

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Microbiología**



**DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE “PAPILLOMAVIRUS  
HUMANO” GENITAL POR AMPLIFICACIÓN GENÓMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María del Carmen Felicidad Pérez Zarzalejo**

Bajo la dirección del doctor

Juan José Picazo de la Garza

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-1712-8**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE**  
***Papillomavirus humano* GENITAL POR**  
**AMPLIFICACIÓN GENÓMICA**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup>.CARMEN F. PÉREZ ZARZALEJO**

**Madrid 2001**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE *Papillomavirus*  
*humano* GENITAL POR AMPLIFICACIÓN GENÓMICA**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup>.CARMEN F. PÉREZ ZARZALEJO**

**Madrid 2001**

# ÍNDICE

# ÍNDICE

	Pag
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. HISTORIA Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA</b> .....	2
<b>1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS <i>Papillomavirus</i></b> ....	3
1.2.1. Estructura y organización del genoma viral.....	4
<b>1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS <i>Papillomavirus</i></b> .....	7
<b>1.4. MULTIPLICACIÓN VIRAL</b> .....	8
1.4.1. Ciclo viral.....	10
<b>1.5. INFECCIONES POR <i>Papillomavirus</i> EN EL TRACTO ANOGENITAL</b>	
1.5.1. Manifestaciones clínicas.....	11
1.5.2. Epidemiología.....	19
1.5.3. Diagnóstico de la infección por <i>Papillomavirus</i> .....	23
1.5.4. Tratamiento.....	29
<b>1.6. PROBLEMÁTICA ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO</b> .....	32
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>

<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. GRUPOS DE ESTUDIO Y MUESTRAS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2. TÉCNICAS EMPLEADAS</b> .....	<b>39</b>
3.2.1. Amplificación y tipificación de PVH con enzimas de restricción.	40
3.2.2. Amplificación y tipificación de PVH con sondas de hibridación.	53
<b>3.3. MÉTODO ESTADÍSTICO</b> .....	<b>61</b>
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
<b>4.1. PACIENTES VIH NEGATIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR <i>Papillomavirus</i></b> .....	<b>64</b>
<b>4.2. PACIENTES VIH POSITIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR <i>Papillomavirus</i></b> .....	<b>74</b>
<b>4.3. PACIENTES VIH NEGATIVOS SIN SOSPECHA NI RIESGO DE INFECCIÓN POR <i>Papillomavirus</i></b> .....	<b>83</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>90</b>
<b>5.1. PACIENTES VIH NEGATIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR <i>Papillomavirus</i></b> .....	<b>91</b>
<b>5.2. PACIENTES VIH POSITIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR <i>Papillomavirus</i></b> .....	<b>98</b>
<b>5.3. PACIENTES VIH NEGATIVOS SIN SOSPECHA NI RIESGO DE INFECCIÓN POR <i>Papillomavirus</i></b> .....	<b>101</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>106</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>110</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. HISTORIA Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA**

Durante muchos siglos se ha sospechado que la naturaleza de la infección de las verrugas de la piel era debida a virus.

- Ciuffo (1907) estableció la naturaleza viral de estas verrugas al demostrar su transmisión a través de filtrados acelulares<sup>1</sup>.
- En 1930 Richard Shope describió el primer *Papillomavirus*, reconociéndolo como el agente etiológico de la papilomatosis cutánea del conejo de cola de algodón, el CRPV (cottontail rabbitpapillomavirus). Este virus producía papilomas que progresaban a carcinomas en la mayoría de los casos<sup>2</sup>.

A partir de este estudio se establecieron los principios más importantes de los virus que producen tumores:

1. El virus "desaparece" (se hace latente) con la progresión de las lesiones a la malignidad<sup>3</sup>.
2. La exposición a ciertos agentes físicos y químicos (cofactores) aumenta el porcentaje de malignización<sup>4</sup>.
3. El ácido desoxirribonucleico (ADN) aislado de partículas virales purificadas es infeccioso<sup>5</sup>.

La morfología del virus se describió tan pronto se desarrolló el uso de la microscopía electrónica.

La caracterización del *Papillomavirus* fue lenta ya que estos virus no se pueden cultivar "in vitro" porque sólo se replican en queratinocitos diferenciados.

## **Introducción**

---

En los años 60 se pensó que sólo existía un tipo de *Papillomavirus* y que la naturaleza del epitelio infectado era responsable de las características morfológicas y del comportamiento de dicho virus <sup>6</sup>.

En los años 70 coincidiendo con el desarrollo de las técnicas de genética molecular se reconocieron un gran número de *Papillomavirus* humanos (PVH) y animales, identificándose en los años 80 aproximadamente 60 tipos diferentes, dependiendo de las características de la lesión con el genotipo infectante<sup>7, 8</sup>.

La infección del tracto genital por estos virus constituye actualmente una enfermedad de transmisión sexual (ETS) frecuente, lo que tiene una clara importancia si se considera la asociación que existe entre ciertos PVH y la aparición de carcinomas en el tracto genital femenino y masculino. Además algunos PVH genitales pueden infectar a los recién nacidos durante el parto provocando durante la infancia lesiones respiratorias sobre todo.

### **1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS *Papillomavirus***

Los PVH son virus de 55nm de diámetro con ADN bicatenario circular de 8000pb. El genoma del virus está envuelto por una cápside icosaédrica de 72 capsómeros y tiene determinantes antigénicos específicos de género en la proteína principal de la cápside<sup>9</sup>.

La estructura del virus está formada por el ensamblaje de dos tipos de proteínas: VP1 ó proteínas mayores y VP2 ó proteínas menores que le confieren gran parte de su resistencia y estructura característica.

### 1.2.1. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL

Gracias al análisis de los ácidos ribonucleicos (ARN<sub>s</sub>) codificados, se ha visto que sólo una de las hebras sirve como molde para la transcripción en sentido 5'→3'. Dentro de la hebra codificadora pueden distinguirse, atendiendo a su localización, secuencias de lecturas abiertas o secuencias no codificables.

Las secuencias de lectura abiertas u ORF (Open Reading Frames) constituyen el 90% del genoma viral, participando en la codificación de la síntesis de proteínas. Los PVH tienen siete tipos distintos de ORF subdivididos a su vez en dos tipos:

#### a) ORF DE LECTURA PRECOZ E (Early)

Consta de varias frecuencias, cada una especializada en una función<sup>10</sup> codificando las proteínas víricas que participan en la replicación, transcripción y transformación celular.

**E1.** Replicación extracromosómica (episomial) e interacción o fijación al ADN celular.

**E2.** Transactivadora de la transcripción viral. Coopera con las secuencias no codificables, tiene capacidad transinhibidora en los PVH 16/18 y represora de las secuencias E6 Y E7<sup>11</sup>.

**E4.** Interviene en la fase de maduración viral y coopera con la fracción E2.

## **Introducción**

---

**E6.** Actúa en la fijación al ADN celular, participando en la transformación e inmortalización de la misma. Se fija a la proteína celular p53 antioncogén, interaccionándola<sup>12</sup>. Por último coopera con la fracción E7.

**E7.** Induce la síntesis de ADN vírico, esta secuencia participa en la inmortalización y posible transformación celular. Interacciona con la proteína celular RB p105 con capacidad antioncogénica<sup>13</sup>. Así mismo, esta secuencia se fija a proteínas celulares, quinasas y oncogenes<sup>14</sup>.

Las funciones de interacción de las secuencias E6 y E7, responsables de la inmortalización y transformación celular, pueden influir en la transformación maligna<sup>15</sup>, pues son específicas de los PVH de alto riesgo oncogénico y no se observan en otros tipos.

### **b) ORF DE LECTURA TARDIA L (Late)**

Codifican las proteínas de la cápside en la fase final del ensamblaje viral que se produce sólo en queratinocitos diferenciados.

La secuencia descrita es:

**L1.** Produce la síntesis de la proteína mayor de la cápside con capacidad antigénica específica, participando en el trofismo celular<sup>16</sup>.

**L2.** Produce la síntesis de la proteína menor de la cápside.

## Introducción

---

Las secuencias no codificables o región reguladora LCR (Long Control Region) están localizadas entre L1 Y E6 y controlan la transcripción y replicación de las secuencias codificables, contienen áreas homólogas con genes receptores celulares a través de los que pueden intervenir en el tropismo y expresión viral<sup>16</sup>. En esta región se encuentra el origen de la replicación.

En la siguiente figura se puede ver la organización del genoma de los PVH.

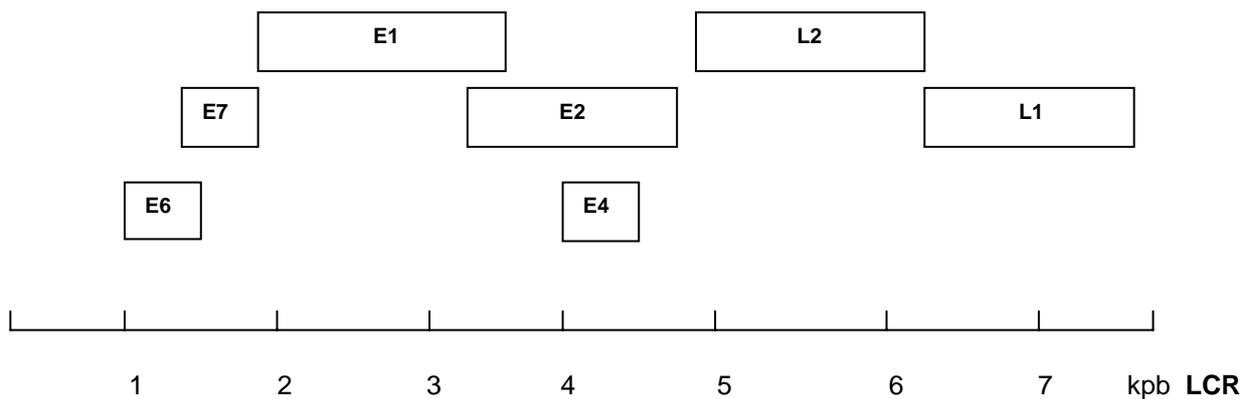


FIG.I. Organización del genoma de PVH

**E.** ORF de lectura precoz (Early)

**L.** ORF de lectura tardía (Late)

**LCR.** Región Reguladora

### **1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS *Papillomavirus***

Los PVH pertenecen a la familia *Papovaviridae*, incluidos en el género *Papillomavirus*. Son virus específicos de especie, que comparten un antígeno común de género y sus ADNs hibridan bajo condiciones de baja astringencia<sup>17</sup>. En contraste, en condiciones similares, no se produce hibridación cruzada con ADNs de la misma familia.

La clasificación de los PVH se basa en el rango de los huéspedes que infectan y en el grado de homología de sus moléculas de ADN (porcentaje de hibridación cruzada). Se subdividen en tipos y subtipos según el grado de homología, ya que no se diferencian serológicamente.

Se conocen aproximadamente 100 tipos de PVH diferentes hasta el momento entre virus cutáneos y mucosos<sup>18</sup>, de los cuales alrededor de 30 infectan la mucosa anal y genital.

La mayoría de los PVH están asociados con lesiones proliferativas del epitelio escamoso. Pueden ser cutáneos o mucosos y mucoso-cutáneos.

- PVH cutáneos, que producen lesiones epidérmicas como las verrugas vulgares o plantares y epidermioplasia verruciforme.
- PVH mucosos:
  - Genitales, relacionados con lesiones benignas y malignas del tracto genital.
  - Orales, aparecen sobre todo en la mucosa respiratoria y digestiva. También se localizan aquí algunos tipos encontrados en la mucosa genital.
- PVH mucoso-cutáneos, que presentan lesiones cutáneas y mucosas al mismo tiempo. Ej. Papilomas orales en pacientes con sida.

### **1.4. MULTIPLICACIÓN VIRAL**

El ADN de los PVH puede detectarse en células basales y parabasales del epitelio infectado<sup>19</sup>, sin embargo la expresión de los genes estructurales y el ensamblaje ocurre solo en queratinocitos altamente diferenciados<sup>20</sup>.

La multiplicación viral solo se produce en el núcleo celular, de modo que sólo cuando la membrana nuclear se rompe pueden verse los productos virales en el citoplasma.

#### **• REPLICACIÓN**

El ADN de los PVH puede aparecer en forma episómica o integrado en el genoma de la célula infectada, existiendo por tanto, dos tipos de replicación viral:

\_ PLASMIDICA: Tiene lugar en células de la porción epidérmica inferior, en las que el ADN viral episómico es amplificado de bajo a moderado número de copias (de 50 a 400 copias por célula. Fase de amplificación). Este número de copias permanece constante durante varias generaciones celulares (fase de mantenimiento).

\_ VEGETATIVA: Sólo se produce en células epiteliales diferenciadas, en las que normalmente no hay síntesis de ADN. Sin embargo y pese a no haber proliferación celular, la producción de genomas virales aumenta considerablemente sin que exista ningún tipo de regulación<sup>21</sup>.

## **Introducción**

---

### • TRANSCRIPCIÓN

La transcripción viral está estrechamente regulada en células infectadas. Es un proceso complejo caracterizado por:

- La presencia de numerosos promotores
- La existencia de numerosos y complejos modelos de maduración de ARN
- La producción diferencial de ARN<sub>m</sub> según el tipo de célula.

### • TRANSFORMACIÓN

Hay algunos PVH que tienen la propiedad de provocar transformaciones morfológicas, estos son los asociados con lesiones malignas (PVH 16 y 18), en general los PVH benignos (PVH 6 y 11) no las provocan<sup>22</sup>.

La actividad transformante se ha localizado en un fragmento que representa el 69% del genoma, siendo las regiones E6 y E7 ORF<sub>s</sub> principalmente<sup>23</sup>.

La célula transformada contiene muchas copias del genoma viral, que permanece en forma extracromosómica. Es necesario, para el mantenimiento de este estado, la expresión continúa del ADN viral<sup>24</sup>, sin embargo no es necesaria la integración del genoma viral para iniciar o mantener la transformación<sup>25</sup>.

Los queratinocitos humanos infectados por PVH 16 y 18 llegan a ser inmortales y su genoma viral pasa a estado de integración<sup>26</sup>. En un ensayo cuantitativo de transformación de queratinocitos humanos por ADN de PVH, se observó que tanto los tipos oncogénicos como los no oncogénicos inducen proliferación celular, pero sólo los primeros ocasionan líneas celulares inmortales<sup>27</sup>.

### **1.4.1. CICLO VIRAL**

La infección se inicia cuando el virus entra en células de la epidermis como consecuencia de algún trauma producido en el epitelio. El virus entra por endocitosis y es transportado al núcleo, donde se produce la transcripción de los genes tempranos, probablemente se replica en bajo número de copias y permanece como un plásmido extracromosómico. Los productos virales de la transcripción de los genes tempranos estimulan el crecimiento de las células basales. Estas células terminan dividiéndose y diferenciándose en queratinocitos. En éstos se produce la replicación vegetativa seguida de la expresión de los genes tardíos y la formación de las partículas virales<sup>21</sup>.

La infección por PVH de las células basales podría ser considerada como una forma de infección latente durante la fase primaria en la que las células contienen el genoma viral, pero no son producidas las proteínas virales. La diferenciación de las células basales permite la inducción de la replicación vegetativa viral.

El PVH puede permanecer latente sin estimular la diferenciación celular y sin presentar signos clínicos de lesión. La formación de la lesión es inducida por inmunosupresión u otros estímulos y el periodo de incubación desde que se produce la infección latente hasta que se produce la lesión es de aproximadamente 3 meses. La señal para que se produzca la fase productiva por PVH desde la infección latente parece ser la diferenciación de las células del huésped. La limitación de la expresión de los genes virales durante el estado de latencia probablemente contribuye a la no detección de células infectadas por parte del sistema inmune del huésped.

## 1.5. INFECCIONES PRODUCIDAS POR *Papillomavirus* EN EL TRACTO ANOGENITAL

Las infecciones anogenitales por PVH pueden ser divididas en dos grupos: infecciones de bajo riesgo (causadas por PVH 6 y 11), normalmente encontradas en condilomas acuminados y en lesiones intraepiteliales de bajo grado que no suelen progresar a la malignidad y en intermedias e infecciones de alto riesgo (causadas por PVH 16, 18, 31 y 33) que permiten el crecimiento invasivo y la metástasis.

### 1.5.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Cuando el PVH entra en las células epiteliales se pueden dar tres tipos de infección:

- **Infección clínica** con signos claros de lesión como el condiloma acuminado.
- **Infección subclínica**, en la que no existen signos visibles de infección y donde la lesión puede visualizarse tras la aplicación de ácido acético al 30 %.
- **Infección latente**, en la que el virus se encuentra en estado de latencia sin provocar lesiones. Se puede demostrar la existencia de PVH por métodos de biología molecular.

## **Introducción**

---

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de los PVH son los condilomas o verrugas genitales y la neoplasia cervical intraepitelial (CIN) y el cáncer de cérvix.

### **a) CONDILOMAS O VERRUGAS ANOGENITALES**

Se ha demostrado que las verrugas genitales o condilomas acuminados (CA) son ETS, aunque hay estudios que reconocen la existencia de alguna otra vía de transmisión<sup>28</sup>.

La promiscuidad sexual es el factor de riesgo más importante de la infección genital por PVH<sup>29</sup>. El riesgo de la infección varía con la edad, siendo de 16 a 25 años el grupo de mayor riesgo.

En los años 70, se reconoció el CA como la manifestación más común de la infección por PVH en el tracto genital femenino. El PVH 6 y 11 son los tipos asociados con estas lesiones benignas donde la rara conversión maligna ha sido sólo documentada en pacientes inmunodeprimidos.

Habitualmente el CA aparece como una masa carnosa, sonrosada y vegetante en forma de cresta de superficie irregular y fisurada. Se localiza en zonas húmedas del tracto genital femenino como cérvix, vagina, vulva y región perianal. En hombres las lesiones se encuentran en pene, escroto y región perianal<sup>30,31</sup>. En el individuo infectado, suelen encontrarse a menudo en más de un lugar del tracto anogenital<sup>32</sup>.

## **Introducción**

---

Muchos condilomas desaparecen espontáneamente, probablemente por inmunidad celular, o responden al tratamiento. Suelen aumentar en número y en tamaño durante el embarazo y desaparecer después del parto<sup>33,34</sup>. Los pacientes inmunodeprimidos tienen una alta prevalencia de padecer condilomas<sup>35</sup>.

Las infecciones clínicas que representan sólo el pico de un iceberg (2%-3% de todas las infecciones por PVH) poseen la capacidad para desarrollarse en tres direcciones: regresión, persistencia o progresión<sup>36</sup>.

### **b) NEOPLASIA CERVICAL INTRAEPITELIAL Y CÁNCER DE CÉRVIX**

Después de la infección por PVH pueden ocurrir cambios displásicos. La displasia implica una anomalía en el desarrollo y el crecimiento celular y es sinónimo de alteraciones premalignas.

La frecuente asociación de signos morfológicos de infección y los rasgos de displasia cervical sugieren la importancia del PVH en la carcinogénesis del cérvix, que ha sido bien estudiada. Tipos de PVH 16 y 18 fueron encontrados asociados con el cáncer invasivo cervical al principio de los años 80. También se pueden producir estas lesiones premalignas en los mismos lugares descritos para los condilomas.

