

Genotipagem do vírus do papiloma humano de alto risco como ferramenta útil em estudos epidemiológicos antes e após a vacinação para prevenção do câncer do colo de útero

Genotyping of human papilloma virus as a useful tool for epidemiological studies before and after preventive vaccination against cervical cancer

Thaís Louvain de Souza¹, Antônio Francisco Alves da Silva^{1,2}, Gabriela Moreira Balarini³, Carlos Henrique da Silva Paes³, Rosely de Vasconcellos Meissner⁴, José Veríssimo Fernandes⁴, Enrique Medina-Acosta¹.

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, ² Hospital Escola Álvaro Alvim, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, ³ Ambulatório de Ginecologia do Hospital Escola Álvaro Alvim, Faculdade de Medicina de Campos, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, ⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Natal, RN, Brasil.

RESUMO

Introdução: A infecção persistente por determinados genótipos do vírus do papiloma humano (HPV) em mulheres é um reconhecido fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical. O câncer cervical é a quarta causa de morte em mulheres no Brasil. A vacinação contra o HPV é uma medida efetiva de saúde pública para prevenção de câncer cervical. **Objetivo:** Desenvolver um teste molecular genótipo-específico para HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45, que em conjunto são responsáveis por 85% dos casos de câncer cervical.

Métodos: Detecção de DNA viral genótipo-específico pela técnica da reação multiplex quantitativa por fluorescência em cadeia da polimerase (QF-PCR). Foram genotipadas amostras clínicas de esfregaço vaginal de 28 pacientes atendidas no Ambulatório de Ginecologia do Hospital Escola Álvaro Alvim, incluídas pela triagem de lesões cérvico-vaginais de baixo ou de alto grau.

Resultados: Foi desenvolvido um ensaio multiplex para a detecção simultânea dos genótipos HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45. Quinze (53,6%) amostras foram positivas para pelo menos um genótipo de HPV de alto risco, sendo o HPV-16 o mais prevalente (50%); quatro (14,3%) amostras foram positivas para o HPV-16 e HPV-31, indicando co-infecção. Apenas uma (3,6%) amostra foi positiva para ambos os genótipos HPV-16 e HPV-18. Nenhuma amostra foi positiva para o genótipo HPV-45.

Conclusões: O ensaio multiplex desenvolvido é um teste sensível e rápido, útil em estudos de epidemiologia antes e após a vacinação contra o HPV.

Descritores: câncer cervical, câncer de colo uterino, genotipagem, HPV, teste genético, vírus do papiloma humano.

ABSTRACT

Introduction: Persistent infection by some genotypes of the human papillomavirus (HPV) in women is a recognized risk factor for development of intraepithelial cervical neoplasia. Cervical cancer is the fourth cause of death in women in Brazil. Vaccination against HPV is an effective public health measure to prevent cervical cancer. **Objective:** To develop a molecular test specific for HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45 types, which together account for 85% of cases of cervical cancer.

Methods: Detection of type-specific viral DNA by the technique of quantitative fluorescent polymerase chain multiplex reaction (QF-PCR). Clinical samples of vaginal swabs were genotyped from 28 patients, undergoing screening for low and high-grade cervico-vaginal lesions, and attending the Ambulatory of Gynecology of the Hospital Escola Álvaro Alvim.

Results: A type-specific cervico-vaginal HPV multiplex assay was developed for the simultaneous detection of HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45. Fifteen (53.6%) samples were positives for at least one HPV high-risk type, HPV-16 being the most prevalent (50%); four samples tested positive for HPV-16 and HPV-31, indicating co-infection. Only one (3.6%) sample tested positive for both HPV-16 and HPV-18. None of the samples tested positive for HPV-45 type.

Conclusions: The multiplex assay developed is a sensitive and rapid test, useful in molecular epidemiology studies before and after vaccination against HPV.

Keywords: cervical cancer, cervical uterine cancer, genotyping, genetic typing test, HPV, human papillomavirus.

