz de CCU, el cual, conjuntamente con otras actividades de control de la patología, son prioridad de salud pública en el actual Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS). El Ministerio de Salud y Protección Social establece en el Plan Nacional para el Control del Cáncer en Colombia 2012-2020, iniciar al año 2013 la transición de tamización de cáncer de cuello uterino, de citología a pruebas moleculares de detección temprana de HPV en cinco principales ciudades del país.<sup>13</sup>

La evolución de citología convencional a citología en base líquida, permite con una misma muestra realizar diferentes análisis como la detección de antígenos virales mediante inmunocitoquímica o prueba molecular para identificar el DNA del HPV, determinando precozmente su infección.<sup>14</sup>

Diversos estudios muestran que la prueba molecular PCR para HPV presenta una mayor sensibilidad (entre 85 y 100%) con respecto a la citología (53%), mientras que la especificidad ha resultado inferior (94.1%), frente a la descrita para la citología (96.8%). La PCR no tiene la variabilidad interobservador encontrada en lectura de los extendidos.<sup>15,16</sup> Esto significa que con esta prueba se detectará con mayor precisión los casos positivos (enfermos), aunque eventualmente podría aumentar el número de falsos positivos.<sup>17-20</sup>

Con éste trabajo se pretende determinar el DNA-HPV-HR por método automatizado PCR (cobas®) en muestras cervicouterinas de una población en Proboquilla, Cartagena. En esta forma se confirmará la

infección por HPV-HR en muestras con resultados dudosos en citología.

## Materiales y métodos

Diseño: estudio serie de casos. El programa de Proyección Social de la FUCS, realizó una jornada de salud, en 2012 en Proboquilla-Cartagena. Asistieron en forma voluntaria 57 mujeres mayores de edad, para toma de citología convencional. Se incluyeron mayores de 18 años, no histectomizadas, no embarazadas, con vida sexual y que firmaran el consentimiento informado. A 31 pacientes se realizó muestra de citología convencional y una segunda muestra para análisis molecular del DNA. Otras variables fueron: edad, paridad, edad de inicio de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, método de planificación familiar, hábito de fumar, antecedente de enfermedad de transmisión sexual y para el análisis de resultados se tuvo en cuenta la variable “otras infecciones” concomitantes.

Los extendidos fueron procesados y analizados en Cartagena por una citohistóloga, los casos de citología positivos, fueron revisados por un patólogo. Se utilizó la coloración de Papanicolaou y la clasificación de Bethesda 2001 para la interpretación. Los casos de citología que fueron confirmados como positivos, estuvieron atendidos en la consulta de ginecología, dentro del desarrollo del programa de proyección social.

## Muestra para biología molecular

Después de la citología convencional, de inmediato fue tomada la muestra para prueba molecular complementaria PCR; se conservó en el vial de referencia Roche® (cobas® PCR Cell Collection Media). Ésta prueba se efectuó en el equipo de Laboratorios Roche, método automatizado para PCR (COBAS-4800), siguiendo las instrucciones técnicas (Manual Roche® Linear Array HPV Genotyping Test, para diagnóstico in vitro).

Los resultados fueron clasificados en negativo o positivo para HPV oncogénico, obteniendo tres resultados simultáneos para cada muestra, así: grupo de alto riesgo constituido por 12 tipos de HPV (31,33,35,39,45,51,

52,56,58,59,66 y 68) llamados HR-HPV y se identifican e informan además los genotipos 16 y 18 para un total de 14 genotipos. Las variables cualitativas se analizaron con frecuencias y las cuantitativas con medidas de tendencia central y dispersión en *excel*. El trabajo fue aprobado por el comité de ética e investigación en seres humanos de la FUCS.

## Resultados

Se evaluó la presencia de infección por HPV en 31 muestras de citología cérvico-uterina. El rango de edad de la población estudio fue 19 a 64 años con un promedio de 34.8 años. De las 31 analizadas por citología se clasificaron 7 (22.6%) como ASCUS y 2 (6.4%) LSIL (**Tabla 1**). La **Tabla 2** muestra los casos positivos mediante PCR distribuidos por tipo viral.