La alta prevalencia de infecciones genitales por PVH transmitidas sexualmente y el principal papel desempeñado por alguno de estos virus en el desarrollo del carcinoma cervical, hacen que sea el segundo cáncer más común en mujeres de todo el mundo, lo que explica el enorme interés actual en estos virus.

## **Introducción**

---

Las lesiones premalignas de cérvix se denominan neoplasia intraepitelial cervical (CIN) cuya graduación varía entre I y III, dependiendo del espesor del epitelio que es reemplazado por células displásicas. **CIN I**, displasia media, **CIN II**, displasia moderada, y **CIN III**, displasia severa y carcinoma "in situ". El intervalo de tiempo entre CIN I y el cáncer invasivo puede ser de varias décadas.

Si la infección por PVH se asocia a alteraciones premalignas, es lógica la asociación entre PVH y carcinomas. Numerosos estudios han demostrado la presencia de ADN de PVH en células de cáncer de cérvix. El CIN III en el que se incluye el carcinoma "in situ" precede al cáncer invasivo.

Los PVH 6 y 11 son encontrados en las formas más leves de CIN, mientras que los tipos oncogénicos PVH 16 y 18 se encuentran en todos los grados y en la enfermedad maligna<sup>18</sup>.

El PVH 16 es el virus más encontrado en CIN y en enfermedades malignas. Ha sido encontrado en el 70% de los casos de CIN III en Alemania<sup>37</sup> y en Reino Unido ha sido aislado en el 80% de los casos de cáncer invasivo de cérvix<sup>38</sup>.

En CIN asociadas con PVH 6 y 11, el genoma viral se encuentra en forma extracromosómica y es transcripcionalmente activo, sin embargo en las células malignas que contienen PVH 16, 18 y 33 el ADN viral está integrado en el genoma celular, y parece ser uno de los requisitos para la progresión a la malignidad<sup>39</sup>.

Por tanto, la integración del ADN viral en los tumores malignos contrasta con el estado del ADN viral en las lesiones premalignas, donde el ADN viral es predominantemente extracromosómico en un estado plasmídico<sup>40</sup>.

## **Introducción**

---

Parece estar claro que ciertos tipos de PVH tienen un papel importante en la etiología del cáncer cervical, aunque hay otros factores implicados que junto con el virus producen la enfermedad invasiva, puesto que no todos los infectados que exhibieron lesiones premalignas llegaron a desarrollar cáncer. Se estima que más del 25% de mujeres con CIN I progresa a CIN III.

Aunque la importancia de los factores exógenos en el desarrollo del cáncer anogenital ha sido subestimada en los últimos años<sup>41</sup> parece que los factores adicionales juegan un papel importante en la carcinogénesis anogenital.

Durante más de dos años la importancia de las infecciones por el virus del *herpes simplex* (VHS) en el cáncer anogenital ha sido discutida<sup>42</sup>, pues aunque este virus induce mutaciones en el ADN de la célula hospedadora<sup>43,44</sup>, sólo algunos experimentos demuestran su papel en el cáncer anogenital, y además es posible que la amplificación del ADN episómico del PVH como consecuencia de la infección por VHS<sup>45</sup>, sea importante en el papel co-carcinogénico del VHS.

En los diez últimos años emergió la importancia del tabaco en la etiología del cáncer de cérvix<sup>46</sup>. La nicotina parece ser que se concentra en los fluidos vaginales<sup>47</sup> y puede ser convertida en nitrosaminas carcinogénicas ante la presencia de infecciones bacterianas específicas. Las infecciones crónicas pueden contribuir a la generación de componentes carcinogénicos cuyo metabolismo puede producir metabolitos mutagénicos.

## **Introducción**

---

Un tercer grupo de componentes implicados en la carcinogénesis cervical son los anticonceptivos y las hormonas<sup>46</sup>. Las usuarias de anticonceptivos parecen tener un mayor riesgo para desarrollar cáncer de cérvix. Es probable que la progesterona permita el aumento de la producción viral y mejore la proliferación de las células que contienen ADN viral<sup>48</sup>. Estas observaciones además relacionan la alta proporción y presencia de PVH en mujeres embarazadas<sup>34</sup>.

Es posible que diferencias en higiene, ante la presencia de otras infecciones que permiten la producción de metabolitos carcinogénicos y la exposición a hormonas específicas, puedan en parte reflejar las diferencias geográficas de la incidencia del cáncer anogenital en todo el mundo.

El riesgo de infección por PVH aumenta en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en individuos inmunodeprimidos, comparándolos con controles negativos<sup>49,50</sup>.

Además el cáncer de cérvix nunca se ha observado en mujeres vírgenes y es más frecuente en mujeres con varias parejas sexuales. Mujeres monógamas con parejas sexuales promiscuas tienen un mayor riesgo de padecer cáncer cervical que las mujeres monógamas cuya pareja sexual no es promiscua<sup>51</sup>. Por ello es importante determinar la posible infección por PVH en el hombre ya que puede transmitirlo a su pareja(s) sexual(es) y convertirse en portadores subclínicos de PVH pudiendo dar lugar al desarrollo del cáncer cervical.

## **Introducción**

---

Los PVH pueden persistir en el epitelio escamoso sin producir lesiones reconocibles a simple vista: infección subclínica, o sin producir lesiones: infección asintomática.

No todas las células en el epitelio basal tienen la misma capacidad para dividirse, por lo que el ADN viral debe permanecer en estado latente en las células basales: infección asintomática, cuando las células posteriormente llegan a dividirse, activan la replicación viral y se produce la lesión.

Se ha observado durante algún tiempo que el ADN de PVH puede detectarse en células cervicales de mujeres que presentan un cérvix normal. El porcentaje de positividad varía dependiendo del método usado para detectar el ADN, la edad y el lugar de donde procede el grupo estudiado.

La técnica más sensible, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha detectado niveles de un 80% de positividad<sup>52,53</sup> para PVH 16, en mujeres con un cérvix normal.

En estudios de mujeres jóvenes entre 18 y 25 años de edad en más de un 46% se ha detectado ADN de PVH por PCR en células epiteliales de cérvix normal. Los tipos de PVH 16 y 18, los cuales son comunmente encontrados en enfermedades malignas, se relacionan con un tercio de los virus detectados. En consecuencia, mujeres jóvenes pueden estar infectadas con tipos de PVH que causan enfermedades malignas y está claro que sólo un pequeño número de todas ellas desarrollan la enfermedad<sup>16</sup>.

## **Introducción**

---

Kiviat et al<sup>54</sup> determinaron que mujeres en edad colegial y mujeres atendidas en una clínica de ETS de la misma ciudad, tenían un porcentaje de prevalencia de ADN de PVH similar, a pesar de que las mujeres de la clínica presentaban un alto riesgo de padecer ETS.

En estudios realizados en Europa, el PVH fue identificado con menos frecuencia en Groenlandia, un país con una alta incidencia de cáncer cervical, que en Dinamarca, un área de baja incidencia<sup>55</sup>. Aunque en todos ellos, una significativa proporción de mujeres, que presentaban ADN de PVH tenía una citología normal y no presentaban lesiones visibles.

Koutsky et al<sup>56</sup> en los Estados Unidos han estimado que las infecciones por PVH del tracto genital son prevalentes en aproximadamente un 10% (12 millones) de hombres y mujeres entre 15 y 49 años de edad y que una gran mayoría de estas infecciones son subclínicas.

Transcurridos 20 - 25 años, periodo de latencia entre la infección primaria y el desarrollo del cáncer cervical, células infectadas por PVH en estado de latencia pueden experimentar una conversión oncogénica maligna. Esto puede ser calculado por el pico de incidencia de lesiones preneoplásicas que afectan a mujeres entre 25-35 años de edad en el oeste de Europa y América, y la edad de distribución de pacientes con cáncer cervical entre los 40 - 65 años.

### 1.5.2. EPIDEMIOLOGÍA

En los países con control sanitario adecuado se confirma el aumento de las infecciones por PVH, representando una de las ETS más frecuente entre jóvenes de ambos sexos y adultos en edad fértil<sup>57,58</sup>.

- **EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR PVH**

Los estudios epidemiológicos de esta enfermedad son de difícil interpretación ya que la terminología usada es muy variada y por la introducción de cuadros subclínicos y latentes antes desconocidos. A esto debe añadirse el gran número de métodos de detección y la forma de trabajar con poblaciones seleccionadas o no. Como resultado, existe una gran diferencia en los datos de citólogos y anatomopatólogos respecto a clínicos y epidemiólogos .

La incidencia de la infección por PVH ha aumentado en el último decenio. Según los estudios citológicos, oscila entre 5-17 casos por cada 1000 habitantes<sup>59,60</sup>. Algunos autores piensan que dicha incidencia está próxima al 2% de todas las mujeres en edad fértil, sin embargo, los resultados epidemiológicos de los países con relativa organización sanitaria demuestran claramente que las lesiones aumentan continuamente así:

- a) En USA, Richart et al<sup>61</sup> demostraron que las lesiones condilomatosas producidas por PVH, se encontraban en el 1,3% de las mujeres norteamericanas sometidas a un "screening" de carcinoma cervical, siendo esta incidencia del 25% entre los 15 y 29 años de edad y aún mayor en la jóvenes sexualmente activas.

## **Introducción**

---

- b) En el Reino Unido, uno de los países con mayor control de ETS, se duplicaron en menos de 8 años <sup>62,63,64</sup>.
- c) En Francia, el porcentaje de infección por PVH, en mujeres de 18 a 25 años de edad, pasó de 0.75% a 2.8% en un periodo de seis años y un determinado grupo de mujeres entre 20-35 años de edad, alcanzó el 6%<sup>65</sup>.
- d) En Finlandia, Sÿrjanen et al<sup>66</sup> realizaron un seguimiento con mujeres de 22 años. La frecuencia de infecciones por PVH aumentó en un año de 2.7% a 7.2%.  
Las técnicas de hibridación añaden cifras de latencia del virus en el 66% de los negros surafricanos, el 10% de las mujeres entre 15 y 50 años y el 5.8% de los frotis citológicos de glande y surco balanoprepucial de varones sanos<sup>67</sup>.

En España también se observa un aumento en la incidencia de la infección:

En Barcelona esta incidencia en un periodo de tres años pasó de 0.6% al 3% de todas las mujeres examinadas<sup>68</sup>.

En Madrid, el centro de ETS del Hospital Universitario San Carlos ha pasado del 4% del diagnóstico positivo de condiloma al 12.5% en un periodo de cinco años<sup>67</sup>.

En Oviedo, Sevilla y Granada se siguen las mismas variaciones que en el resto, cuadruplicándose aproximadamente el número de casos<sup>67</sup>.

### • EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICAL

En todo el mundo, aproximadamente 500.000 nuevos casos de cáncer invasivo de cérvix son diagnosticados anualmente<sup>47</sup> en países en vías de desarrollo. El cáncer de cérvix es la malignidad femenina más frecuente y es el responsable de aproximadamente el 24% de todos los cánceres en mujeres. En países desarrollados, se posiciona detrás de cánceres de mama, pulmón, útero y ovarios y se relaciona con el 7% de todos los cánceres femeninos. En los Estados Unidos, se producen cerca de 5000 muertes anualmente de cáncer cervical.

Se han señalado como factores importantes de riesgo el número de parejas sexuales y la edad de comienzo de la primera relación sexual. Se pone de manifiesto que el carcinoma de cérvix se comporta, desde el punto de vista epidemiológico, como una auténtica ETS, lo que sugiere la existencia de un factor etiológico.

Por otra parte, el embarazo es considerado un periodo de inmunosupresión transitoria y se observa un importante aumento del riesgo para el cáncer cervical. Schneider et al<sup>34</sup> realizaron un estudio con 92 embarazadas y 96 mujeres control con citología normal, observando que la presencia de PVH (la mayoría tipo 16) fue más alta en el grupo de embarazadas. En conclusión, pacientes bajo inmunosupresión deben tener un mayor riesgo de padecer cáncer cervical, quizás mediado por un aumento en la probabilidad de infección por PVH.

## **Introducción**

---

Un adecuado control sanitario nos ha permitido constatar que:

- a) En EE.UU. el cáncer de células escamosas del cérvix llega a ser el 7% de la patología oncológica femenina (17.6/100.000 habitantes).
- b) En el Reino Unido es el 8% de las lesiones precancerosas, estimándose que, en mujeres con edad entre 20 y 50 años, se incrementa la cifra en unos 20.000 casos nuevos de CIN y 4.000 nuevos casos de cáncer invasivo al año.
- c) En Noruega el trabajo de Singer et al<sup>69</sup> nos demuestra la elevación de los casos de cáncer de cérvix, así:
  - Las jóvenes de 20-24 años de edad pasaron de tasas de 0.33% a 3.55% en aproximadamente veinte años.
  - Entre 25-29 años de edad del 4.78% al 13.66% en el mismo periodo.
  - Mujeres de 30-34 años de edad desde el 20.97% al 28.12% en el mismo periodo.
- d) En Francia se alcanzan tasas de 43.5/100.000 habitantes<sup>67</sup>.

En España se ha confirmado que el 33.3% de los CA diagnosticados están en el cuello del útero y producen el 7.5% de las neoplasias cervicales, frente al 1.1% de la población general. El 56.3% son CIN I y CIN II y el 30% CIN III<sup>67</sup>.

### 1.5.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *Papillomavirus*

La ausencia de líneas celulares que permitan el crecimiento de los PVH y la presencia de un antígeno común determinan que los métodos tradicionales de diagnóstico virológico, como son el aislamiento y la detección de anticuerpos, no sean útiles en el diagnóstico de estas infecciones.

Durante mucho tiempo se han "diagnosticado" las lesiones exclusivamente por la clínica, pero hay que tener en cuenta que existen casos en los que la infección es asintomática.

Son técnicas clásicas para el diagnóstico de PVH:

- a) La citología con tinción de Papanicolau es la técnica más empleada ante la sospecha de infecciones cervicales por PVH.
- b) La colposcopia se realiza una vez que se ha detectado alguna alteración citológica compatible con infección vírica y/o displasia.

Previamente se aplica una solución al 3-5% de ácido acético en las lesiones. Dicha solución tiene la propiedad de producir un blanqueamiento especial en las áreas que estando infectadas con PVH no muestran lesiones clínicas evidentes. El blanqueamiento se produce porque la queratina de los queratinocitos infectados por PVH es diferente a la de los no infectados y reacciona con el ácido acético dando el color blanquecino característico. La colposcopia por lo tanto permite el diagnóstico de las infecciones subclínicas, y ofrece como ventaja la observación de una mayor superficie del epitelio y la obtención dirigida de la biopsia.

## ***Introducción***

---

- c) La biopsia se realiza para confirmar el diagnóstico anatomopatológico, sobre todo en lesiones sugestivas de CIN.
- d) Métodos inmunohistológicos. Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico se basaba en técnicas citológicas e histológicas combinadas con métodos inmunoquímicos, que utilizaban anticuerpos policlonales dirigidos frente al antígeno común unido a distintos marcadores. El diagnóstico histológico está perfectamente definido en las lesiones típicas pero no en las subclínicas y latentes. Estas técnicas presentan una baja sensibilidad y especificidad, por lo que el diagnóstico es sólo sugestivo y nunca definitivo de infección, no determinándose por tanto, el PVH implicado.
- e) Microscopía electrónica. Es un método específico, con una sensibilidad del 10-50% para la detección de PVH en condilomas acuminados, planos y displasias, aunque poco útil para el diagnóstico rutinario<sup>70</sup>.

La mayoría de las infecciones producidas por PVH son asintomáticas, ya que la descripción clásica de formaciones vegetantes características de las lesiones acuminadas se están presentando cada vez con menos frecuencia, apareciendo lesiones subclínicas, atípicas e inaparentes que pueden pasar desapercibidas si no se piensa en ellas. El estudio y diagnóstico de estas formas es de gran importancia por su posible asociación con tipos de PVH que están en relación con cáncer cervicouterino. Ante esta necesidad surge la aparición de las técnicas de biología molecular.

## **Introducción**

---

Estas técnicas son altamente sensibles y específicas, permiten detectar la mayoría de las infecciones y son el único método para identificar los distintos tipos de PVH.

Son métodos de detección de ácidos nucleicos:

- a) SOUTHERN BLOT. Esta técnica consiste en digerir con una enzima de restricción el ADN celular, a continuación se separan los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa. Tras un paso de desnaturalización, dichos fragmentos son transferidos a un filtro de nylon o nitrocelulosa donde se produce una hibridación con una sonda conocida y marcada. Esta técnica tiene una alta sensibilidad (detecta a partir de 5 copias por célula) y permite conocer el estado del genoma viral, aunque tiene la desventaja de ser larga y laboriosa.
- b) DOT BLOT. El ADN se fija sin fragmentar al filtro, por lo que es mucho más simple que el método anterior, aunque no permite conocer el estado del genoma viral. Este método tiene una variante en la cual, las células infectadas se fijan sobre el filtro, sin extraer el ADN, pasando a la hibridación después de desnaturalizar el ADN. Sin embargo, su sensibilidad no excede de las 50 copias por célula y tiene las desventajas de favorecer hibridaciones inespecíficas y de tener un alto "ruido de fondo".
- c) HIBRIDACIÓN "IN SITU". Se realiza sobre secciones tisulares, lo que permite la localización exacta del genoma viral. Consiste en la hibridación con sondas marcadas específicamente. Detecta entre 20 y 50 copias por célula pero tiene el inconveniente de que con frecuencia se producen hibridaciones inespecíficas, aunque tiene la ventaja de permitir la identificación y localización de la célula

## **Introducción**

---

infectada en el tejido. Esta técnica suele informar de PVH de alto, medio o bajo riesgo oncogénico, aunque no define exactamente el tipo de PVH.

d) REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA. La PCR, originalmente introducida por Saiki et al (1985)<sup>71</sup> y posteriormente automatizada por Mullis y Faloona (1987)<sup>72</sup>, ha emergido como una poderosa herramienta en la genética molecular para la amplificación exponencial "in vitro" de secuencias específicas de interés procedentes de cantidades minuciosas de ADN. La PCR se ha establecido rápidamente como una técnica estándar en laboratorios que llevan a cabo el diagnóstico de PVH. Los experimentos de detección de genes demuestran la extrema sensibilidad de la PCR, amplificando genes específicos de células o virus latentes en una proporción menor de 1 en 10.000 células.

Sin embargo, el mayor problema de la detección por PCR es que aunque la especificidad de las condiciones puede ser establecida (iniciadores, temperatura de unión), la sensibilidad es tan alta que hay un riesgo de obtener resultados que sean falsos-positivos debido a amplificaciones inespecíficas<sup>73</sup>.

Durante los últimos años, la PCR ha sido muy utilizada para analizar la frecuencia de las infecciones por PVH en diferentes poblaciones<sup>74,75,76,77</sup>. Además, varias publicaciones descubren la alta sensibilidad de la PCR utilizando iniciadores "consenso" o "generales" para amplificar PVH que anteriormente no habían sido identificados<sup>78,79,80,77</sup>.

En el diagnóstico de PVH, la amplificación se puede llevar a cabo sobre diferentes tipos de muestras, previamente preparadas, como exudados, raspados, biopsias o tejidos incluidos en parafina<sup>81,82</sup>.

## **Introducción**

---

La PCR puede utilizarse para verificar el diagnóstico de la infección por métodos citológicos e histológicos, identificar infecciones subclínicas y latentes o determinar el tipo de PVH implicado en la infección.