Autor para correspondência: Enrique Medina-Acosta, Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, sede Hospital Escola Álvaro Alvim, Rua Barão da Lagoa Dourada 409, Prédio novo, 1º andar, Pelinca, Campos dos Goytacazes CEP 28035-010, Tel/Fax: (022) 2726 6758; E-mail: quique@uenf.br

INTRODUÇÃO

O vírus do papiloma humano (HPV) é exclusivamente intra-epitelial e possui tropismo para queratinócitos¹. A infecção inicia-se através de microlesões pré-estabelecidas, responsáveis pela exposição da lâmina basal². Estudos epidemiológicos baseados na detecção de DNA viral em material cérvico-vaginal indicam que a prevalência da infecção genital por HPV em mulheres jovens sexualmente ativas é cerca de 60-80%³⁻⁵. A infecção persistente pelo HPV é considerada um fator necessário, porém não suficiente, para o desenvolvimento de câncer cervical. Em >99% de todos os casos de câncer cervical o HPV é detectado^{6,7}. A carga viral elevada é determinante para a rápida progressão e gravidade das neoplasias intra-epiteliais. Estima-se que o tempo médio para o aparecimento de anormalidades detectáveis e o desenvolvimento da doença seja cerca de 10 anos, tornando o diagnóstico precoce de grande importância na profilaxia.

Apenas 35 dos mais de 200 genótipos de HPV são transmitidos sexualmente⁸. Em relação ao risco para câncer cervical, eles são agrupados em três categorias: (i) alto risco (genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82); (ii) possível alto risco (genótipos 26, 53 e 66); e (iii) baixo risco (genótipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81)⁹.

Os métodos mais utilizados para a detecção de DNA viral em amostras citológicas e histopatológicas são a hibridação com sondas de DNA (captura híbrida em líquido e hibridação em sólido) e a reação em cadeia da polimerase (PCR)^{4, 7, 10-12}. Não há diferença significativa na sensibilidade da detecção entre estes métodos^{13, 14}. Não obstante, devido à possibilidade de diferenciação entre os genótipos, o método da PCR apresenta vantagens importantes sobre os métodos de hibridação com sondas. Assim sendo, a PCR permite determinar os perfis de co-infecção e obtenção de dados epidemiológicos. Todavia, a detecção do DNA ou RNA viral é o melhor método para ser utilizado em situações de infecção latente, onde a paciente se encontra assintomática e a presença do vírus não é detectada pela citologia¹¹.

A Secretaria Municipal de Saúde de Campos dos Goytacazes deu início em setembro de 2010 à Campanha de Vacinação contra o HPV, cuja meta é imunizar com a vacina tetravalente, 17 mil alunas das redes do ensino público e particular, na faixa etária de 11 a 15 anos¹⁵. O cenário epidemiológico molecular do HPV no município é desconhecido. Para avaliar o impacto na prevenção são necessários estudos que determinem a prevalência dos genótipos relevantes à formulação vacinal (HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18) e circulantes.

O presente estudo pretende contribuir com o desenvolvimento de um teste molecular específico para HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45. Em conjunto, estes genótipos são responsáveis por 85% dos casos de câncer cervical.

MÉTODOS

DNA viral referência: Para validação da especificidade do teste desenvolvido foram utilizadas amostras de DNA referência para os genótipos HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-45. Estas amostras de referência foram previamente genotipadas utilizando PCR seguida de hibridação de sondas^{7, 12}.

Sujeitos da pesquisa: Este estudo faz parte do projeto de pesquisa

intitulado "Correlação da citologia, colposcopia e histologia com a PCR-multiplex na infecção cérvico-vaginal pelo HPV", aprovado pela Comissão Regional de Ética envolvendo seres humanos da Faculdade de Medicina de Campos, sob FR-293511. A participação nesta pesquisa foi voluntária sob Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram genotipadas amostras de esfregaço cérvico-vaginal de 28 pacientes (22 a 88 anos de idade) atendidas no Ambulatório de Ginecologia do Hospital Escola Álvaro Alvim, incluídas pela triagem (citologia, histologia e colposcopia) para lesões cérvico-vaginais de baixo ou de alto grau.

Extração de DNA: DNA genômico foi extraído utilizando o kit comercial Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare, UK) e subsequentemente armazenado em freezer a -20 °C.