De las siete muestras clasificadas como ASCUS, cinco tuvieron prueba molecular positiva, uno de estos casos presenta positividad para dos grupos de genotipos virales. De las clasificadas como LSIL, una fue positiva para los tres grupos virales analizados mediante PCR, lo cual justifica los resultados mostrados en la **Tabla 3**. La prueba fue positiva en 6 (19,3%) muestras exa-

**Tabla 1.** Hallazgos citológicos según la clasificación Bethesda

| Citología | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa (%) |
|-----------|---------------------|-------------------------|
| Negativa  | 22                  | 71.0                    |
| ASCUS     | 7                   | 22.6                    |
| L-SIL     | 2                   | 6.4                     |
| H-SIL     | 0                   | 0                       |
| Total     | 31                  | 100                     |

**Tabla 2.** Resultados de PCR

| Tipo de HPV          | Frecuencia absoluta |
|----------------------|---------------------|
| Alto riesgo (HR-HPV) | 4                   |
| HPV-18               | 4                   |
| HPV-16               | 1                   |
| Total                | 9                   |

minadas con PCR. Se presentaron cuatro casos con infección simple y dos con infección múltiple. Una de las últimas fue positiva para los tres grupos (HR-HPV, HPV-16, HPV-18) y la otra para dos (HR-HPV y HPV-18) (**Tabla 4**).

## Discusión

Este es un trabajo realizado en el marco del Programa de Proyección Social de la FUCS y atendiendo los lineamientos del Plan para el Control del Cáncer en Colombia 2012-2020, cuyas metas plantean iniciar al año 2013 la transición de tamización del Cáncer Cérvico Uterino de Citología a pruebas moleculares de detección temprana de HPV en las cinco principales ciudades del país (Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla y Bucaramanga).<sup>21</sup>

**Tabla 3. Hallazgos citológicos y PCR**

| Diagnóstico citológico | HR-HPV | HPV-18 | HPV-16 | Negativo | Total |
|------------------------|--------|--------|--------|----------|-------|
| Negativo               | 0      | 0      | 0      | 21       | 21    |
| ASCUS                  | 3      | 3      | 0      | 2        | 8     |
| L-SIL                  | 1      | 1      | 1      | 1        | 4     |
| Total                  | 4      | 4      | 1      | 24       | 33    |

De las 31 pacientes examinadas 6 (19.3%) resultaron positivas para 1 ó más tipos de HPV (**Tabla 4**), de las cuales 4 (66.6%) tuvieron infección simple, mientras que 2 (33.3%) tuvieron infección múltiple (**Tabla 1**). Muñoz y colaboradores encontraron en 2003 frecuencias de 91,9% para infecciones simples y 8,1% para múltiples.<sup>22</sup> Mientras que García y col. en 2010 obtuvieron frecuencias de 19,4% para infecciones simples y 80,6% para múltiples.<sup>23</sup>

Cinco de las seis pacientes que resultaron positivas para algún tipo de HPV tuvieron diagnóstico citológico de anomalías de células epiteliales escamosas de significado indeterminado (ASCUS), y un caso que resultó positivo para las tres pruebas de DNA viral estudiados tenía diagnóstico citológico de L-SIL.

El rango de edad de inicio de relaciones sexuales (IRS) estuvo entre 12 y 27 años y el promedio fue 18.2 años. De los seis casos que resultaron positivos para alguno de los tipos de HPV, uno (con infección simple) tiene antecedente de inicio a los trece años, y otro de infección múltiple (triple) a los 16 años. Los demás casos positivos para algún tipo de HPV declararon edad de IRS a los 18 años o más. Bosch y colaboradores han