La técnica consiste en la amplificación de secuencias específicas, secuencias conocidas, del ácido nucleico que pueden encontrarse en poca cantidad mediante sucesivos ciclos gracias a una enzima polimerasa termoestable (Taq polimerasa aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*).

La reacción tiene tres etapas:

1. **Desnaturalización** de las dos hebras de ADN diana. El ADN es de doble cadena constituida por pares de bases de nucleótidos. Ambas cadenas se mantienen unidas por puentes establecidos entre las bases complementarias. Para efectuar el proceso de amplificación, ambas cadenas deben separarse para que sobre cada una de ellas vaya formándose la nueva cadena de ADN al ir yuxtaponiéndose los nucleótidos complementarios. La separación de las cadenas ocurre al someterse el ADN a temperaturas superiores a 90.°C
2. **Apareamiento**. Es necesario que exista una secuencia de iniciación a partir de la cual la enzima pueda continuar la síntesis en la dirección 5'→3'. Esta secuencia debe ser de nucleótidos, corta y complementaria de la región del genoma que queremos amplificar (secuencia conocida), se denomina iniciador, "primer" o cebador, y puede sintetizarse en el laboratorio. El apareamiento se lleva a cabo a unas temperaturas entre 40-60°C dependiendo de la longitud y de las bases de los iniciadores.

3. **Extensión.** Los iniciadores sirven como bloques para comenzar la producción de la hebra complementaria del ADN. Los elementos necesarios para dicha extensión son: iones  $Mg^{+2}$  que normalmente van incluidos en el tampón de la reacción, oligonucleótidos iniciadores, deoxinucleótidos de las cuatro bases (dGTP, dATP, dTTP y dCTT) y la enzima necesaria Taq-polimerasa que es termorresistente y no se desnaturaliza durante la reacción. La temperatura adecuada para la extensión suele ser de 72°C.

Así al final del primer ciclo de PCR hay dos nuevas dobles hebras de ADN idénticas a la original, como por cada ciclo de amplificación el ácido nucleico aumenta de manera exponencial, después de varios ciclos puede haber millones de copias de ADN.

Después de la amplificación el producto obtenido se visualiza en geles de agarosa o poliacrilamida por electroforesis. El hallazgo de una banda teñida con bromuro de etidio que corresponde al tamaño en pares de bases de los amplificadas esperados, sugiere que estos han sido obtenidos. No obstante, como se comentó con anterioridad, pueden producirse amplificaciones inespecíficas que deben confirmarse hibridando con una sonda para la región amplificada o utilizando enzimas de restricción<sup>83</sup>.

Cuando se procesan las muestras debe seguirse un método cuidadoso para impedir la contaminación. Todos los reactivos y material deben estar estériles, disponibles y limpios, siendo preciso la utilización de una campana de flujo laminar para su procesamiento<sup>84</sup>. Además es importante introducir controles negativos para comprobar las posibles contaminaciones.

## **Introducción**

---

Una limitación de la PCR es que deben usarse pocas células, no más de  $10^4$ , ya que la acumulación de desechos celulares podría inhibir la reacción. Además, células en fluidos biológicos, sangre o células resistentes a la lisis, espermatozoides... requieren manipulaciones de purificación adicionales<sup>85</sup>.

### 1.5.4 TRATAMIENTO

Las verrugas suelen desaparecer espontáneamente, sin embargo las lesiones intraepiteliales, especialmente en el cérvix, pueden conducir a enfermedades malignas, el tratamiento por lo tanto para eliminar la lesión es importante.

Hay descritos varios tratamientos:

- a) **PODOFILINA.** La podofilina es una mezcla de resinas obtenida de raíces de *Podophylum* y es un irritante de las superficies cutánea y mucosa. Es un agente antimitótico por lo que debería ser usado con cuidado. La podofilina se administra en la superficie de la verruga y tiene un efecto limitado. Se requieren varias administraciones y puede conducir a fibrosis de las áreas tratadas.
- b) **CRIOTERAPIA.** Nitrógeno líquido ( $-190^{\circ}\text{C}$ ) o hielo seco ( $\text{CO}_2$  sólido,  $-78.5^{\circ}\text{C}$ ) es aplicado en las verrugas para producir una destrucción local de la lesión. Hay que tener cuidado de limitar la aplicación a la lesión y no a áreas colindantes, ya que se podría causar dolor y ampollas en zonas sanas.
- c) **ELECTRODIATERMIA.** Es usado en el tratamiento de las lesiones mucosas (cérvix), destruyendo el tejido enfermo por calor.

## **Introducción**

---

- d) **EVAPORACIÓN POR LASER.** El láser de dióxido de carbono es una innovación para el tratamiento y ha sido usado tanto en lesiones de las superficies mucosas (cérnix y pared vaginal) como lesiones cutáneas. El tratamiento con láser mejora las técnicas convencionales en un 85-90%, aunque la dificultad que tiene es determinar la profundidad a la cual hay que vaporizar para eliminar el tejido lesionado.
- e) **CIRUGÍA.** El raspado de las verrugas comunes no es un tratamiento frecuente ya que no todas las verrugas son apropiadas para ser extirpadas quirúrgicamente. Además, si todo el tejido anormal no es eliminado, pequeñas islas pueden recurrir alrededor del lugar de la lesión inicial.
- f) **INTERFERÓN.** El interferón ha sido usado para tratar verrugas laringeas recurrentes y CIN<sup>86</sup>. Primero se reducía el tumor con cirugía o con láser de dióxido de carbono y después se administraba interferón durante largos periodos de tiempo para prevenir nuevas lesiones, con el grave inconveniente de los efectos secundarios que, en muchas ocasiones provocaban el abandono del tratamiento. Lesiones de CIN han sido tratadas con interferón, dando resultados variables.

Existen además otros tratamientos como el uso de agentes citotóxicos para destruir el tejido afectado, ácido tricloroacético (agente químico destructivo), podofilox (podophylotoxina), 5-fluorouracilo que inhibe el crecimiento celular ya que interfiere la síntesis de ADN y ARN...

Se están desarrollando nuevas terapias para mejorar la liberación de los agentes terapéuticos en las lesiones genitales y estimular el sistema inmune para combatir el virus: 5- fluorouracilo/epinefrina (la epinefrina es un vasoconstrictor que retiene el 5-

## ***Introducción***

---

fluorouracilo en el lugar de la lesión), imiquimod que es un modificador de la respuesta inmune (es un potente inductor del interferón  $\alpha$ ).

Tal vez lo más efectivo para mejorar la infección por PVH debería de ser una vacuna que pueda prevenir la incidencia de las verrugas genitales en población de alto riesgo. Actualmente esta vacuna es objeto de investigación<sup>86</sup>.

### **1.6. PROBLEMATICA ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Es de especial importancia desde el punto de vista epidemiológico el modo de transmisión del PVH por contacto sexual y la alta prevalencia de infecciones genitales por dichos virus, que además confieren un riesgo potencial para desarrollar lesiones precancerosas genitales para las parejas sexuales del individuo afectado, lo que explica el enorme interés por el estudio de PVH en la actualidad.

Recientemente el ADN de PVH ha sido detectado por diferentes técnicas de biología molecular (hibridación y PCR) en el epitelio escamoso **normal** del tracto genital de ambos sexos, sugiriendo que estos lugares pueden actuar como reservorio para infecciones latentes.

Es importante por lo tanto, diagnosticar infecciones subclínicas y latentes y determinar si el tipo de PVH implicado es de alto o bajo riesgo para desarrollar lesiones precancerosas<sup>78</sup>, ya que es posible que infecciones por PVH de alto riesgo oncogénico pasen desapercibidas con la consecuente progresión hacia la malignidad.

Además los pacientes inmunodeprimidos también tienen una alta prevalencia de padecer infección por PVH. Se ha observado que durante el embarazo se produce un aumento en la probabilidad de infección por PVH, ya que este espacio de tiempo puede ser considerado como una fase de inmunosupresión.

A pesar de la importancia del PVH en la carcinogénesis genital, sería deseable establecer una temprana detección de lesiones precancerosas cervicales para poder instaurar el tratamiento. El uso de varios procedimientos diagnósticos para la detección del PVH puede aumentar la sensibilidad del primario y secundario

## ***Introducción***

---

“screening” del cáncer cervical. Además, la detección y posterior tipificación del PVH podrían mejorar la especificidad de estos programas. Para ello, creemos que la PCR es un buen método de detección de PVH por su alta sensibilidad y rapidez, en unas horas podemos tener millones de copias de ADN viral para su posterior estudio, y por ello además es capaz de detectar infecciones con una baja carga viral<sup>87</sup>.

En la prevención del cáncer cervical en todo el mundo, sería interesante establecer programas de protección de masas en los países con alto riesgo, que introducen tecnologías de ADN (test de hibridación) o procedimientos de amplificación (PCR) para proteger a la extensa población de infecciones subclínicas y latentes<sup>88</sup>.

También sería de gran importancia establecer rápidamente los factores de riesgo predisponentes para las manifestaciones clínicas de la lesión por PVH. Aunque alguno de estos factores está bien establecido por ahora (grado de la lesión, tipo de PVH....). Existen factores adicionales que están implicados en la regulación del ciclo viral dentro de la célula, los cuales, pueden ser usados para mejorar la predicción de las infecciones genitales por PVH en el futuro.

## **II. OBJETIVOS**

## Objetivos

---

Como hemos visto anteriormente, algunos PVH pueden estar relacionados con lesiones malignas, diferentes neoplasias y cáncer, que afectan al tracto genital. Por ello es necesario diagnosticar lo más precozmente posible la infección por este virus y distinguir si son PVH de alto o de bajo riesgo oncogénico.

Debido a esto, nos planteamos fundamentalmente los siguientes objetivos:

- Poner a punto un protocolo para la detección y tipado de PVH empleando PCR e hibridación con sondas tipoespecíficas en exudados y en biopsias y compararlo con un método comercializado: amplificación y tipado con enzimas de restricción
  
- Determinar la incidencia de infección y definir el tipo de PVH predominante en tres grupos de estudio:
  1. Pacientes sospechosos o con riesgo de padecer infección por PVH.
  
  2. Pacientes sospechosos o con riesgo de padecer infección por PVH que además estaban coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
  
  3. Pacientes sin sospecha ni riesgo de infección por PVH.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. GRUPOS DE ESTUDIO Y MUESTRAS**

Se ha estudiado la presencia de ADN de PVH y su posterior tipificación en 417 muestras de origen genital pertenecientes a 355 pacientes distribuidos en tres grupos, en un periodo de cuatro años (1994 – 1998).

- Grupo I. 275 muestras pertenecientes a 241 pacientes con signos clínicos y/o citológicos sugerentes de infección por PVH y pacientes asintomáticos con sospecha de infección por dicho virus, procedentes de la consulta de enfermedades de transmisión sexual del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

- Grupo II. 63 muestras pertenecientes a 35 pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH+) que presentan lesiones sugerentes de infección por PVH, procedentes de la consulta de Dermatología del Hospital 12 de Octubre de Madrid. Son pacientes con conductas de riesgo (usuarios de drogas por vía parenteral UDVP y homosexuales).

- Grupo III. 79 muestras pertenecientes a 79 mujeres sin sospecha de padecer infección por PVH, de las cuales, 53 estaban embarazadas a las que se les realizó un estudio microbiológico rutinario durante la gestación. A las 26 pacientes restantes se les realizó un estudio similar por la sospecha de padecer alguna enfermedad de transmisión sexual diferente a la infección por PVH. Todas procedían de las consultas del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

## ***Material y Métodos***

---

Para el presente estudio se recogieron dos tipos de muestras:

- Exudados de diferentes zonas del tracto ano-genital. La toma de la muestra se realizó en zonas con lesión (condilomas, diferentes grados de displasia CIN I, II, III...) y/o en zonas sospechosas de infección.

- Biopsias de zonas que presentaban lesiones sugerentes de infección por PVH, tales como: condilomas acuminados, papulosis bowenoide y verrugas ano-genitales.

La recogida y conservación de las muestras se hizo dependiendo del tipo de muestra a procesar:

- Exudados: se utilizaron torundas de algodón o alginato estériles libres de todo medio de cultivo o medio de transporte, especialmente para evitar posibles inhibiciones en la reacción de amplificación del ADN y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

- Biopsias: fueron fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina. Se realizaron cortes con el microtomo de unas 5 $\mu$ , incluyéndose dos o tres en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, conservándose a 4°C hasta su procesamiento.

### **3.2. TÉCNICAS EMPLEADAS**

En todas las muestras se extrajo el ADN y posteriormente se realizó una amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando unos iniciadores generales que amplifican una región común a todos los PVH (región L1). Una vez amplificado el ADN se llevó a cabo la tipificación.

El proceso se realizó en tres áreas separadas físicamente para evitar contaminaciones. **Área de extracción:** donde se prepararon las muestras y se extrajo el ADN. **Área de amplificación:** la preparación de la mezcla de reacción se realizó en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones. **Área de visualización:** donde se trabajó con el producto amplificado.

Se utilizaron dos métodos de tipificación básicamente:

- PVHfast<sup>R</sup> Pharmagen S.A. En este protocolo se incorpora la mezcla de la reacción de amplificación preparada para su utilización y después, en las muestras positivas, se realizó la tipificación por digestión con enzimas de restricción, seguido del análisis de los fragmentos resultantes ya que presentan un patrón diferente de bandas según el tipo de PVH.
- **SONDAS DE HIBRIDACIÓN:** en esta técnica, la extracción del ADN, al igual que la amplificación fue puesta a punto en nuestro laboratorio. En este caso, la tipificación se realizó mediante la desnaturalización e hibridación del producto amplificado con sondas tipospecíficas. Para la detección fue utilizado el equipo GEN-ETI-K<sup>R</sup> DEIA (DNA Enzyme Immunoassay) de Sorin Biomédica.

## ***Material y Métodos***

### **3.2.1. AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE *Papillomavirus* Y TIPIFICACIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

El PVH se detecta amplificando una región del ADN del virus de unos 450pb dentro de la región L1 del marco abierto de lectura (ORF) del mismo, siendo ésta una región altamente conservada entre los PVH, aunque presenta un patrón de restricción característico para cada tipo de virus.

Para tipar los diferentes PVH, se digiere el ADN amplificado anteriormente con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción cortan en puntos específicos la secuencia de ADN. Si separamos estos fragmentos por su tamaño en un gel de agarosa, cada tipo de virus presentará un patrón de bandas característico.

La extracción del ADN de PVH se llevó a cabo dependiendo de que la muestra fuera exudado o biopsia. El resto del protocolo es idéntico.

Si se trataba de tejido incluido en parafina (biopsias):

- Los cortes se introdujeron en el tubo Eppendorf y se les añadió 50µl de solución de digestión y 50µl de proteinasa K (previamente descongeladas a 37°C).

- Se incluyó un control negativo con cada serie de muestras constituido por 50µl de solución de digestión y 50µl de proteinasa K que se procesó igual que el resto de las muestras.

## ***Material y Métodos***

---

En el caso de las torundas (exudados):

- Se añadió 1ml de suero salino (cloruro sódico 0.9%) al tubo que contiene la torunda y se agitó vigorosamente en el vortex durante 1 min.
- La suspensión celular obtenida al vortear, se decantó en un tubo Eppendorf de 1,5ml y se centrifugó durante 10 min. en microcentrífuga a máxima velocidad.
- Se desechó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta con cuidado de no arrastrar el “pellet”.
- El precipitado de células fue resuspendido en 50µl de solución de digestión y 50µl de proteinasa K.
- Se incluyó un control negativo para cada serie de muestras, constituido por 1ml de suero salino y fue procesado igual que el resto de las muestras.

A continuación, el protocolo a seguir tanto para biopsias como para torundas, es el mismo.

- Se incubaron los tubos que contienen los cortes de la biopsias y los que contienen el precipitado celular con la solución de digestión y la proteinasa K a 55-60°C durante 2-3 h.
- Los tubos se hirvieron a 100°C durante 10 min. para inactivar la proteinasa K.
- Se centrifugó en microfuga durante 10 min. a máxima velocidad y se pasó el sobrenadante (ADN) a un tubo limpio para evitar contaminación del “pellet”. De este sobrenadante se cogió una alícuota de 5µl, guardándose el resto a -20°C.

## ***Material y Métodos***

---

Una vez que se extrajo el ADN pasamos a la reacción de amplificación.

Los tubos de reacción se mantienen congelados a -20°C y contienen la mezcla de reacción; constituida por la enzima Taq polimerasa, iniciadores para la síntesis del ADN, nucleótidos trifosfato, cloruro de magnesio y tampón; todos los elementos necesarios para que se produzca la amplificación.

- Se descongelaron tantos tubos de reacción como muestras procesadas durante unos segundos a 37°C y se guardaron en hielo. Se añadieron 5µl del ADN extraído de las muestras a cada tubo de amplificación.

Los tubos que contienen la mezcla de reacción deben ser mantenidos en hielo hasta que son introducidos en el termociclador, con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas. Estos tubos contienen un plásmido modificado que sirve como control interno de la reacción de amplificación, ya que se amplifica con los mismos cebadores que el PVH produciendo una banda de 1200pb. Además el control interno presenta una diana para el enzima RsaI produciendo dos fragmentos de 550 y 650 pb, por lo que también es útil para monitorizar la digestión con los enzimas de restricción y la electroforésis.

## **Material y Métodos**

---

Por tanto en cada reacción de amplificación se utilizaron dos tipos de controles:

- \* Controles externos. Un control negativo procesado igual que el resto de las muestras (solución salina) y un control positivo (un ADN de PVH conocido) para comprobar que la banda obtenida en el gel de electroforesis corresponde con la banda del ADN del PVH.
- \* Control interno de la reacción de amplificación.

El termociclador utilizado fue GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) que se programó del modo siguiente:

Primero se aplica un ciclo a 94°C de desnaturalización para la separación total de las hebras de ADN, a continuación 35 ciclos de tres fases cada uno: desnaturalización (94°C), apareamiento (52°C) y extensión (72°C).

Finalmente un ciclo de 10 min. a 72°C para asegurar la extensión de la hebra de ADN.

1 ciclo:            94°C    4 min.

35 ciclos:        94°C    1 min.  
                      52°C    1,5 min.  
                      72°C    2 min.

1 ciclo:            72°C    10 min.

4°C continuo hasta la recogida de los tubos.

### ***Material y Métodos***

---

Después de la amplificación se visualiza el producto amplificado mediante una electroforésis en gel de agarosa al 2 %. Para la cual se utilizó agarosa Sigma A-6013 de tipo I y como tampón de electroforésis TBE 1X (Tris-Borato-EDTA).

El gel resultó teñido con bromuro de etidio (BrEt) de una concentración de 10 mg/ml, para un gel de 100ml Se añadió también BrEt al buffer de electroforésis en una proporción de 10  $\mu$ l por 500ml de TBE.

- Se cogieron 10 $\mu$ l del producto amplificado y el resto del contenido del tubo se guardó a 4°C para el tipado del virus (en el caso de que las muestras sean positivas).

- Se añadieron 2 $\mu$ l de solución de carga (Azul de Bromofenol), que actúa como colorante para marcar el frente de avance de la electroforésis, a los 10 $\mu$ l de muestra.

- Dicha mezcla se cargó en el gel.

Se utilizó como marcador de peso molecular Phix174/Hae III que presenta las siguientes bandas: 1358, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb.