Genotipagem: Iniciadores 5' e 3' foram redesenhados a partir de sequências publicadas para os genótipos HPV-16, HPV-18, HPV-45 e HPV-31, utilizando os programas livres e on-line: OligoPerfect™ Designer da Invitrogen™ (<http://www.invitrogen.com/>) e o OligoCalc Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), visando permitir a amplificação simultânea em ensaio multiplex de até seis locos de tamanho entre 120 e 300 bp por reação. Os iniciadores 5' foram modificados com os fluorocromos FAM (HPV-16), PET (HPV-18 e HPV-31) e VIC (HPV-45). A reação de amplificação (12,5 L) consistiu de aproximadamente 4 ng de DNA genômico, 0,25-1 M de iniciadores, 0,2 mM dNTP, 1,25 U Taq Gold polimerase (Applied Biosystems, USA), 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 e 50 mM KCl. As condições de amplificação foram 95 °C por 11 min (1 ciclo); 94 °C x 1 min; 59 °C x 1 min; 72 °C x 1 min (35 ciclos) e 60 °C x 60 min (1 ciclo) em termociclador Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, EUA). Os produtos foram separados por eletroforese capilar de alta resolução em analisador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Os perfis alélicos foram determinados utilizando os programas GeneScan Analysis 3.7 e Genotyper 3.7 softwares (Applied Biosystems) e são mostrados na forma de eletroferogramas. Para verificar a presença de DNA humano, todas as amostras foram também genotipadas para o loco de microssatélite [GT]_n no intron II do gene TLR2, utilizando iniciadores redesenhados a partir de sequências publicadas¹⁷.

RESULTADOS

Os produtos específicos de amplificação consistem de 267, 241, 196 and 158 pares de bases para os genótipos HPV-16, HPV-18, HPV-31 and HPV-45, respectivamente (**Figura 1**).

Os iniciadores foram utilizados no desenvolvimento de um ensaio de genotipagem simultânea (em tubo único) da PCR quantitativa por fluorescência. O tempo médio de execução do teste, incluindo a extração de DNA e a genotipagem, foi de 10 horas. Quinze (53,6%) das amostras clínicas foram positivas para pelo menos um genótipo de HPV de alto risco (**Tabela 1**), sendo o HPV-16 o mais prevalente (50%); quatro (14,3%) das amostras foram positivas para o HPV-16 e HPV-31 (**Figura 2**), indicando co-infecção. Uma amostra (3,57%) foi positiva para co-infecção com os genótipos HPV-16/HPV-18 (**Figura 3**). O genótipo HPV-18 foi detectado somente em uma amostra (3,57%). Em nenhuma das amostras foi detectado HPV-45. A média da idade das pacientes com DNA viral detectável pela genotipagem foi de 34,8 anos (**Tabela 2**).

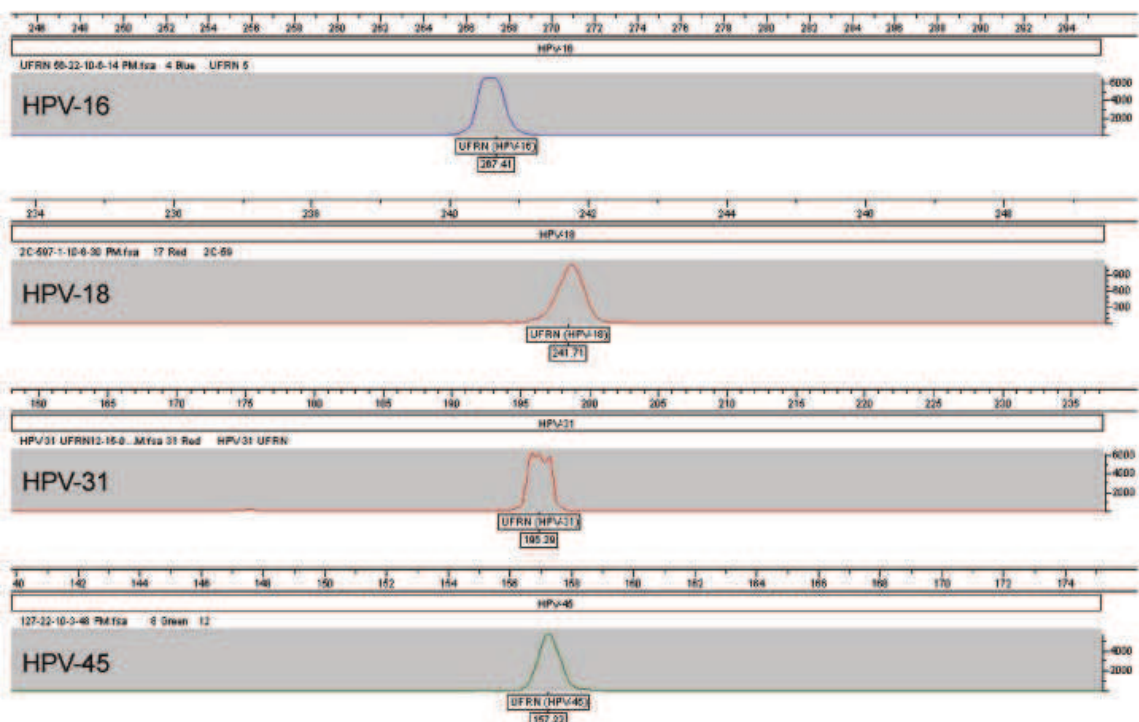


Figura 1. Eletroferogramas representativos dos produtos de amplificação utilizando DNA referência para os genótipos HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45. Os produtos consistem de 267, 241, 196 and 158 pares de bases, respectivamente, marcados com fluorocromos FAM (HPV-16), PET (HPV-18 e HPV-31) VIC (HPV-45).