**Tabla 4. Distribución de casos positivos por citología y/o PCR de DNA-HPV según variables**

| Edad (años) | PRUEBA HPV             | Diagnóstico citológico | Otras infecciones            | Edad IRS* | Ncs+ | Ets‡ | Fuma | Gestaciones | Partos | Cesáreas | Abortos | Métodos de planificar |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------------|-----------|------|------|------|-------------|--------|----------|---------|-----------------------|
| 32          | (-)                    | ASCUS                  | Actinomyces                  | 16 A      | 1    | no   | no   | 2           | 2      | 0        | 0       | píldora               |
| 21          | HR-HPV, HPV 16, HPV 18 | L-SIL                  |                              | 16 A      | 2    | si   | no   | 3           | 0      | 2        | 1       | preservativo          |
| 39          | HPV-18                 | ASCUS                  | Hongos                       | 21 A      | 1    | no   | no   | 4           | 1      | 2        | 1       | ligadura              |
| 64          | HR-HPV                 | ASCUS                  |                              | 22 A      | 1    | no   | no   | 4           | 4      | 0        | 0       | ligadura              |
| 36          | HPV-18                 | ASCUS                  | Vaginosis bacteriana         | 20 A      | 2    | no   | no   | 1           | 0      | 1        | 0       | inyectable            |
| 40          | (-)                    | L-SIL                  |                              | 20 A      | 1    | no   | no   | 3           | 2      | 0        | 1       | inyectable            |
| 26          | HR-HPV                 | ASCUS                  | Hongos                       | 13 A      | 1    | no   | no   | 6           | 6      | 0        | 0       | ligadura              |
| 42          | (-)                    | ASCUS                  |                              | 18 A      | 2    | no   | no   | 3           | 3      | 0        | 0       | preservativo          |
| 19          | HR-HPV, HPV-18         | ASCUS                  | Hongos, vaginosis Bacteriana | 18 A      | 1    | no   | no   | 0           | 0      | 0        | 0       | preservativo          |

\*IRS, inicio de relaciones sexuales; +, número de compañeros sexuales; ‡ enfermedades de transmisión sexual.

encontrado que el riesgo de lesión intraepitelial cuando el primer coito se tiene a los 17 años o antes, es 2.4 veces mayor que cuando este se tiene a los 21 años.<sup>24</sup>

En cuanto a coinfecciones encontramos que cuatro de los seis positivos para algún tipo de HPV presentaron uno o más microorganismos concomitantes, dos de ellos fueron descritos como hongos (s.p), uno presentó hongos en combinación con vaginosis bacteriana (*Gardnerella*) y otro solo vaginosis. Nasser y colaboradores en 2011 encontraron que el grupo de pacientes con diagnóstico citológico de ASCUS más infección tuvo una proporción significativamente mayor de pruebas HPV positivas que el grupo ASCUS sin infección.<sup>25</sup>

De las seis pacientes positivas para algún genotipo DNA viral oncogénico, dos declararon dos compañeros sexuales, mientras que uno las restantes cuatro. Se ha descrito en la literatura una relación proporcional directa entre el riesgo de lesión intraepitelial y el número de parejas sexuales, al aumentar la probabilidad de exposición al HPV.<sup>26</sup>

Una paciente fue positiva en las tres determinaciones (los genotipos 16, 18 y el grupo de alto riesgo) y manifestó antecedentes de enfermedades de transmisión sexual. Se ha demostrado la asociación de cáncer de cuello uterino con sífilis o blenorragia.<sup>26</sup>

En cuanto al número de gestaciones, cuatro de las seis pacientes con resultado positivo para ADN- HPV tienen antecedentes de una ó más. Aunque no existe explicación definitiva, se cree que la inmunosupresión transitoria del embarazo o su influjo hormonal, aumentan la susceptibilidad a la infección por HPV, se ha establecido que mujeres con dos o más hijos tienen mayor riesgo de contraer la infección que las nultíparas.<sup>27</sup>

Ninguna de las pacientes con prueba DNA-HPV positiva manifestó hábito de fumar. Se describe una relación directa entre el riesgo de lesiones preinvasoras y la duración e intensidad del hábito, aunque estudios de gran envergadura no soportan con claridad la asociación directa entre tabaquismo y el cáncer del cuello uterino.<sup>28</sup>

Dos pacientes con infección por HPV oncogénico múltiple, manifestaron usar método de planificación de barrera. Este resultado estaría en contradicción con la literatura encontrada que sustenta que tanto el preservativo, como el diafragma e incluso los espermicidas han mostrado disminución en la posibilidad de cáncer cervicouterino, al parecer por su efecto sobre la transmisión del HPV.<sup>26</sup>

## Conclusiones

Se detectó un grupo de mujeres infectadas por HPV clasificados de alto riesgo, con infección simple y múltiple que fueron remitidas a ginecología. Se confirmó la infección por HPV-HR en cinco de los siete casos clasificados como ASC-US. La facultad de Cito-histotecnología y la FUCS, aportan esta investigación, serie de casos, que servirá de referencia en el desarrollo de nuevas campañas en el marco del programa de proyección social. Además de orientar a los estudiantes en su rol dentro de las nuevas políticas de los programas de prevención del cáncer de cuello a nivel nacional.