## **Material y Métodos**

---

Los resultados que se pueden obtener son los siguientes:

- Una muestra será **positiva** para la presencia de PVH cuando aparezca una banda de 450pb correspondiente al genoma de PVH y además una banda de 1200pb correspondiente al control interno de amplificación.

En muestras con un elevado numero de copia de virus sólo aparece la banda del virus, ya que este amplificado compite con el del plásmido modificado.

- Una muestra será **negativa** para la presencia de PVH cuando aparezca solamente una banda de 1200pb correspondiente al control interno.

- La reacción de amplificación de una muestra estará **inhibida** cuando no aparezca ninguna banda.

- La reacción de amplificación estará **contaminada** si en el control negativo aparece la banda de 450pb correspondiente al genoma de PVH.

## **Material y Métodos**

---

- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS INHIBIDAS

Una muestra puede resultar inhibida por varios motivos:

\* Por presentar algún inhibidor: sangre, medios de transporte no adecuados, sustancias que acidifiquen el pH. etc...

Para evitarlas, se purifica el ADN.

\* Si existe en la muestra un exceso de ADN puede llegar a bloquearse la enzima Taq polimerasa.

Para evitar estas inhibiciones se realizaron diferentes diluciones del ADN extraído: 1/10, 1/100 e incluso 1/1000 sobre una solución que contenía un 50% de agua destilada y 50% de solución de digestión, con el fin de mantener adecuada la concentración de cloruro de magnesio necesaria para que actúe la Taq polimerasa.

Debido al alto número de inhibiciones por exceso de muestra que encontrábamos y que se resolvían diluyendo, se cambió el protocolo realizando diluciones en la muestra antes de extraer. Para ello se añadieron a la torunda 3ml de solución salina en lugar de 1ml para recuperar las células y a continuación se agitó en el vortex. De esta suspensión celular cogimos 500µl para centrifugar en una microcentrífuga a máxima velocidad y recogimos el sedimento que es donde se encuentran las células.

El resto del protocolo no se modificó.

## **Material y Métodos**

---

### **PURIFICACIÓN DEL ADN DE *Papillomavirus***

El extracto de ADN de PVH se purificó según el equipo comercial con minicolumnas Magic™ DNA Clean - Up System (Promega). Los pasos a seguir son los siguientes:

- Se centrifugó el extracto de ADN durante 20 seg. para eliminar todo resto de proteínas del sobrenadante.
- Se pasó el sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril y se añadió 1ml de resina de purificación (Tiocianato de Guanidina 6M) y se incubó 5 min. a temperatura ambiente.
- Se pasó la mezcla anterior a una jeringuilla provista de una minicolumna y se eluyó dicha mezcla aplicando presión sobre el émbolo.
- Se añadieron 2ml de solución de lavado (Isopropanol al 80%) a la jeringuilla y se eluyó la mezcla. El ADN junto a la resina queda atrapado en la minicolumna y el resto de impurezas es eliminado.
- Se quitó la columna y se colocó sobre un Eppendorf limpio. Se secó centrifugando durante 20 seg. y desechamos el tubo.
- En un tubo limpio se añadieron 50µl de solución de digestión para asegurar la concentración necesaria de cloruro de magnesio y, la minicolumna se colocó en la boca del tubo y le añadimos 50µl de solución de elución (agua destilada estéril y apirogena) e incubamos durante 15 min. a temperatura ambiente.
- Y recuperamos el ADN centrifugando durante 20 seg. El agua destilada arrastra el ADN de la columna ayudada por la fuerza centrífuga y lo que recuperamos en el tubo es el ADN purificado listo para volver a ser amplificado.

## ***Material y Métodos***

---

En los casos en los que la reacción se volvía a inhibir, se realizó una nueva extracción a partir de la torunda inicial diluyéndola con solución salina. Si la reacción seguía inhibiéndose se pidió una nueva muestra.

Las muestras que resultaron positivas fueron tipadas por digestión con enzimas de restricción.

- Se utilizaron la enzima 1 (Rsal) y la enzima 2 que se mantuvieron almacenadas a -20°C. Antes de añadirlas al tubo, se centrifugaron durante algunos segundos.

- Se añadió 1µl de Rsal a los amplificadores positivos resuspendiendo con la micropipeta. De aquí, se pasaron 20µl de la solución a otros tubos, a los que se les añadió 1µl de la enzima 2 resuspendiendo de nuevo con la micropipeta (este segundo tubo contiene las dos enzimas).

- Se incubaron todos los tubos en una estufa a 37°C durante 2 horas.

- Después de la incubación se procedió a la visualización de los resultados en un gel de agarosa de alta resolución.

RESOLUCIÓN

Previamente se preparó el tampón para la electroforésis TBE 1x y a continuación se preparó el gel de agarosa de alta resolución al 2,5%.

- Se pesaron 1,25gr de dicha agarosa y se añadió a 50ml de tampón TBE 1X. A continuación, se fundió la agarosa en una placa calefactora agitándose hasta su disolución completa.

- Una vez que se produjo la fusión de la agarosa, se dejó que se enfriara durante unos minutos y se le añadió 1 $\mu$ l de BrEt.

- Los extremos de la bandeja de electroforésis se cerraron con cinta adhesiva. A continuación se colocó el "peine" para modelar los pocillos. Sobre esta base ya preparada se vertió la agarosa ya disuelta. Después se esperó de 15 a 30 min. a que solidificara y se mantuvo a 4°C durante 30 min. para que fuera más consistente.

Para llevar a cabo la electroforésis se siguieron los pasos que a continuación se detallan:

- Se rellenó la cubeta de electroforesis con TBE 1X añadiendo 10 $\mu$ l de BrEt por cada 500ml de tampón y se colocó el gel dentro de la misma.

- Se cargó el marcador de peso molecular phiX174/Hae III (Promega) en el primer pocillo y en el resto de los pocillos se cargaron 15 $\mu$ l de cada muestra. Tanto a las muestras como a los marcadores se les añadieron 3 $\mu$ l de solución de carga (azul de bromofenol).

- Por último se añadió el marcador de peso molecular VIII en el último pocillo.

### **Material y Métodos**

Este marcador presenta bandas de 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26 y 19pb.

- Después de llevar a cabo la electroforesis se visualizó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomó una fotografía.

Los resultados obtenidos se interpretaron de la siguiente manera:

Al haber incubado el amplificado de una muestra positiva para PVH con la enzima 1 y con la enzima 1+2, la banda de 450pb se digiere originando un patrón de bandas distinto según el tipo de PVH que se identifican observando los patrones de restricción establecidos que se muestran en la TABLA 1.

Además del patrón de bandas del virus aparecerán dos bandas de 550 y 650pb correspondientes a la digestión de la banda de 1200pb, del control interno.

La digestión con los enzimas de restricción **no se ha producido** si aparece una única banda de 1200pb.

Si el número de células en la muestra es muy alto, lo que llevaría a una cantidad elevada de ADN en la reacción de amplificación, puede aparecer una banda inespecífica muy débil, de 450 pb (a veces también de 400 pb) **que no corresponde a la amplificación de PVH**. Esta banda se identifica fácilmente ya que es muy débil, no se digiere con el enzima 1 y con el enzima 1+2 produce bandas de aproximadamente 235,147,85 y a veces 110 pb.

<b>TIPOS DE PVH</b>	<b>ENZIMA 1</b>	<b>ENZIMA 2</b>
<b>PVH 6</b>	161,149,72,67	149,94,72,67,67

**Material y Métodos**

PVH 11	216,135,72,26	216,85,70,50,26,2
PVH 13	175,135,73,72	175,73,67,62,6
PVH 16	310,72,70	310,72,70
PVH 18	135,125,85,72,38	125,112,85,72,38
PVH 30	449	291,108,50
PVH 31	380,72	213,167,70,2
PVH 33	236,102,72,39	209,77,72,39,27
PVH 34	186,161,96,15	146,96,88,65,40
PVH 35	177,161,72,42	177,135,72,42
PVH 39	260,123,72	210,72,64,59
PVH 40	365,90	297,90,68
PVH 42	242,135,72	242,108,72,27
PVH 43	338,72,45	330,72,45,8
PVH 45	338,72,45	274,72,50,45
PVH 51	380,72	290,90,72
PVH 52	449	357,92
PVH 53	449	206,158,85
PVH 54	138,125,117,72	125,117,88,72
PVH 55	165,161,72,57	112,83,82,72,46
PVH 56	310,72,49,18	257,72,50,49,18
PVH 57	449	211,142,50,46
PVH 58	306,111,32	256,101,50,32,
PVH 59	452	298,152,2
PVH 61	185,180,72,18	185,180,72,18
PVH 62	359,72,18	249,110,72,18
PVH 64	186,161,72,39	146,87,72,65,39
PVH 66	449	291,158
PVH 67	310,72,67	240,72,67,50,20
PVH 68	260,85,72,38	260,85,72,38
PVH 69	365,72,18	365,72,18
Inespecífica DNA genómico	450 aprox (400)	235,147,85

**TABLA 1. Patrones de restricción para la Dig 1 y 1 + 2 de los tipos de PVH que afectan mucosas(de Villiers, 1989)**

En este trabajo, fueron tipados los PVH 16, 18, 33 (de alto riesgo oncogénico) y

### ***Material y Métodos***

---

PVH 6, 11 (de bajo riesgo) ya que son los más frecuentes en muestras genitales.

Los PVH que no pertenecían a uno de estos dos grupos fueron tipados según las bandas de la tabla 1 y fueron definidos como " indeterminados " (IND).

Según el protocolo que seguimos, **la sensibilidad** de los iniciadores consenso se determinó diluyendo células HeLa (células que contienen entre 20 y 40 copias de PVH 18) en células de una línea tumoral denominada A549 que no contiene el genoma de ningún tipo de PVH. Esta sensibilidad se estimó en 10 células HeLa entre 10000 células A549.

### **3.2.2. AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *Papillomavirus* Y TIPIFICACIÓN CON SONDAS**

DE HIBRIDACIÓN

Esta técnica, como en el caso de la tipificación con las enzimas de restricción, requiere una previa extracción del ADN que se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Se añadió al tubo que contenía la torunda 1ml de solución salina y se agitó en el vortex durante 1 min.

En este caso no se realiza dilución de la muestra ya que se usa la misma torunda que se utilizó para extraer el ADN por el otro método.

Con cada serie de muestras se introduce un tubo con solución salina que se procesará igual que el resto de las muestras como control negativo.

- Pasamos el contenido del tubo a un Eppendorf y lo centrifugamos durante 10 min. en microcentrífuga.

- Quitamos el sobrenadante con una micropipeta con cuidado de no arrastrar el "pellet". Resuspendimos el precipitado restante en 50µl de Tween 20 al 0,5% y 50µl de proteinasa K (Boehringer-Mannheim.0,5mgr/ml) para disgregar el tejido y romper la membrana plasmática celular.

- Se incubó a 60° C durante 2 horas.

- Se incubó a 94° C durante 10 min. en un baño para inactivar la proteinasa K.

- Después se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 min.

- Por último se retiró el sobrenadante (ADN) con cuidado de no arrastrar el "pellet" y se

## **Material y Métodos**

---

introdujo en un tubo estéril que se guardó a - 20°C hasta su utilización.

Después de extraer el ADN se llevó a cabo la amplificación de éste.

La mezcla de reacción utilizada por cada tubo de amplificación y para un volumen final de 100µl fue la siguiente:

### **REACTIVOS**

dNTP (10mM)	8 µl (0.8mM)
MY09 (10pm/µl)	5 µl (50pmol)
MY11 (10pm/µl)	5 µl (50pmol)
Taq Polimerasa (5 U/µl)	0,5 µl (2,5 U)
β-G1 (100pm/µl)	0,10 µl (10pmol)
β-G2 (100pm/µl)	0,10 µl (10pmol)
Tampón (10x)	10 µl (1x)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	6 µl (1.5mM)
Agua destilada	60,3 µl

En la mezcla de reacción se incluyen, como control interno de la reacción de amplificación, los cebadores que amplificarán el gen de la β-Globina que está presente en todas las células humanas y presenta una banda de 268pb.

Los cebadores utilizados son oligonucleótidos sintetizados (Sorin Biomédica) que actúan como iniciadores de la síntesis del ADN cuyas secuencias son las siguientes:

\* CEBADORES DE PVH.

### **Material y Métodos**

---

MY09 CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC

MY11 GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG

\* CEBADORES DE  $\beta$ -GLOBINA.

$\beta$ -G1 (PCO4) CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

$\beta$ -G2 (GH20) GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

(M = A + C) (W = A + T) (R = A + G) (Y = C + T)

Secuencia 5' ---> 3'

Los reactivos utilizados para la mezcla de amplificación fueron; nucleótidos trifosfato (dNTP): dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Perkin Elmer), Taq Polimerasa AMPLITAQ DNA POLIMERASE (Roche), tampón 10x PCR Buffer II (100mM Tris-HCl pH 8,3; 500mM KCl) (Roche) y cloruro de magnesio (Roche).

En esta reacción de amplificación al igual que anteriormente se utilizan dos tipos de controles:

\* Controles externos: un control negativo (solución salina) que se procesa igual que el resto de las muestras y un control positivo (ADN de PVH conocido para comprobar que la banda visualizada en el gel se corresponde con la banda del PVH).

\* Control interno: el gen de la  $\beta$ - Globina.

A la mezcla de reacción (95 $\mu$ l) se le añaden 5 $\mu$ l del ADN extraído. Los tubos se ponen a amplificar en el termociclador con los siguientes ciclos de temperatura.

1 ciclo: (desnaturalización) 94° C 4 min.

35 ciclos: (desnaturalización) 94° C 1 min.

### **Material y Métodos**

---

(apareamiento)	52° C	1,5 min.
(extensión)	72° C	2 min.
1 ciclo: (extensión)	72° C	10min

4° C continuo hasta la recogida de los tubos.

A continuación se visualiza el producto amplificado en un gel de agarosa al 2%.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- La muestra será **positiva** si se visualiza la banda de 450pb correspondiente al PVH y la banda de 268pb del gen de la  $\beta$ -Globina amplificado (control interno).
- La muestra será **negativa** si sólo se visualiza la banda de 268pb correspondiente al control interno de amplificación.
- La reacción de amplificación estará inhibida si no se visualiza ninguna banda.

Para evitar las inhibiciones de la reacción de amplificación obtenidas por esta técnica se purificó el ADN una vez extraído.

PURIFICACIÓN DEL ADN DE *Papillomavirus*

## ***Material y Métodos***

---

Se siguieron los siguientes pasos:

- Se añadieron 100ml de fenolcloroformo-alcohol-isoamílico en una proporción de 25/24/1 al ADN extraído. A continuación vortexamos y centrifugamos durante 10 min.
- Se recogió la fase superior que es el ADN y se añadió el doble de cantidad de etanol absoluto frío. Se conservó 24 horas en el congelador a - 20°C, tiempo en el que se produce la precipitación.
- A continuación se decantó el sobrenadante y se le añadió 1ml de etanol al 70%, se centrifugó y retiramos el etanol. El "pellet" que queda en el tubo es el ADN purificado que fue resuspendido en 100µl de agua destilada.

A partir de aquí se cogieron 5µl de ADN para realizar la reacción de amplificación.

DETECCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO CON SONDAS DE HIBRIDACIÓN

## **Material y Métodos**

---

Las muestras positivas fueron tipadas llevando a cabo una hibridación del ADN con sondas tipoespecíficas.

Esta técnica está basada en la hibridación del ADN amplificado con una sonda de ADN, pegada al pocillo de una placa "microtiter" marcada con estreptavidina-biotina.

La hibridación de la sonda y el ADN es detectada usando un anticuerpo monoclonal anti-DNA que sólo reacciona con la doble cadena de ADN y no con la sencilla.

En primer lugar se pegaron las sondas a la placa, dispensando 100µl de cada sonda en cada pocillo.

Después de tapan la placa para impedir la desecación se incubó durante 24 horas en nevera. Al final de esta incubación, se lavó la placa para quitar el exceso de sonda.

Se pusieron tantos controles positivos como sondas utilizadas, dos controles negativos y un blanco.

Las sondas utilizadas para tipar el PVH son oligonucleótidos sintéticos (Sorin Biomédica) cuyas secuencias de nucleótidos desde el extremo 5´ al extremo 3´ y el tipo de PVH del que son específicas son las siguientes:

PVH 6. Sonda My 12 (0,2 ng/µl)---- CAT CCG TAA CTA CAT CTT CCA

PVH 11. Sonda My 13 (0,2 ng/µl)---- TCT GTG TCT AAA TCT GCT ACA

PVH 16. Sonda My 14 (0,2 ng/µl)---- CAT ACA CCT CCA GCA CCT AA

### **Material y Métodos**

---

PVH 33. Sonda My 16 (0,1 ng/μl)---- CAC ACA AGT AAC TAG TGA CAG

PVH 18. Sonda WD 74 (0,2 ng/μl)-- CGA TGC TGC ACC GGC TGA

Las secuencias complementarias a estas sondas, es decir, los controles positivos se detallan a continuación:

Sec. complement. My 12 (2,5 ng/μl)---TGG AAG ATG TAG TTA CGG ATG

Sec. complement. My 13 (2,5 ng/μl)---TGT AGC AGA TTT AGA CAC AGA

Sec. complement. My 14 (2,5 ng/μl)---TTA GGT GCT GGA GGT GTA TG

Sec. complement. My 16 (2,5 ng/μl)---CTG TCA CAT GTT ACT TGT GTG

Sec. complement. WD74 (2,5 ng/μl)--TCA GCC GGT GAC GCA TCC

Para realizar la hibridación, en primer lugar hubo que desnaturalizar el ADN incubando los tubos del amplificado durante 15 min. a 99°C, inmediatamente después se pasaron a hielo durante 10 min.

- Se añadieron 100μl de tampón de hibridación en cada pocillo de la placa. Después se dispensaron 20μl de cada muestra desnaturalizada en sus respectivos pocillos y se añadieron 20μl de las secuencias complementarias a las sondas (controles positivos) y de los controles negativos. La placa tapada se incubó a 55°C, temperatura óptima de hibridación, durante una hora.

- Después de lavar la placa se dispensaron 100μl de la solución diluida de anticuerpo anti-doble hebra de ADN (Anti-Ds-DNA) en todos los pocillos excepto en el blanco, se incubó la placa durante una hora a temperatura ambiente.

### ***Material y Métodos***

---

- Se lavó la placa y se dispensaron 100µl de la solución diluida del marcador enzimático anti-IgG de ratón, marcado con peroxidasa de caballo (enzima Tracer) en todos los pocillos excepto en el blanco. Se incubó la placa durante una hora a temperatura ambiente. Este marcador enzimático detecta la unión del ADN y el anticuerpo.
- Una vez lavada la placa se dispensaron 100µl de la solución de cromógeno-sustrato en todos los pocillos, incluido el blanco y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente en oscuridad (sin tapar la placa).
- Después de la última incubación, se dispensaron 200µl de ácido sulfúrico 1N (agente bloqueante) en todos los pocillos incluido el blanco para parar la reacción.

A continuación se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 450/630 nm de longitud de onda.

Si la sonda específica se une a la hebra complementaria de ADN desnaturalizado, se forma un híbrido y la muestra es positiva. Por el contrario, si la muestra es negativa, no estará presente la hebra complementaria y no se producirá la hibridación.