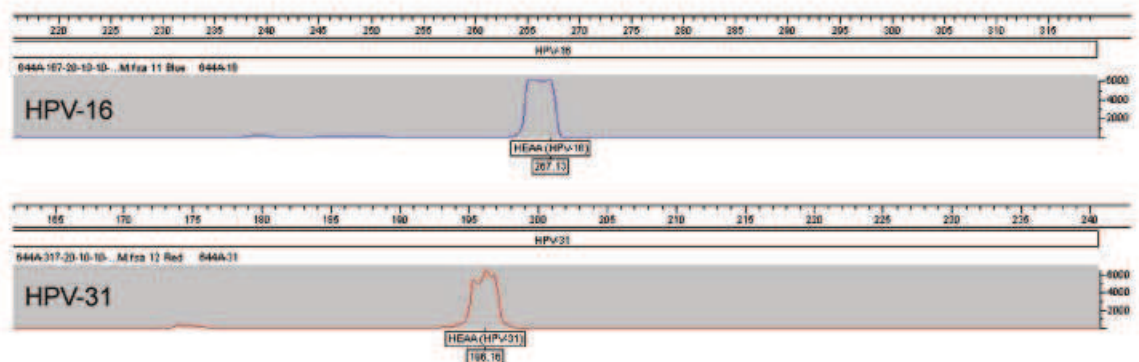


Figura 2. Eletroferogramas representativos dos produtos de amplificação utilizando DNA de amostra clínica. O resultado é indicativo de co-infecção por HPV-16 e HPV-31, dois genótipos de alto risco para câncer cervical. Paciente com exame citopatológico sugestivo de infecção pelo HPV e neoplasia intraepitelial de alto grau.

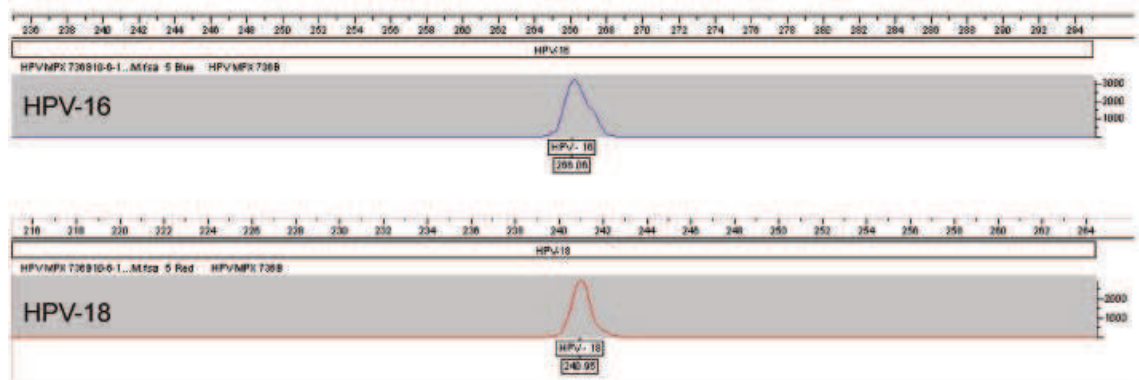


Figura 3. Eletroferogramas representativos dos produtos de amplificação utilizando DNA de amostra clínica. O resultado é indicativo de co-infecção por HPV-16 e HPV-18, dois genótipos de alto risco para câncer cervical. A paciente apresentou citologia indicativa de HPV e neoplasia intraepitelial de alto grau.

Tabela 1. Distribuição dos genótipos de alto risco para o câncer cervical em amostras biológicas com resultados positivos pelo ensaio da PCR quantitativa por fluorescência.