## Referencias

1. Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, et al. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud pública Méx.* 2010;52(6): 544-59.
2. Mckinley E. Principios generales de citología. En: Atkinson BF, editor. *Atlas de diagnóstico citopatológico.* Madrid: Elsevier; 2005. p. 1-30.
3. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA.* 1989; 261(5):737-43.
4. Denny L. The prevention of cervical cancer in developing countries. *BJOG.* 2005;112(9):1204-12.
5. Agorastos T. Auto-toma de muestras para la realización del VPH: facilitando el acceso a los servicios sanitarios. *HPV Today.* 2007 Feb; 10: 12.
6. Kumar VA, Abbas AK. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* 7a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
7. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol.* 2003;77(19):10186-201.
8. DeMay RM. The pap smear. In: ASCP, editor. *The art and science of Cytopathology.* Chicago : ASCP Press;1996. p. 61-172.
9. Sadeghi SB, Sadeghi A, Robboy SJ. Prevalence of dysplasia and cancer of the cervix in a nationwide, planned parenthood population. *Cancer.* 1988;61(11):2359-61.
10. Muñoz N, Bravo LE. Epidemiología del cáncer de cuello uterino en Colombia. *Colomb Med.* 2012;43(4):298-304.
11. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV international papillomavirus conference. *J Clin Pathol.* 2001; 54:163-75.

12. Piñeros Petersen M, Murillo Moreno RH. Incidencia de cancer en Colombia: importancia de las fuentes de nformacion en las obtencion de cifras estimativas. *Rev Col Cancerol.* 2004; 8(1): 5-14.
13. Colombia. Ministerio de Salud. Resolución 412 de Febrero 25 de 2000 por la cual se establecen las actividades, procedimientos e intervenciones de demanda inducida y obligatorio cumplimiento y se adoptan las normas técnicas y guías de atención para el desarrollo de las acciones de protección específica y detección temprana y la atención de enfermedades de interés en salud pública.
14. Rodríguez Costa J, Sáez de Santamaría J, De Agustín Vázquez D. *Citología líquida.* Madrid : Díaz de Santos, c2006.
15. Cuzick J. Test de VPH versus cribado cervical convencional. *Cribado del VPH. HPV Today.* 2007 Feb; 10: 5.
16. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1579-88.
17. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, Zhang WH, Elson P, Li L, et al. Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: a cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2001;83(2):439-44.
18. Schneider A, Hoyer H, Lotz B, Leistrizta S, Kühne-Heid R, Nindl I, et al. Screening for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer.* 2000;89(6):529-34.
19. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, Zappa M, Casadei GP, Carozzi F, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(11):765-74.
20. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Dalla Palma P, Del Mistro A, De Marco L, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial. *Lancet oncol.* 2006;7(7):547-55.
21. Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social para el control del cáncer del cuello uterino, (2013-2020). Bogotá: El Ministerio; 2012.
22. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
23. Garcia DA, Schmitt M, Cid Arregui A, Castillo M, Briceño I, Aristizabal FA. Genotipificación del virus del papiloma humano (VPH) en muestras de cepillados cervicales de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010; 61(04):310-8.
24. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796-802.
25. Nasser H, Hayek S, Balasubramaniam M, Kuntzman TJ. Infectious organisms on Papanicolaou smears should not influence the diagnosis of atypical Squamous cells of undetermined Significance. *Acta Cytol.* 2011;55(3):251-4.
26. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr; 55(4):244-65.
27. Castaneda Iñiguez MS, Toledo Cisneros R, Aguilera Delgadillo M. Factores de riesgo para cancer cervicouterino en mujeres de Zacatecas. *Salud Publica Mex.* 1998;40(4):330-8.
28. Thun MJ, Apicella LF, Henley SJ. Smoking vs other risk factors as the cause of smoking-attributable deaths: confounding in the courtroom. *JAMA.* 2000;284(6):706-12.