El valor del punto de corte se calculó realizando la media de los valores de los controles negativos, sumándole a esa media 0.150; el resultado de esa suma es el valor por encima del cual la hibridación ha tenido lugar.

Utilizando esta técnica podemos detectar tantos tipos de PVH, como sondas haya disponibles. En nuestro trabajo, como se indicó anteriormente, se pretendía conocer el riesgo oncogénico de los PVH. Por lo que utilizamos cinco sondas

## **Material y Métodos**

---

correspondientes a los PVH 6,11 (bajo riesgo) y 16,18 y 33 (alto riesgo).

Si una muestra, había sido positiva en el gel de electroforésis y sin embargo no hibridaba con ninguna sonda, se consideró positiva para PVH e indeterminada su tipación (IND).

Pensamos que al procesar la misma torunda por los dos métodos en estudio podrían presentarse resultados positivos con el primer método utilizado (enzimas de restricción) y negativos por el segundo método (sondas de hibridación), debido a que se hubiera perdido parte de su ADN al ser extraída dos veces. Sin embargo, esto no se ha producido en ningún caso, lo que corrobora la extrema sensibilidad de la PCR.

### **3.3. MÉTODO ESTADÍSTICO**

El método estadístico aplicado para el estudio es la prueba de asociación de caracteres cualitativos por medio del criterio del Chi- cuadrado; distribución  $\chi^2$  de Pearson.

## **IV. RESULTADOS**

## **Resultados**

---

En el estudio de diagnóstico y tipificación de *Papillomavirus humano* (PVH) por amplificación genómica en muestras genitales se procesaron 417 muestras en total, correspondientes a 355 pacientes.

Del total de muestras 118 fueron positivas, 278 fueron negativas y 21 no se pudieron valorar porque la reacción de amplificación fue inhibida.

Los resultados de detección y tipificación de PVH de todas estas muestras por los dos métodos descritos anteriormente se resumen en seis tablas generales encuadradas dentro de los tres grupos de pacientes en estudio:

- 1 - Pacientes sospechosos o con riesgo de padecer infección por PVH que no presentaban infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
- 2 - Pacientes sospechosos o con riesgo de padecer infección por PVH que además estaban infectados por VIH.
- 3 - Mujeres sin sospechas ni riesgo de padecer infección por PVH y que no presentaban infección por VIH, de las cuales 53 estaban embarazadas.

Todas las muestras positivas, lo fueron por los dos métodos de amplificación, al igual que las que resultaron inhibidas.

En cada grupo de pacientes se describen 2 tablas de resultados generales. Una de ellas con los resultados obtenidos por el método de tipación con enzimas de restricción y otra con los resultados de la hibridación con sondas tipoespecíficas.

## **Resultados**

### **4.1. PACIENTES VIH NEGATIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR *Papillomavirus***

Dentro de este grupo encuadramos 275 muestras de las cuales 70 (25,4%) fueron positivas, 198 (72%) fueron negativas y 7 (2,5%) resultaron inhibidas.

Las tomas correspondían a 79 condilomas, 113 lesiones y 83 procedían de zonas sin lesión. De estas muestras 57 eran biopsias y 218 eran exudados que pertenecían a 241 pacientes (105 de mujeres y 170 de hombres).

**TABLA 1. Resultados obtenidos utilizando la hibridación con sondas tipoespecíficas**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
MUESTRAS	Nº	+	26	3	9	3	0	24	5
Biopsias	57	15	5	2	1	1	0	5	1
Exudados	218	55	21	1	8	2	0	19	4
Mujeres	105	29	6	1	7	1	0	14	0
Hombres	170	41	20	2	2	2	0	10	5
Condilomas	79	30	12	2	3	1	0	8	4
Lesiones	113	27	10	0	6	2	0	8	1
Sin lesión	83	13	4	1	0	0	0	8	0

## **Resultados**

**TABLA 2. Resultados obtenidos utilizando las enzimas de restricción**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
MUESTRAS	Nº	+	33	5	7	0	0	10	15
<b>Biopsias</b>	57	15	8	1	1	0	0	1	4
<b>Exudados</b>	218	55	25	4	6	0	0	9	11
<b>Mujeres</b>	105	29	9	2	5	0	0	7	7
<b>Hombres</b>	170	41	24	3	2	0	0	3	8
<b>Condilomas</b>	79	30	15	3	1	0	0	2	9
<b>Lesiones</b>	113	27	12	1	4	0	0	6	4
<b>Sin lesión</b>	83	13	6	1	2	0	0	2	2

Las 7 muestras cuya reacción de amplificación fue inhibida eran exudados correspondientes a 4 mujeres y 3 hombres.

Con respecto al tipo de lesión, 1 era un condiloma, 4 procedían de zonas con lesiones y 2 que no presentaban lesión. No resultó inhibida la reacción de amplificación en ninguna de las 57 muestras procedentes de biopsias.

Con respecto al tipo de muestra (exudado ó biopsia) no se encontraron diferencias al diagnosticar PVH, por lo que sería más conveniente utilizar el exudado como muestra de elección que no precisa técnicas cruentas para su obtención.

## **Resultados**

---

Con respecto al sexo tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la detección de PVH.

La presencia de PVH fue menor en zonas que no presentaban lesión con significación estadística ( $p < 0.05$ ).

Comparando las muestras procedentes de zonas con condilomas y con lesión la presencia del PVH fue mayor en zonas condilomatosas (30 de 79) ( $p < 0.05$ ).

Es importante destacar que existe un 15,6% de pacientes asintomáticos infectados (13 de 83).

Con respecto a la tipificación de los PVH y la comparación de los dos métodos empleados en el estudio encontramos que:

- El PVH más frecuente encontrado por los dos métodos fue el PVH tipo 6.
  
- Sólo se observaron 3 PVH tipo 18; 1 perteneciente a una biopsia y 2 a exudados. Este tipo de PVH sólo se detectó por el método de hibridación con sondas tipoespecíficas.
  
- No se detectó la presencia de ningún PVH tipo 33.

## **Resultados**

---

Al comparar la tipación de PVH por ambos métodos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo si se obtuvieron más PVH indeterminados utilizando la hibridación con sondas que con las enzimas de restricción ( $p < 0.01$ ). De la misma manera se obtuvieron más muestras mixtas (presencia de varios PVH) utilizando el método de las enzimas de restricción que con el de la hibridación con sondas ( $p < 0.05$ ).

En el grupo de los pacientes VIH negativos tenemos dos tipos de muestras; biopsias y exudados. A continuación se expresan en las tablas 3 y 4 los resultados obtenidos en biopsias y en las tablas 5 y 6 los obtenidos en exudados utilizando ambos métodos de tipación.

**Resultados**

**TABLA 3. Resultados obtenidos en biopsias utilizando la hibridación con sondas tipoespecíficas**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	5	2	1	1	0	5	1
<b>MUJERES</b>	11	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>HOMBRES</b>	46	15	5	2	1	1	0	5	1
<b>CONDILOMAS</b>	28	8	0	2	0	1	0	4	1
<b>LESIONES</b>	29	7	5	0	1	0	0	1	0

**TABLA 4. Resultados obtenidos en biopsias utilizando la tipación con enzimas de restricción**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	8	1	1	0	0	1	4
<b>MUJERES</b>	11	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>HOMBRES</b>	46	15	8	1	1	0	0	1	4
<b>CONDILOMAS</b>	28	8	3	1	0	0	0	1	3
<b>LESIONES</b>	29	7	5	0	1	0	0	0	1

## Resultados

**TABLA 5. Resultados obtenidos en exudados utilizando sondas tipoespecíficas**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	21	1	8	2	0	19	4
<b>MUJERES</b>	94	29	6	1	7	1	0	14	0
<b>HOMBRES</b>	124	26	15	0	1	1	0	5	4
<b>CONDILOMAS</b>	51	22	11	0	3	0	0	4	3
<b>LESIONES</b>	84	20	6	0	5	2	0	7	1
<b>SIN LESION</b>	83	13	4	1	0	0	0	8	0

**TABLA 6. Resultados obtenidos en exudados utilizando las enzimas de restricción**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	25	4	6	0	0	9	11
<b>MUJERES</b>	94	29	9	2	4	0	0	7	7
<b>HOMBRES</b>	124	26	16	2	2	0	0	2	4
<b>CONDILOMAS</b>	51	22	12	2	1	0	0	1	6
<b>LESIONES</b>	84	20	7	1	3	0	0	6	3
<b>SIN LESION</b>	83	13	6	1	2	0	0	2	2

Los resultados que se obtienen al separar biopsias y exudados utilizando ambos

## **Resultados**

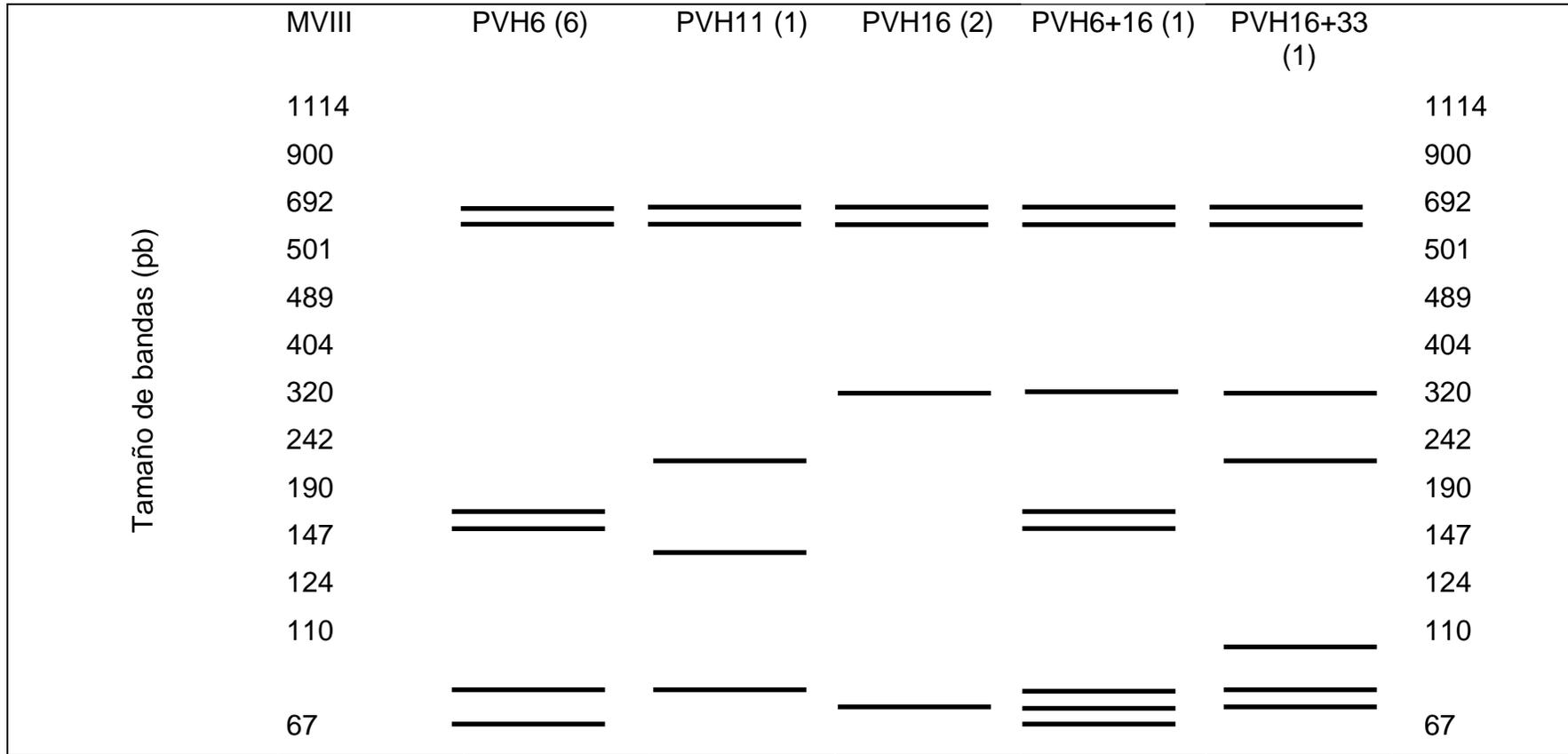
---

métodos de tipación claramente son paralelos a los que se obtienen en la tabla general de resultados.

Utilizando el método de hibridación con sondas se comprobó que no existían diferencias al tipar PVH dependiendo de que la muestra fuera un exudado o una biopsia. Tampoco se encontraron diferencias al utilizar el método de las enzimas, lo que demuestra de nuevo, que tanto a la hora de determinar la presencia de PVH como a la de tiparlos es indiferente que la muestra sea un exudado o una biopsia.

En las Figuras 1 y 2 se detallan los tipos de PVH que con más frecuencia aparecieron entre los pacientes VIH negativos que no presentaban lesión (asintomáticos infectados) cuando se utilizó el método de las enzimas de restricción.

## Resultados



**FIG. 1. Patrones de restricción para la enzima 1 de los PVH encontrados en zonas sin lesión de pacientes VIH – sospechosos o con riesgo de infección por PVH.**

PVH 6. 159, 149, 73 y 67 pb

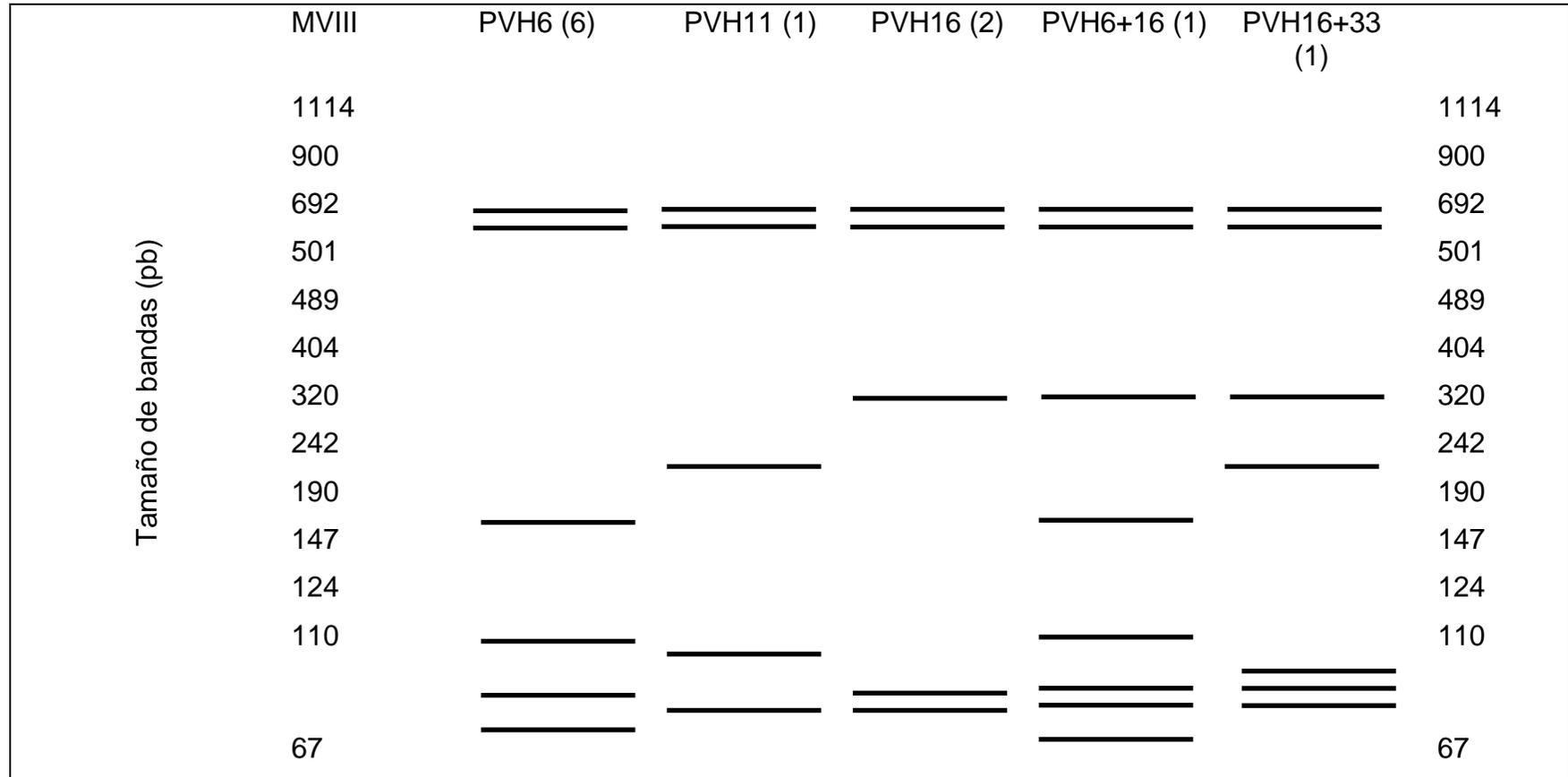
PVH 11. 216, 134, 73 pb

PVH 16. 310, 72, 70 pb

PVH 6+16. 310, 159, 149, 73, 71, 67 pb

PVH 16+33. 310, 236, 102, 72, 70 pb

## Resultados



**FIG.2. Patrones de restricción para la enzima 1 + 2 de los PVH encontrados en zonas sin lesión de pacientes VIH – sospechosos o con riesgo de infección por PVH.**

PVH 6.. 149, 94, 72, 67 pb

PVH 11. 216, 85, 70 pb

PVH 16. 310, 72, 70 pb

PVH 6+16. 310, 149, 94, 72, 70, 67 pb

PVH 16+33. 310, 209, 77, 72, 70 pb

## **Resultados**

---

Se encontraron además 2 PVH indeterminados que no se representan en la figura puesto que no se pudo determinar el tipo.

- Mayoritariamente se encontró el PVH 6 (6 de 13).
- En dos casos encontramos PVH 16 de alto riesgo oncogénico.
- Con respecto a las infecciones mixtas encontradas, los PVH que participan en ellas son uno de bajo y otro de alto riesgo oncogénico, estando presente el PVH 16 en las dos. Estos resultados nos parecen de interés ya que los pacientes estudiados pertenecen a un grupo que aparentemente no presenta lesión.

## **Resultados**

---

### **4.2. PACIENTES VIH POSITIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR *Papillomavirus***

Dentro de este grupo se estudiaron 63 muestras de las cuales 41 (65.0%) fueron positivas, 16 (25,3%) fueron negativas y 6 (9,5%) resultaron inhibidas.

Las tomas correspondían a 30 condilomas, 15 lesiones y 18 de zonas sin lesión. Las 63 muestras eran exudados pertenecientes a 35 pacientes (59 de hombres y 4 de mujeres)

Los resultados obtenidos para este grupo se expresan en las tablas 7 y 8.