Amostra	HPV-16	HPV-18	HPV-31	PV-45
1	+	N/D	N/D	N/D
2	+	N/D	N/D	N/D
3	+	N/D	N/D	N/D
4	+	N/D	+	N/D
5	+	N/D	N/D	N/D
6	N/D	+	N/D	N/D
7	+	N/D	N/D	N/D
8	+	N/D	N/D	N/D
9	+	N/D	N/D	N/D
10	+	N/D	+	N/D
11	+	N/D	N/D	N/D
12	+	N/D	N/D	N/D
13	+	N/D	+	N/D
14	+	N/D	+	N/D
15	+	+	N/D	N/D
Frequência % (+/n)	93,3 (14/15)	13,3 (2/15)	26,6 (4/15)	0 (0/15)

(+) resultado positivo: genótipo de HPV detectado.
(N/D) genótipo viral não detectado.

Tabela 2. Prevalência dos quatro genótipos de alto risco estudados nas amostras clínicas em pacientes com lesão neoplásica cervical e média de idade das pacientes.

Genótipo do HPV	Prevalência (%)	Média da idade (anos)
HPV-16	56,5	35,4
HPV-18	4,3	25
HPV-31	13	37,5
HPV-45	0	-

DISCUSSÃO

Diversos novos ensaios de genotipagem multiplex pela PCR têm se juntado ao arsenal diagnóstico disponível para a detecção precoce do câncer de colo uterino e utilizados em estudos de epidemiologia molecular do HPV em diferentes populações^{10, 18-20}. A genotipagem multiplex oferece importantes vantagens quanto ao baixo custo e rapidez na identificação de genótipos circulantes.

O ensaio de genotipagem multiplex pela QF-PCR desenvolvido neste estudo mostra-se específico e de fácil execução, constituindo-se uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos antes e após a vacinação. Em nosso grupo de estudo houve uma predominância do genótipo HPV-16, o qual esteve presente em 46,4% das pacientes testadas. Este genótipo é o mais prevalente em mulheres com lesões pré-cancerosas e com câncer de colo uterino, inclusive no Brasil^{5, 7, 12}. Os genótipos 16 e 18, em conjunto, estão presentes no mundo em aproximadamente 74,6% dos cânceres cervicais^{7, 9, 12}. Uma vez, que lesões geradas por HPV de

alto e baixo risco são indistinguíveis²¹, estes dados evidenciam a importância da genotipagem viral para o diagnóstico da presença viral em lesões susceptíveis à formação de neoplasias.

No Brasil os testes moleculares de diagnóstico de HPV (captura híbrida e genotipagem por PCR) assim como a citologia em meio líquido não fazem parte do rol de testes cobertos pelo reembolso do Sistema Único de Saúde (SUS) para o rastreamento de HPV. Rumo à inclusão dessas tecnologias no atendimento pelo SUS, estudos de custo-efetividade similares aos do teste de Papanicolaou são necessários para que estes sejam competitivamente assumidos pelo sistema público. Por exemplo, estima-se que o custo de cada caso adicional de câncer cérvico-uterino detectado pela tecnologia de captura híbrida seja 10 vezes maior do que utilizando o teste de Papanicolaou²². A estimativa do reembolso pelo SUS para o teste de captura híbrida é quatro vezes maior do que para o teste de Papanicolaou.

Está sendo disponibilizada no município de Campos dos Goytacazes a vacina Gardasil® que faz a cobertura dos genótipos HPV-6, HPV-11, HPV-16 e HPV-18. Entretanto, em nosso estudo o genótipo HPV-31 foi o segundo mais prevalente em amostras clínicas de pacientes com lesões neoplásicas intraepiteliais. O HPV-31 e o HPV-45 não são cobertos pela vacina tetravalente, mas estudos demonstram que existe uma proteção cruzada de 38% para as infecções ocasionadas por estes genótipos que são os mais presentes em câncer do colo uterino depois do subtipo HPV-16 e HPV-18²³. A durabilidade da imunização pela Gardasil® ainda não está determinada, mas após cinco anos ainda é possível detectar leucócitos que respondem especificamente para as proteínas do HPV-16 e HPV-18 utilizados na vacina²⁴. Assim sendo, os nossos dados, embora preliminares, claramente apontam para a necessidade de um estudo epidemiológico sobre os genótipos de HPV circulantes na população de Campos dos Goytacazes na era de vacinação. É importante que seja estimado o eventual impacto na saúde da mulher quanto à transmissão de genótipos circulantes não cobertos pela vacina tetravalente.