**TABLA 7. Resultados obtenidos utilizando la hibridación con sondas tipoespecíficas**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	2	3	7	0	1	27	1
<b>Exudados</b>	63	41	2	3	7	0	1	27	1
<b>Mujeres</b>	4	1	0	0	0	0	0	1	0
<b>Hombres</b>	59	40	2	3	7	0	1	26	1
<b>Condilomas</b>	30	27	0	2	3	0	0	21	1
<b>Lesiones</b>	15	9	2	0	2	0	0	5	0
<b>Sin lesión</b>	18	5	0	1	2	0	1	1	0

## **Resultados**

**TABLA 8. Resultados obtenidos utilizando las enzimas de restricción**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	11	4	4	0	1	10	11
<b>Exudados</b>	63	41	11	4	4	0	1	10	11
<b>Mujeres</b>	4	1	0	0	0	0	0	1	0
<b>Hombres</b>	59	40	11	4	4	0	1	9	11
<b>Condilomas</b>	30	27	11	4	1	0	1	5	5
<b>Lesiones</b>	15	9	0	0	2	0	0	4	3
<b>Sin lesión</b>	18	5	0	0	1	0	1	0	3

De las 6 muestras cuya reacción de amplificación fue inhibida; 1 pertenecía a una mujer, mientras que 5 eran de hombres.

Con respecto a la zona de la toma; 2 procedían de lesiones condilomatosas y 4 de zonas sin lesión.

Aunque la mayoría de las muestras procedían de hombres (59 de 63), no se encontraron diferencias al diagnosticar PVH dependiendo de si la muestra procedía de un hombre o de una mujer.

## **Resultados**

---

La presencia de PVH fue menor en zonas que no presentaban lesión ( $p < 0.001$ ). Si comparamos las muestras procedentes de zonas condilomatosas y con lesión, el PVH estaba más presente en condilomas (27 de 30) ( $p < 0.05$ ).

Es importante destacar que existe un 27,7% de pacientes asintomáticos infectados (5 de 18).

Con respecto a la tipificación de los PVH y la comparación de los dos métodos empleados en estudio observamos que:

- No se detectó la presencia de ningún PVH tipo 18.
- Se encontró 1 PVH tipo 33 por los dos métodos de tipación.
- No se observó predominio de algún tipo de PVH en especial por los dos métodos, aunque se tipó con más frecuencia el PVH tipo 6 con el método de las enzimas que con el de hibridación con sondas ( $p < 0.01$ ), diferencia significativa con respecto al grupo anterior.

Con significación estadística ( $p < 0.001$ ) se obtuvieron más PVH indeterminados utilizando el método de hibridación con sondas. Sin embargo hubo más muestras mixtas utilizando el método de las enzimas de restricción ( $p < 0.01$ ).

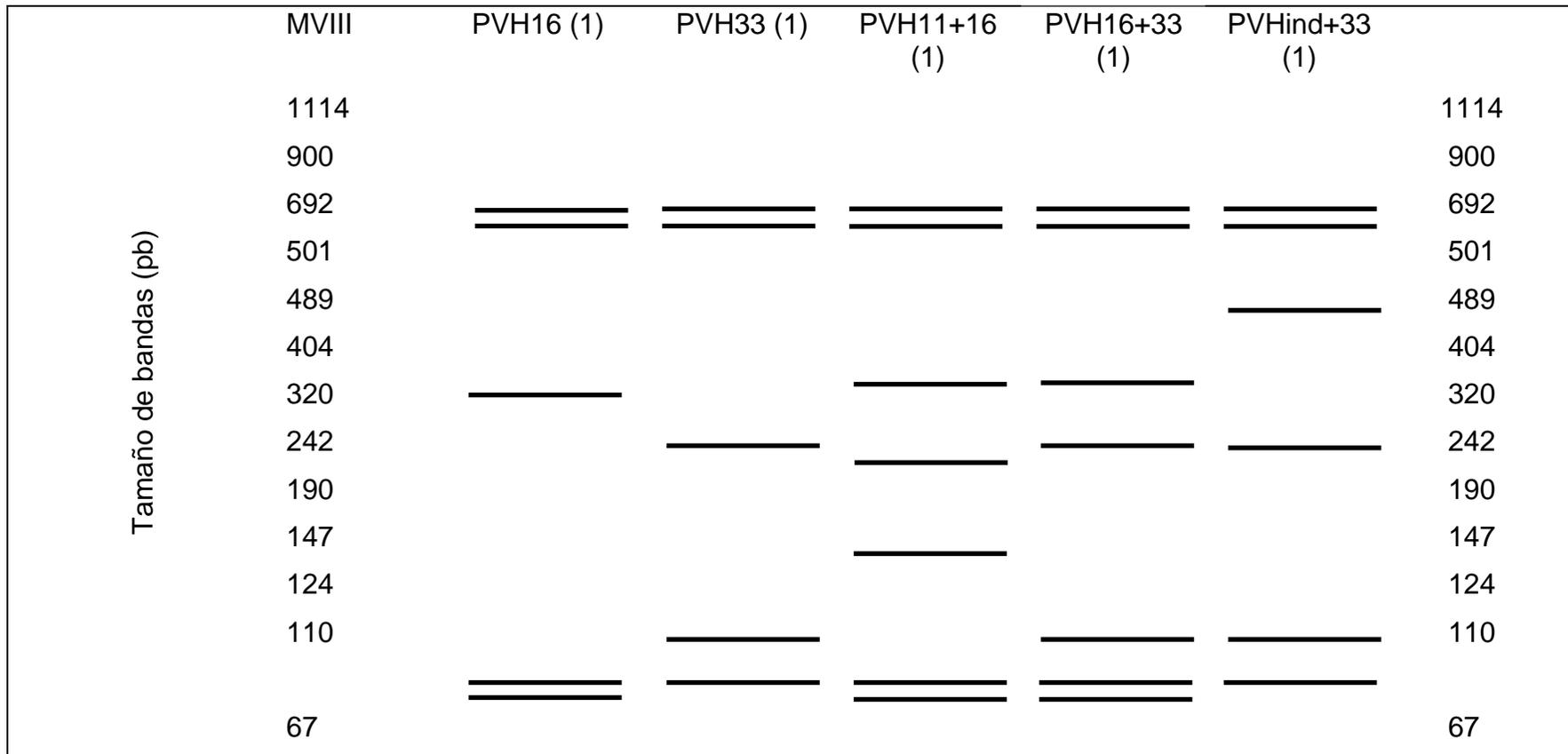
## **Resultados**

---

En las Figuras 3 y 4 se recogen las bandas resultantes de la digestión con enzimas de restricción de los PVH que observamos en zonas sin lesión de pacientes VIH+ sospechosos o con riesgo de infección por PVH.

- Los tipos de PVH encontrados en este grupo y en estas zonas son de alto riesgo oncogénico.
- Con respecto a las infecciones mixtas encontradas, observamos que uno de los PVH es de bajo y otro de alto riesgo y en algunos casos, los dos PVH son de alto riesgo.

## Resultados



**FIG. 3. Patrones de restricción para la enzima 1 de los PVH encontrados en zonas sin lesión de pacientes VIH + sospechosos o con riesgo de infección por PVH.**

PVH 16. 310, 72, 70 pb

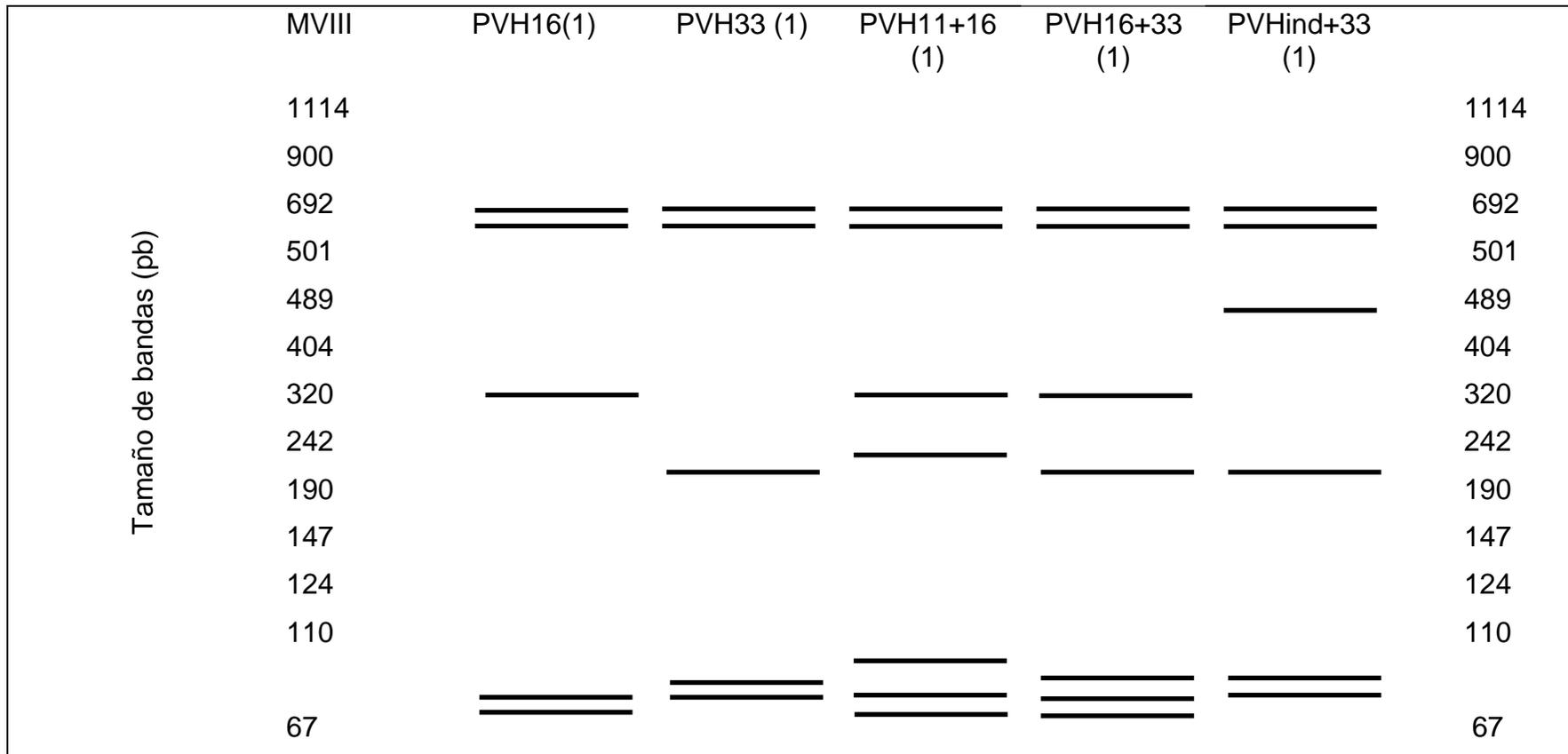
PVH 33. 236, 102, 72 pb

PVH 11+16. 310, 216, 135, 72, 70 pb

PVH 16+33. 310, 236, 102, 72, 70 pb

PVH ind+33. 450, 236, 102, 72 pb

## Resultados



**FIG. 4. Patrones de restricción para la enzima 1 + 2 de los PVH encontrados en zonas sin lesión de pacientes VIH + sospechosos o con riesgo de infección por PVH.**

PVH 16. 310, 72, 70 pb

PVH 33. 209, 77, 72 pb

PVH 11+16. 310, 216, 85, 72, 70 pb

PVH 16+33. 310, 209, 77, 72, 70 pb

PVH ind+33. 450, 209, 77, 72 pb

## **Resultados**

---

Los tipos de PVH encontrados en pacientes de este grupo (infectados con VIH sospechosos o con riesgo de infección por PVH) que presentan condilomas o lesiones, utilizando el método de las enzimas de restricción, son de alto y bajo riesgo oncogénico. A diferencia con respecto al grupo de pacientes que no presentaban lesión aparente.

En la página siguiente se muestra una fotografía de un gel de electroforesis obtenido después de la digestión con enzimas de restricción (enzima 1 y 2) llevado a cabo en este grupo de pacientes.

## ***Resultados***

---

## **Resultados**

---

### COMENTARIO A LA FOTOGRAFIA

La foto corresponde a la electroforesis de 8 muestras incubadas con las dos enzimas de restricción.

En el primer pocillo y en el último se pueden observar los marcadores de peso molecular  $\phi$  x174 Y MVIII respectivamente.

Desde el pocillo 2 al 9 aparecen las bandas resultantes de las 8 muestras de estudio incubadas con la enzima 1 y desde el pocillo 10 al 17 las bandas correspondientes a la incubación de las 8 muestras con las enzimas 1 y 2.

Se pueden observar bandas de 550 y 650 pb correspondientes a la digestión con enzimas de restricción del control interno de amplificación.

Observando los patrones de restricción obtenidos en la foto se determinaron los siguientes tipos de PVH:

- MUESTRA 1: pocillos 2 y 10  $\Rightarrow$  PVH 6
- MUESTRA 2: pocillos 3 y 11  $\Rightarrow$  PVH 11
- MUESTRA 3: pocillos 4 y 12  $\Rightarrow$  PVH 6
- MUESTRA 4: pocillos 5 y 13  $\Rightarrow$  PVH 16 + 11
- MUESTRA 5: pocillos 6 y 14  $\Rightarrow$  PVH 11
- MUESTRA 6: pocillos 7 y 15  $\Rightarrow$  PVH 16
- MUESTRA 7: pocillos 8 y 16  $\Rightarrow$  PVH ind
- MUESTRA 8: pocillos 9 y 17  $\Rightarrow$  PVH 16

En el pocillo 8 y 16 encontramos una banda de 450 pb que corresponde con un PVH indeterminado ya que no se cortó con las enzimas de restricción.

Las últimas bandas que se observan en cada pocillo son dímeros de "primer".

## **Resultados**

---

### **4.3. PACIENTES VIH NEGATIVOS SIN SOSPECHA NI RIESGO DE INFECCIÓN POR *Papillomavirus***

Dentro de este grupo tenemos 79 muestras de 79 mujeres de las cuales; 7 (8,86%) fueron positivas, 64 (81 %) fueron negativas y 8 (10,0%) resultaron inhibidas. Todas las muestras eran exudados. 53 muestras pertenecían a mujeres embarazadas.

Los resultados obtenidos están recogidos en las tablas 9 y 10 que se expresan a continuación.

**TABLA 9. Resultados obtenidos de la hibridación con sondas tipoespecíficas**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	0	0	1	0	0	6	0
<b>Exudados</b>	79	7	0	0	1	0	0	6	0
<b>EMBARAZO</b>	53	4	0	0	0	0	0	4	0
<b>NO EMBARAZO</b>	26	3	0	0	1	0	0	2	0

**TABLA 10. Resultados obtenidos utilizando las enzimas de restricción**

## **Resultados**

TIPOS DE PVH			6	11	16	18	33	IND	MIXTA
<b>MUESTRAS</b>	<b>Nº</b>	<b>+</b>	0	0	5	0	0	0	2
<b>Exudados</b>	79	7	0	0	5	0	0	0	2
<b>EMBARAZO</b>	53	4	0	0	3	0	0	0	1
<b>NO EMBARAZO</b>	26	3	0	0	2	0	0	0	1

Las 8 muestras cuya reacción de amplificación resultó inhibida eran exudados de mujeres, de las que 5 estaban embarazadas.

Dentro de este grupo es interesante destacar en primer lugar que hay pacientes asintomáticas infectadas (7 de 79) y que 4 de ellas estaban embarazadas.

Con respecto a la tipificación de los PVH y la comparación de los dos métodos en estudio, encontramos los siguientes resultados:

- encontramos 5 PVH 16 y 2 infecciones mixtas con el método de las enzimas de restricción
- Con el método de la hibridación con sondas tipoespecíficas observamos 1 PVH 16 y 6 indeterminados.

Lo interesante es que en un grupo supuestamente sin riesgo de infección por

## **Resultados**

---

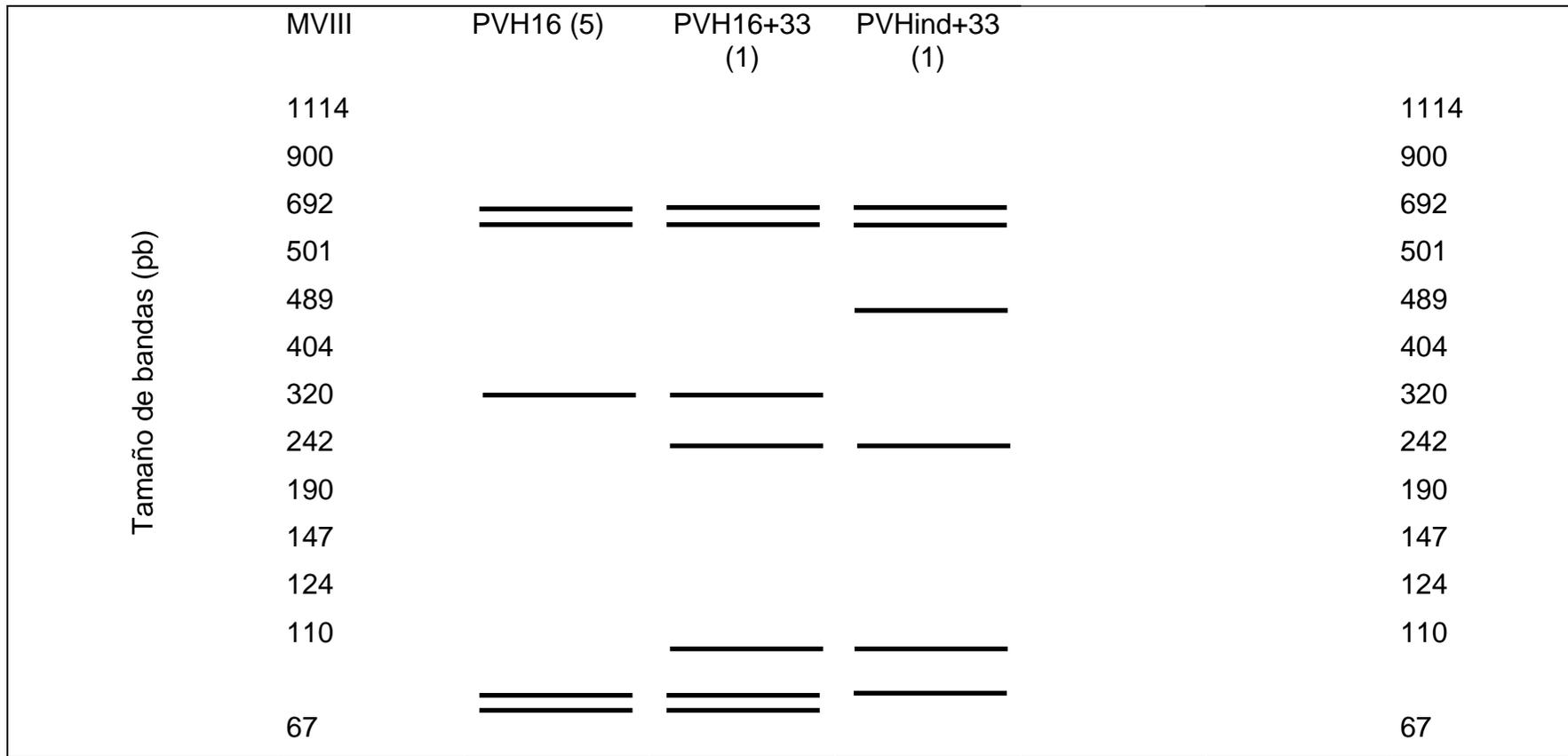
PVH, hemos encontrado PVH tipo 16 que es de alto riesgo oncogénico.

- Se encontró con más frecuencia el PVH 16 con el método de las enzimas de restricción que con el de sondas de hibridación ( $p < 0.05$ ).
- Sólo se encontraron PVH indeterminados utilizando el método de sondas tipoespecíficas.
- Sólo aparecieron muestras mixtas utilizando el método de las enzimas de restricción.

En las figuras 5 y 6 se recogen los patrones de restricción para las enzimas utilizadas de los PVH encontrados en pacientes VIH negativos sin sospecha ni riesgo de padecer infección por PVH.

Sólo se encontró PVH 16 y en las infecciones mixtas, al menos uno de los PVH que participaban en ellas, era de alto riesgo oncogénico, lo cual es importante ya que es un grupo que no presenta lesión aparente y además no tiene riesgo de infección por PVH.

**Resultados**



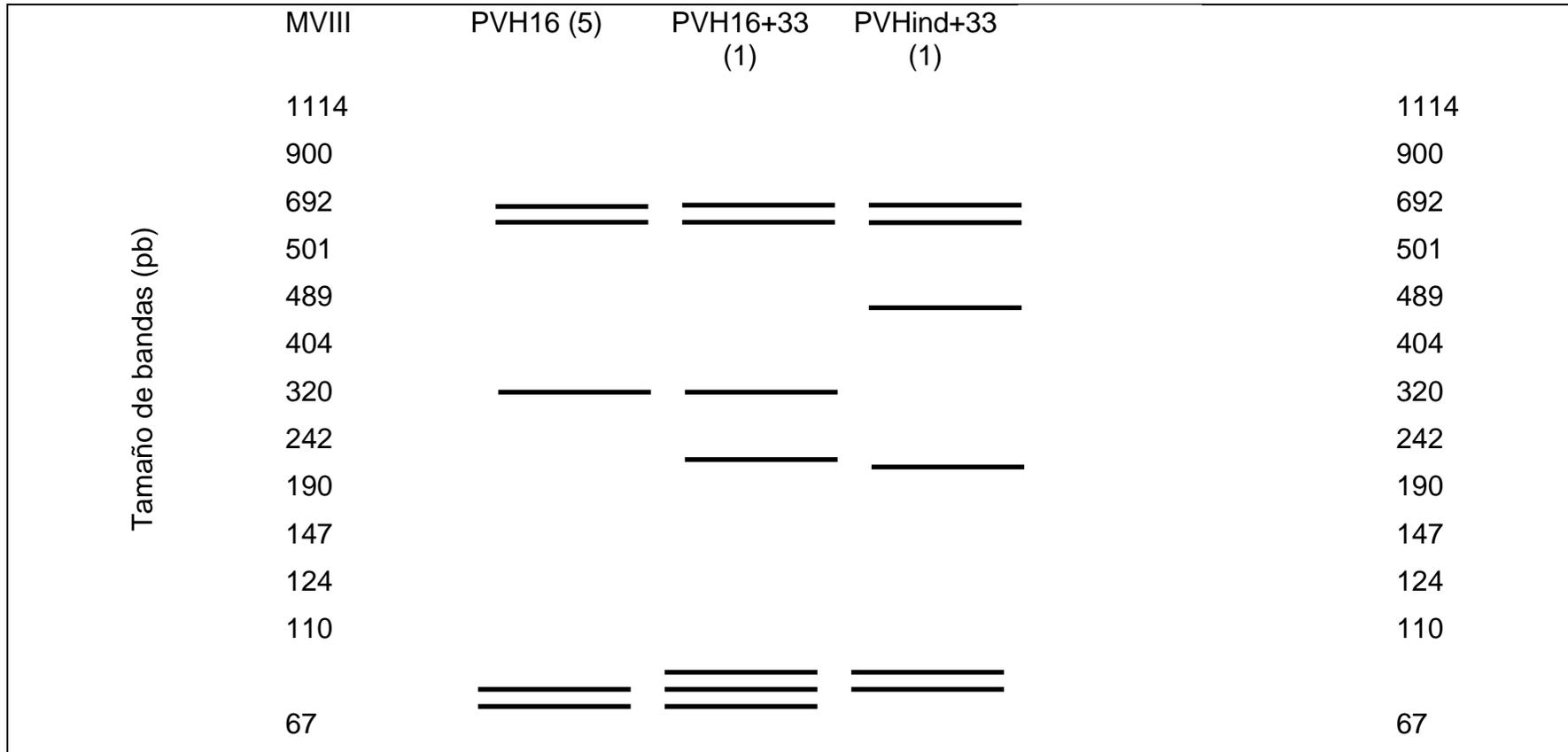
**FIG. 5. Patrones de restricción para la enzima 1 de los PVH encontrados en pacientes VIH - sin sospecha ni riesgo de infección por PVH.**

PVH 16. 310, 72, 70 pb

PVH 16+33. 310, 236, 102, 72, 70 pb

PVH ind+33. 450, 236, 102, 72 pb

**Resultados**



**FIG. 6. Patrones de restricción para la enzima 1 + 2 de los PVH encontrados en pacientes VIH - sin sospecha ni riesgo de infección por PVH.**  
 PVH 16. 310, 72, 70 pb  
 PVH 16+33. 310, 209, 77, 72, 70 pb  
 PVH ind+33. 450, 209, 77, 72 pb

## **Resultados**

---

Comparando los resultados obtenidos en pacientes VIH- y VIH+ sospechosos o con riesgo de infección por PVH se observó que la presencia de PVH es mayor en pacientes VIH+ con significación estadística ( $p < 0.001$ ), debido probablemente al estado de inmunosupresión al que están sometidos estos pacientes.

La presencia de PVH en condilomas era más frecuente ( $p < 0.001$ ) en pacientes VIH+, así como en las lesiones.

No se observaron diferencias entre estos dos grupos al comparar la presencia de PVH en zonas sin lesión.

## **V. DISCUSIÓN**

## *Discusión*

---

La infección por PVH está asociada con diferentes enfermedades en humanos, estos virus son además los responsables de las verrugas, incluidas las anogenitales. La mayor importancia la presenta la conexión que existe entre ciertos tipos de PVH y el proceso de malignización, como sucede en el cáncer del cuello uterino. Hay que tener en cuenta que el número de infecciones genitales por PVH diagnosticadas va en aumento y, el cáncer cervical es la segunda causa de muerte por motivos oncológicos en mujeres en todo el mundo<sup>89</sup>.

La infección por PVH debe darse en el proceso de transformación neoplásica, por lo que el PVH se encuentra en el tejido cervical antes de que algún cambio citopatológico o la presentación de síntomas pudieran alertar al clínico. Podemos encontrar con técnicas de detección de ADN PVH “oncogénicos” en pacientes sanos, lo cual es válido para identificar una subpoblación de mujeres con riesgo para desarrollar cáncer<sup>90</sup>.

Aunque el examen clínico y los “screening” con citología (pap smear) son métodos de diagnóstico clínico de PVH, los que detectan el ADN son los más valiosos para estudiar la enfermedad ya que detectan la infección precozmente y determinan el tipo implicado, lo cual es útil para realizar una prevención temprana y reducir los costes de procedimientos confirmatorios ya que estas pruebas además son necesarias en el seguimiento de la respuesta viral al tratamiento.

La técnica de detección de ADN empleada en este estudio es PCR que tiene una alta sensibilidad y especificidad, es un método rápido, y capaz de detectar cantidades mínimas de ADN de PVH<sup>78, 77</sup>.

## ***Discusión***

---

Para determinar el tipo de PVH implicado, como se describió en material y métodos, se emplea la hibridación con sondas tipoespecíficas y la digestión de los productos amplificados con enzimas de restricción.

Todas las muestras positivas de los tres grupos en estudio, lo fueron por los dos métodos de amplificación, al igual que las que resultaron inhibidas, por lo que los dos métodos estudiados son igual de válidos.

### **5.1. PACIENTES VIH NEGATIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR *Papillomavirus***

No se encontraron diferencias con respecto al porcentaje de muestras positivas en exudados y biopsias (25.2% y 26.3% respectivamente). Aunque la biopsia corresponde directamente a la lesión y el contenido de los exudados consiste en células exfoliadas y esto parece ser suficiente para detectar el PVH. Por tanto es conveniente utilizar el exudado como muestra de elección que se toma sin emplear técnicas invasivas<sup>91,92</sup>.

## *Discusión*

---

Otros autores también encuentran una prevalencia similar de infección por PVH en exudados y biopsias<sup>93,94,95</sup> utilizando también la técnica de PCR. Sin embargo en el trabajo de Margall N. et al<sup>96</sup> se observa un 13.6% de positividad en los exudados frente a un 53% en las biopsias y Tachezy R. et al<sup>18</sup> obtiene un 40% de positividad en exudados y un 68.5% para las biopsias.

Con respecto al sexo, tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la detección de PVH por PCR. Bosch X., en una comunicación personal, también detecta de forma similar el PVH tanto en hombres como en mujeres usando la misma técnica<sup>97</sup> al igual que Koutsky L<sup>98</sup>. En cambio, otros autores encuentran diferencias cuando detectan condilomas por citología. Así, Chuang et al en Rochester, Minnesota, detectaron una incidencia de condilomas más alta en mujeres que en hombres<sup>99</sup>. Por otra parte, otros autores en Reino Unido encontraron mayor incidencia en hombres<sup>100</sup>. En nuestro estudio también se recopilaron los condilomas observados por el clínico mediante citología pertenecientes a hombres o a mujeres, en este caso un 23.8% (25 de 105) se observaron en mujeres y un 31.17% (53 de 170) en hombres, con lo cual aunque no es mucha la diferencia se detectaron en mayor grado en el varón. Las diferencias encontradas en estos estudios pueden ser debidas a los diferentes factores demográficos y sociales de cada país y a los factores que ya han sido comentados en la introducción y que afectan de forma individual para la infección por PVH, como la edad de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales, hábitos sexuales, higiene personal etc...

## *Discusión*

---

En nuestro estudio, de 275 muestras pertenecientes a este grupo de pacientes, sólo se inhibieron 7 (2.5%) obteniendo por tanto, un porcentaje bajo de inhibición. Es interesante destacar que no se inhibió la reacción en ninguna de las 57 muestras procedentes de biopsias. Es posible que el exudado al ser una muestra más heterogénea contenga sustancias capaces de inhibir la reacción.

En nuestro estudio obtuvimos una prevalencia de PVH en un 23.8% en las lesiones (27 de 113), en el 37.9% en los condilomas (30 de 79) y 15.6% en zonas sin lesión (13 de 83). En total la prevalencia en este grupo ha sido de un 20.7% (57 de 275). El estudio de Strand A. et al es muy similar al nuestro en cuanto a los pacientes seleccionados y las zonas con lesión, condilomas o sin lesión<sup>101</sup>. También utiliza como método de detección PCR con iniciadores consenso o generales, encontrando una prevalencia de PVH en lesiones de un 54% (13 de 24), en condilomas de un 72% (13 de 18) y de 10% (9 de 89) en zonas sin lesión y en general en el grupo la prevalencia es de 26.7% (35 de 131). Este autor observa que la presencia de PVH fue menor en zonas que no presentaban lesión y mayor en zonas condilomatosas que en zonas con lesión. Estos resultados son similares a los nuestros aunque la prevalencia encontrada por nosotros es ligeramente inferior.

## *Discusión*

---

La prevalencia en nuestro grupo de pacientes es inferior a la encontrada en otros estudios revisados que utilizan iniciadores tipospecíficos, Grce M. et al<sup>102</sup> encuentra un 43% y Chabaurd M. et al<sup>103</sup> un 94%. Esto puede ser debido a diferencias geográficas en la distribución del virus y a que la mayoría de las muestras de estos estudios proceden de lesiones más severas.

En nuestro trabajo es importante destacar que existe un 15.6% de pacientes asintomáticos infectados. Estos pacientes no presentan signos claros de infección pero sí son sospechosos de estar infectados por diversos motivos: pareja de paciente infectado, alto número de parejas sexuales etc... Lo aconsejable sería diagnosticar la infección en estos pacientes (de alto riesgo) lo más precozmente posible, ya que pueden convertirse en un reservorio de infecciones latentes de PVH. Sería deseable establecer un "screening" de poblaciones asintomáticas de alto riesgo para infección por PVH utilizando como método PCR por su gran sensibilidad.

El genotipo más frecuente en nuestro estudio fue el PVH 6 por los dos métodos de tipación, sin embargo Strand A. et al<sup>101</sup> encontró con más frecuencia PVH indeterminado (21 de 35) utilizando como método de tipación la hibridación con sondas tipospecíficas para los tipos 6/11, 16, 18. En nuestro trabajo el número de indeterminados es menor por ambos métodos, aunque si tipamos con el método de hibridación con sondas (HS) nos aparecen más que con el de enzimas de restricción (ER) (24 de 70 y 10 de 70). Esta diferencia creemos que puede ser debida a errores en la interpretación de las bandas de ADN con el método de ER. Es posible que al tipar PVH 6 con ER hayamos confundido este tipo con otro diferente a PVH

## *Discusión*

---

11,16,18,33 que por “consenso” los denominamos indeterminados en material y métodos. Además hay infecciones mixtas tipadas con ER que aparecen como indeterminados con HS, pensamos que quizás al haber varios tipos de PVH coexistiendo en la misma muestra dificulte de alguna manera, la unión de la sonda utilizada en ese momento.

Por otra parte, Strand A. et al<sup>101</sup> en su trabajo encontraron sólo 2 infecciones mixtas de 35 y nosotros utilizando el método de HS 5 y por ER 15 de 70. Tuvimos un porcentaje un poco mayor aunque hubo infecciones mixtas que sólo se detectaron por una técnica, se detectaron más utilizando el método de ER.

Chen S. et al<sup>104</sup> comparan dos métodos para tipificar PVH: uno se basa en una amplificación del ADN de PVH seguido de la utilización de ER y el otro es “Southern Blot”, detectando más infecciones mixtas con ER al igual que en nuestro caso.

Aunque en nuestro estudio al comparar la tipación por ambos métodos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pensamos que el uso de las ER es un método fácil de aplicar en los laboratorios de rutina aunque requiere mucha experiencia en la interpretación de bandas de ADN ya que es muy subjetivo. Por el contrario la HS aunque más laborioso es un método más objetivo.

Diferentes autores también detectaron infecciones mixtas en sus estudios<sup>105,</sup>

<sup>102,106</sup>

## *Discusión*

---

Según Tachezy R. et al<sup>18</sup> encuentran 28 infecciones mixtas (16.4%) utilizando PCR seguido de “Dot blot” con sondas tipoespecíficas, siendo más frecuente este tipo de infecciones en biopsias que en exudados. Este autor cree que es debido a que las biopsias contienen mayor cantidad de material celular. Sin embargo nuestros resultados no coinciden con esto, ya que independientemente del método usado para tipar encontramos más infecciones mixtas en exudados que en biopsias, lo que demuestra de nuevo, que el exudado es una muestra tan válida como la biopsia en cuanto a la detección de PVH y su tipado.

Chabaurd et al<sup>103</sup> también encuentran infecciones mixtas y atribuyen su presencia a múltiples contactos sexuales y piensan que una acción sinérgica de los PVH de este tipo de infecciones podría contribuir al desarrollo de cánceres.

En la bibliografía se describe la prevalencia de infecciones mixtas en varios grados de lesiones, en este caso, en contraposición a lo anterior, son más frecuentes en lesiones más benignas y disminuyen con el aumento de la severidad de la lesión. Chang DY. et al<sup>106</sup> observaron que la infección con un sólo tipo de PVH es más frecuente en pacientes con carcinoma cervical. Nosotros hemos encontrado más infecciones mixtas en condilomas que en lesiones y en menor cantidad en zonas sin lesión.

Queremos señalar que no podemos comparar con otros autores el número de PVH indeterminados, pues la mayoría de ellos señalan al PVH indeterminado como un PVH que aún no ha sido secuenciado y por lo tanto no determinado su tipo. Sin embargo, en nuestro trabajo, sólo se han usado sondas para distinguir PVH 6,

## ***Discusión***

---

11, 16, 18 y 33. Por ello, con las ER no se han buscado otros tipos, denominando indeterminado al resto de los tipos detectados.

### 5.2. PACIENTES VIH POSITIVOS SOSPECHOSOS O CON RIESGO DE INFECCIÓN POR *Papillomavirus*

Al igual que en el grupo de estudio anterior, no se observaron diferencias con respecto al sexo en cuanto la detección de PVH, aunque la mayoría de las muestras procedían de hombres.

Sin embargo en este grupo, el porcentaje de inhibición es más alto que en el grupo anterior. Lo que puede ser debido a que la totalidad de estas muestras son exudados y puede ser que este tipo de muestra contenga mayor número de sustancias capaces de inhibir la PCR.

Con respecto a la prevalencia, en nuestro estudio obtuvimos un 60% en las lesiones (9 de 15), en un 90% en los condilomas (27 de 30) y un 27.7% en zonas sin lesión (5 de 18). En total la prevalencia en este grupo ha sido de un 65.1% (41 de 63).

Voltz JM.et al<sup>107</sup> utilizan el examen clínico y la hibridación "in situ" en población masculina VIH+ encontrando una prevalencia de 16% que es menor que la nuestra. Sin embargo Goncalves MA. et al<sup>108</sup>, en mujeres VIH+, utilizando PCR encuentra una prevalencia de un 80.8% y Ferrera A. et al<sup>109</sup> obtiene un 56% en un trabajo similar. Esta variación de la prevalencia en pacientes VIH+ puede ser debida a variaciones geográficas o por diferencias en la metodología utilizada en los estudios.

Encontramos un 27.7% de pacientes asintomáticos infectados que no presentan signos claros de infección, sin embargo son considerados como de alto

## *Discusión*

---

riesgo para la infección por PVH, no sólo por tener un sistema inmunológico defectuoso, sino porque además suelen tener unos hábitos de vida (promiscuidad sexual, relaciones homosexuales, drogadicción por vía parenteral etc...) que aumentarían el riesgo de infección por PVH. Estos pacientes se pueden convertir en un reservorio de infecciones latentes de PVH. Además, se ha observado que el número de casos de cáncer anal entre hombres solteros en San Francisco ha aumentado considerablemente con la epidemia del VIH<sup>110</sup>. Por lo tanto, creemos que se deberían establecer programas de "screening" para detectar posible infección por PVH en este tipo de poblaciones de alto riesgo, utilizando como método de detección PCR por su gran sensibilidad y, que debería de hacerse extensivo también para las mujeres VIH+ que pueden padecer lesiones cervicales preneoplásicas en el futuro.

No observamos predominio de algún tipo de PVH, sin embargo, hay varios autores que encuentran más frecuentemente PVH de alto riesgo oncogénico en pacientes VIH+<sup>107,108,111</sup>.

Encontramos que se tipa con más frecuencia el PVH 6 con el método de ER que con el de HS. Pensamos que esto puede ser debido a posibles errores en la interpretación de las bandas de ADN. Pudiendo confundir PVH 6 con un tipo indeterminado, ya que la gran mayoría de PVH tipados con ER corresponden con indeterminados por HS.

## *Discusión*

---

Con respecto a los PVH indeterminados e infecciones mixtas, se sigue la misma trayectoria que en el grupo anterior con respecto a los dos métodos utilizados.

Es interesante destacar que en las zonas que no presentaban lesión se encuentran PVH de alto riesgo oncogénico. Estos datos confirman la posible aparición de lesiones preneoplásicas en pacientes VIH+ que no presentan lesión.