CONCLUSÃO

O ensaio de genotipagem multiplex desenvolvido mostrou-se um teste molecular rápido, seguro e efetivo para a detecção dos genótipos HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45 em amostras de esfregaço cérvico-vaginal, sendo uma ferramenta útil para a elucidação dos genótipos de HPV correlacionados com as lesões de baixo a alto grau e câncer do colo uterino.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às pacientes que participaram desta iniciativa regional. O trabalho recebeu apoio logístico do Hospital Escola Álvaro Alvim e econômico do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (Nudim), interveniente do termo aditivo ao convênio nº 020 entre a Fundação Benedito Pereira Nunes e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Uenf), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - Faperj Processo APQ-1 E-26/110.386/2010. I EM-A é bolsista de produtividade 2 do CNPq na área de concentração em Genética Humana e consultor para o Hospital Escola Álvaro Alvim.

REFERÊNCIAS

1. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, 3rd, Durst M, et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *Embo J* 1987; 6: a3745-53.
2. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res* 2009; 130: 266-76.
3. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-8.
4. Girianelli VR, Thuler LC, and e Silva GA. [Prevalence of HPV infection among women covered by the family health program in the Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2010; 32: 39-46.
5. Ayres AR and Azevedo e Silva G. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica* 2010; 44: 963-74.
6. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
7. Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MG, Fernandes TA, Azevedo PR, Sobrinho JS, et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. *BMC Res Notes* 2010; 3: 96.
8. Dias D, Van Doren J, Schlotmann S, Kelly S, Puchalski D, Ruiz W, et al. Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 959-69.
9. Munoz 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.
10. Six L, Leodolter S, Sings HL, Barr E, Haupt R, and Joura EA. Prevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in young Austrian women - baseline data of a phase III vaccine trial. *Wien Klin Wochenschr* 2008; 120: 666-71.
11. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med* 2009; 360: 1385-94.
12. Fernandes JV, Meissner Rde V, de Carvalho MG, Fernandes TA, de Azevedo PR, and Villa LL. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 105: 21-4.
13. Chaudhary AK, Pandya S, Mehrotra R, Bharti AC, and Singh M. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Virol J* 2010; 7: 253.
14. Voss JS, Kipp BR, Champion MB, Sokolova IA, Henry MR, Halling KC, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, hybrid capture 2 and polymerase chain reaction for the detection of high-risk human papillomavirus in cervical cytology specimens. *Anal Quant Cytol Histol* 2009; 31: 208-16.
15. Secretaria Municipal de Saúde de Campos dos Goytacazes, Vacinação contra o HPV a partir de segunda-feira em Campos. 2010. Data de acesso: 10 de setembro de 2010. Campos dos Goytacazes. Disponível online: http://200.220.205.74/index.php?option=com_content&view=article&id=393:vacinacao-contra-o-hpv-a-partir-de-segunda-feira-em-campos-&catid=49:programas-especiais&Itemid=3.
16. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, and Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 504-12.
17. Yim JJ, Ding L, Schaffer AA, Park GY, Shim YS, and Holland SM. A microsatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene: functional implications and racial differences. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40: 163-9.
18. Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, and Depuydt C. Prevacination distribution of human papillomavirus types in women attending at cervical cancer screening in Belgium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 321-30.
19. Kovanda A, Juvan U, Sterbenc A, Kocjan BJ, Seme K, Jancar N, et al. Pre-vaccination distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) lesions in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2009; 18: 47-52.
20. Krambeck WM, Cadide RM, Dalmarco EM, and de Cordova CM. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2008; 35: 175-8.
21. Von Krogh G, Lacey CJ, Gross G, Barrasso R, and Schneider A. European guideline for the management of anogenital warts. *Int J STD AIDS* 2001; 12 Suppl 3: 40-7.
22. Caetano R and de Mello Caetano CM. Custo-efetividade no rastreamento do câncer cérvico-uterino no Brasil: Um Estudo Exploratório. 2005. Data de acesso: 20 de novembro de 2010. Disponível online: <http://www.inca.gov.br/inca/Arquivos/HPV/relatorio%20do%20estudo%20HPV.pdf>.
23. Bayas JM, Costas L, and Munoz A. Cervical cancer vaccination indications, efficacy, and side effects. *Gynecol Oncol* 2008; 110: S11-4.
24. Perez G, Lazcano-Ponce E, Hernandez-Avila M, Garcia PJ, Munoz N, Villa LL, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 virus-like-particle vaccine in Latin American women. *Int J Cancer* 2008; 122: 1311-8.