En nuestro trabajo, se observó que la presencia de PVH en pacientes VIH+ (65.1%) es mayor que en pacientes VIH- (20.7%) debido probablemente al estado de inmunosupresión al que están sometidos estos pacientes, o puede ser como indica Kiviat N et al<sup>50</sup> que la infección por VIH favorezca la expresión del PVH a través de una interacción biológica entre los virus.

Varios autores observan una prevalencia de PVH mayor en pacientes VIH+ que en VIH-<sup>112,109,113,114,115</sup> al igual que nosotros en estudios anteriores<sup>116,117,118</sup>.

Hay autores que encuentran PVH de alto riesgo oncogénico y una mayor frecuencia de infecciones mixtas en pacientes VIH+ que en pacientes VIH-<sup>111,119</sup>. También nosotros encontramos un mayor porcentaje de infecciones mixtas en pacientes VIH+ por el método de ER.

## *Discusión*

---

A la vista de todos estos datos, si los extrapolamos a la población femenina VIH+, debemos tener en cuenta que tienen un aumento de la frecuencia de la infección por PVH y por lo tanto, resultantes anormalidades citológicas cervicales. Creemos que estas pacientes deberían ser sometidas a “screening” de rutina para detectar precozmente y poder tratar lo antes posible la infección por PVH.

### 5.3. PACIENTES VIH NEGATIVOS SIN SOSPECHA NI RIESGO DE INFECCIÓN POR *Papillomavirus*

Estos pacientes son considerados como grupo control para la infección por PVH. Todas las muestras procedían de mujeres (79) y es importante destacar que 53 estaban embarazadas.

El porcentaje de inhibición es similar al del grupo anterior. La totalidad de estas muestras son exudados y puede ser que este tipo de muestra contenga sustancias capaces de inhibir la PCR.

En nuestro estudio obtuvimos una prevalencia de PVH en este grupo de 8.9% ,más baja que la encontrada en las diferentes publicaciones que han utilizado PCR. Así, Kjaer SK. et al<sup>120</sup> encuentran un 15.4%, Torroella-Kouri M. et al<sup>94</sup> un 17%, Tachezy R. et al<sup>18</sup> un 23%, Agorastos T. et al<sup>121</sup> un 36.3% y Lambropoulos AF. et al<sup>122</sup> un 41.8%. Esto puede ser debido a diferencias geográficas en la distribución del virus o por variaciones en la metodología empleada.

## *Discusión*

---

En un trabajo de este tipo en población española la prevalencia oscila alrededor del 4%<sup>123</sup>. Las diferencias con nuestros datos podrían deberse, tal vez, a que esta investigación se llevó a cabo en una población cuya procedencia geográfica (diversas comunidades españolas) es mucho más heterogénea que la de nuestro estudio, limitado a la zona centro.

Sin embargo, Vizcaino MJ. et al<sup>124</sup>, en una comunicación personal, ha encontrado una prevalencia de 7.5% en Madrid que es muy similar a la nuestra.

En nuestro caso, la prevalencia de la infección por PVH en mujeres embarazadas fue de un 7.5%. Mazzatenta C. et al<sup>125</sup> obtienen una prevalencia de un 12% y Tenti P. et al<sup>126</sup> encuentran un 5.4% utilizando PCR. Sin embargo, Pakarian F. et al<sup>127</sup> encuentran un 65% y sugiere que el alto nivel de hormonas sexuales durante el embarazo, ejerce efectos supresores del sistema inmune haciendo que el cérvix sea más susceptible para la infección por PVH.

Al comparar la prevalencia entre mujeres embarazadas y no embarazadas hemos encontrado un estudio que utiliza PCR donde se encuentran radios similares de infección (9.6% y 10.9% respectivamente)<sup>128</sup>.

Algunos autores encuentran una prevalencia de infección más alta en embarazadas que en no embarazadas<sup>129</sup>, sugiriendo que el embarazo es un factor de riesgo independiente para la infección por PVH. Otros autores encuentran una prevalencia menor en mujeres embarazadas<sup>130</sup> o ninguna diferencia<sup>131,132</sup>.

## *Discusión*

---

En nuestro estudio la prevalencia entre mujeres embarazadas (7.5%) y no embarazadas (11.5%) es muy similar por lo que en nuestra opinión, y según nuestros datos, aunque las mujeres gestantes presenten un sistema inmunológico especial, el embarazo no parece implicar un aumento en el radio de la infección por PVH.

En este grupo sólo se encontró PVH tipo 16 comparándolo con la presencia de otros tipos (PVH 6,11,18,33), lo cual es importante de destacar ya que es un grupo supuestamente sin riesgo de infección por PVH y sin lesión aparente.

Varios autores encuentran PVH 16 de forma mayoritaria entre mujeres con cérvix normal<sup>18,76,133,134</sup>.

Teniendo en cuenta estos datos y como ya ha sido discutido con anterioridad, podemos encontrar entre la población infecciones latentes que pueden pasar desapercibidas y que pueden adquirir importancia por su posible asociación con tipos de PVH oncogénicos que están relacionados con el cáncer cervicouterino. Pensamos que un diagnóstico precoz basado en métodos de detección, puede llegar a prevenir estas enfermedades. Como alternativa, creemos que la PCR es un método con una alta sensibilidad y especificidad que debería tenerse en cuenta para futuros programas de "screening" ginecológicos.

En nuestro estudio, comparando los dos métodos de tipificación encontramos con más frecuencia PVH 16 con ER que con HS. Si nos centramos en este punto, la mayoría de PVH 16 tipados con ER corresponden con indeterminados con HS, por

## ***Discusión***

---

lo que pensamos que el método de ER es un método subjetivo y que requiere mucha experiencia para la interpretación de las bandas de ADN y asociarlas con los diferentes tipos de PVH. Creemos que en nuestro trabajo se podría confundir el PVH 16 con un tipo diferente a los tipos PVH 6,11,18,33 que por “consenso” hemos llamado PVH indeterminado.

## **VI. CONCLUSIONES**

## Conclusiones

---

A la vista de los datos obtenidos en nuestro estudio podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Todas las muestras positivas lo fueron por los dos métodos de amplificación, por lo que ambos métodos son igual de válidos para el diagnóstico de PVH.
2. El método de tipación con enzimas de restricción es fácil de aplicar en laboratorios de rutina aunque es subjetivo y requiere mucha experiencia en cuanto a la interpretación de las bandas de ADN.
3. La tipación llevada a cabo con sondas de hibridación es objetiva aunque muy laboriosa, por lo que podría utilizarse en laboratorios de rutina como método confirmatorio.
4. Un exceso de ADN en la muestra puede inhibir la reacción de PCR. Realizando diferentes diluciones de este ADN o diluyendo la muestra inicial, se pueden evitar estas inhibiciones.
5. La toma de muestras no invasiva también es útil para el diagnóstico de PVH, por lo que sería conveniente utilizar exudados como tipo de muestra a elegir para el estudio, ya que no se requieren técnicas cruentas para su obtención.

## Conclusiones

---

6. La prevalencia de PVH es similar en ambos sexos y puesto que la principal vía de transmisión del PVH es la sexual, se debería estudiar la pareja/as sexual/es de los pacientes infectados o con sospecha de infección por PVH.
7. La presencia de PVH es mucho mayor en pacientes coinfectados con VIH, debido probablemente al estado de inmunosupresión al que están sometidos estos pacientes y al alto grado de promiscuidad sexual que suelen presentar.
8. En lesiones condilomatosas, la presencia de PVH, es mayor que en zonas con otro tipo de lesión y menor en áreas no lesionadas.
9. El estado de gestación, a pesar de ser un periodo de inmunosupresión transitorio, no parece favorecer la infección por PVH.
10. Existen individuos asintomáticos, sospechosos de infección por PVH, que están infectados, lo cual es importante por el posible aumento de la prevalencia que esto conlleva y porque dichos individuos pueden convertirse en un reservorio de infecciones latentes de PVH. Sería aconsejable establecer un "screening" de poblaciones asintomáticas de alto riesgo para la infección por PVH.

## **Conclusiones**

---

- 11.** Se detectó PVH 16 entre las mujeres consideradas como grupo control. Encontramos por tanto, entre la población femenina no sospechosa de padecer infección por PVH infecciones latentes, lo cual puede ser importante por su posible asociación con tipos oncogénicos que están relacionados con el cáncer cervicouterino.
  
- 12.** La PCR por su gran sensibilidad es, particularmente, apropiada para el diagnóstico y tipificación de PVH en poblaciones asintomáticas que pueden portar infecciones latentes y subclínicas que pasan desapercibidas.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

## **Bibliografía**

---

1. Ciuffo G. *Imnfesto positivo con filtrato di verruca volgare*. Giorn Ital Mal Venereol 1907; 48: 12-17.
2. Shope R. *Infectious papillomatosis of rabbits*. J Exp Med 1933; 58: 607-624.
3. Kidd JG, Rous P. *A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form*. J Exp Med 1940; 71: 813-837.
4. Rous P, Kidd JG. *The carcinogenic effect of a virus upon tarded skin*. Science 1936; 83: 468-469.
5. Ito Y, Evans CA. *Induction of tumors in domestic rabbits with nucleic acid preparations from partially purified Shope papillomavirus and from extracts of papillomas of domestic and cottontail rabbits*. J Exp Med 1961; 114: 485-500.
6. Rowson KEK, Mahy BWJ. *Human papovavirus*. Bacteriol Rev 1967; 31: 110-131.
7. Gissman L, Pfister H, Zur Hausen H. *Human papillomaviruses: Characterization of four different isolates*. Virology 1977; 76: 569-580.
8. Orth G, Faure M, Croissant O. *Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts*. J Virol 1977; 24: 108-120.

## **Bibliografía**

---

9. Crawford LV, Crawford EM. *A comparative study of polyoma and papilloma viruses*. Virology 1963; 21: 258-263.
10. Howley PM. *General and molecular biology of papillomaviruses*. In: *Herpes and papillomaviruses*. Serono Symposio. New York. Raven Press. 1988; 2: 41-52.
11. Lambert PF, Spalholz BA , Howley PM. *A transcriptional repressor encoded by B.P.V.1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator*. Cell 1987; 50: 69.
12. Bruce A, Lewine AJ, Howley PM. *Association of human papillomavirus type 16 and 18, E6 proteins with p53*. Science 1990; 248: 76-79.
13. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. *The human papillomavirus 16. E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. Science 1989; 243: 934-937.
14. Mc Dougall JK. *HPV immortalization and transformation* . Papillomavirus Rep 1990; 1(3): 1-4.
15. Kanda T, Furuno A, Yoshiike K. *Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 341 cells*. J Virol 1988; 62: 610.

## **Bibliografía**

---

16. Mc Cance DJ. *Papillomaviruses*. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, editors. Principles and practice of clinical virology. England. John Wiley & Sons Ltd. 2000: 607-618.
  
17. Law MF, Lancaster WD, Howley PM. *Conserved sequences among the genomes of papillomaviruses*. J Virol 1979; 32: 199-207.
  
18. Tachezy R, Hamsíkova E, Hájek T, Mikysková I, Smahel M, Van Ranst M et al. *Human Papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16,18 and 33 virus-like particles*. J Med Virol 1999; 58: 378-386.
  
19. Stoler MH, Broker TR. *In situ hybridization detection of human papillomavirus DNA and messenger RNA in genital condylomas and cervical carcinoma*. Human Pathol 1986; 17: 1250-1258.
  
20. Amtmann E, Saver G. *Bovine papillomavirus transcription: Polyadenylated RNA species and assessment of the direction of transcription*. J Virol 1982; 43: 59-66.
  
21. Howley PM. *Papillomavirinae: The viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fundamental Virology. Philadelphia. Lippincott-Raven publishers. 1996: 947-978.

## **Bibliografía**

---

22. Howley PM. *Papillomavirinae and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM et al, editors. *Virology*. New York. Raven Press, Ltd. 1990; 2: 1625-1650.
23. Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. *The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to adenovirus E1A*. *Cell* 1988; 53: 539-547.
24. Law MF, Lowy DR, Dvoretzky I, Howley PM. *Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2717-2731.
25. Lowy DR, Dvoretzky I, Shober R, Law MF, Engel L, Howley PM. *"In vitro" tumorigenic transformation by a defined subgenomic fragment of bovine papillomavirus DNA*. *Nature* 1980; 287: 72-74.
26. Durst M, Dzarlieva-Pertrusezza P, Bovkam PP, Fusening NE, Gissman L. *Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA*. *Oncogene* 1987; 1: 251-256.
27. Schlegel R, Phelps WC, Zhang YL, Barbosa M. *Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma*. *EMBO J* 1988; 7: 3181-3187.

## **Bibliografía**

---

28. US. Department of Health and Human Services. *Sexually transmitted disease statistics, 1985*. Issue No .135. Public Health Service. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control, 1987.
  
29. Oriel J. *Natural history of genital warts*. Br J Vener Dis 1971; 47: 1-13.
  
30. Meisels A, Fortin R, Roy M. *Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study*. Acta Cytol 1977; 21: 379-390.
  
31. Reid R, Lavery C, Coppleson M, Isarangkul W, Hills E. *Noncondylomatous cervical wart virus infection*. Obstet Gynecol 1980; 55 : 476-483.
  
32. Meisels A, Morin C, Casas-Cordero M. *Human papillomavirus infection of the uterine cervix*. Int J Gynecol Pathol 1982; 1: 75-94.
  
33. Fife KH, Rogers RE, Zwickl BN. *Symptomatic and asymptomatic cervical infections with human papillomavirus during pregnancy*. J Infect Dis 1987; 156: 904-911.
  
34. Schneider A, Hotz M, Gissman L. *Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women*. Int J Cancer 1987; 40: 198-201.

## **Bibliografía**

---

35. Rudlinger R, Smith IW, Bunney MH, Hunter JA. *Human papillomavirus infections in a group of renal transplant recipients*. Br J Dermatol 1986; 115:681-692.
36. Kataja V, Syrjänen K, Mäntyjärvi R, Väyrynen M, Syrjänen S, Saarikoski S et al. *Prospective follow-up of cervical HPV infections. Life table analysis of histopathological, cytological and colposcopic data*. Eur J Epidemiol 1989; 5: 1-8.
37. Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L. *Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid "in situ" hybridization*. Obstet Gynecol 1984; 64: 767-772.
38. Mc Cance DJ, Champion MJ, Clarkson PK, Chester PM, Jenkins D, Singer A et al. *The relevance of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix*. Br J Obstet Gynecol 1985; 92: 1101-1105.
39. Champion MJ. *Human cervical papillomavirus infection: a clinical perspective*. In: Muñoz N, Bosch FX, Jensen OM, editors. *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lyon, France. IARC Scientific Publications. 1989: 41-65.
40. Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. *The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors*. J Gen Virol 1985; 66: 1515-1522.

## **Bibliografía**

---

41. Zur Hausen H. *Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer*. *Virology* 1991; 184: 9-13.
  
42. Zur Hausen H, Schlehofer JR. *The role of DNA amplification in tumor development. Prospects from virological studies*. In: Zur Hausen H, Schlehofer JR, editors. *Accomplishments in oncology*. Lippincott. 1987: 1-8.
  
43. Pilon L, Royal A, Langelier Y. *Increased mutation frequency after herpes simplex virus type 2 infection of non-permissive xc cells*. *J Gen Virol* 1985; 66: 259-265.
  
44. Schlehofer JR, Zur Hausen H. *Induction of mutations within the host cell genome by partially inactivated herpes simplex virus type 1*. *Virology* 1982; 122: 471-475.
  
45. Schmitt J, Mergener K, Gissmann L, Schlehofer JR, Zur Hausen H. *Amplification of bovine papillomavirus DNA by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, UV-irradiation, or infection by herpes simplex virus*. *Virology* 1989; 172: 73-81.
  
46. Peto R. *Introduction: Geographic patterns and trends*. In: Peto R, Zur Hausen H, editors. *Viral etiology of cervical cancer*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1986: 3-15.

## **Bibliografía**

---

47. Hoffmann JD, Hecht SS, Haley NJ, Brunnemann KD, Adams JD, Wynder E. *Tumorigenic agents in tobacco products and their uptake by chewers, smokers and non-smokers*. J Cell Biochem (suppl) 1985; 9C: 33.
48. Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshontri H, Pater A. *Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 and not type 11 human papillomavirus DNA*. Nature 1988; 335: 832-834.
49. Alloub MA, Hudson JB, Gelub TR, Turyk ME, Hosken M, Wilbanks GD et al. *Amplification of human papillomavirus genomes "in vitro" is dependent on epithelial proliferation*. J Virol 1991; 65: 2254-2260.
50. Kiviat N, Rompalo A, Bowden R, Galloway D, Corey L, Roberts PL et al. *Anal human papillomavirus infection among human immunodeficiency virus-seropositive and seronegative men*. J Infect Dis 1990; 162: 358-361.
51. Buckley JD, Harris RW, Doll R, Vessey MP, Williams PT. *Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri*. Lancet 1981; 2: 1010-1015.
52. Tidy JA, Vousden KH, Farrel PJ. *Relation between infection with a subtype of PVH 16 and cervical neoplasia*. Lancet 1989; I: 1225-1227.

## **Bibliografía**

---

53. Young SL, Bevan IS, Johnson MA, Blomfield PI, Bromidge T, Maitland NJ et al. *The polymerase chain reaction: a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection.* Br Med J 1989; 298: 14-18.
54. Kiviat NB, Koustsky LA, Paavonen JA, Galloway DA, Critchlow CW, Beckmann AM et al. *Prevalence of genital papillomavirus infection among women attending a college student health clinic or a sexually transmitted disease clinic.* J Infect Dis 1989; 159(2): 293-302.
55. Kjaer SK, de Villiers EM, Haugaard BJ, Christensen RB, Teisen C, Moller KA et al. *Human papillomavirus, herpes simplex virus and cervical cancer incidence in Greenland and Denmark. A population-based cross-sectional study.* Int J Cancer 1988; 41(4): 518-524.
56. Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. *Epidemiology of genital human papillomavirus infection.* Epidemiol Rev 1988; 10: 122-162.
57. Meisels A, Roy M. *Condylomatous lesions of cervix and vagina. I. Cytologic patterns.* Acta Cytol 1976: 2005-2009.
58. Koss LG. *Cytologic and histologic manifestations of human papillomavirus infection of the female genital tract and their clinical significance.* Cancer 1987; 60: 1942-1950.

## **Bibliografía**

---

59. Meisels A, Morin C, Casas - Cordero M. *Human papillomavirus infection of the uterine cervix*. Int J Gynec Pathol 1982; 1: 75.
60. Mitchell H, Drake M, Medley G. *Prospective evaluation of risk of cervical cancer after cytologic evidence of human papillomavirus*. Lancet 1986; 1: 573.
61. Richart EM, Ferenczy A, Meisels A, Syrjänen KJ, Zur Hausen H. *Exploring the link between condilomata virus and cervical cancer*. Diagn Med 1984: 31-35.
62. DHSS. Sexually transmitted diseases. *Extract from the annual report of the chief medical officer of the department of health and social security for the year 1977*. Br J Vener Dis 1979; 55: 225-229.
63. DHSS. Sexually transmitted diseases. *Extract from the annual report of the chief medical officer of the department of health and social security for the year 1979*. Br J Vener Dis 1981; 57: 402.
64. DHSS. Sexually transmitted diseases. *Extract from the annual report of the chief medical officer of the department of health and social security for the year 1983*. Geniturin Med 1985; 61: 204.
65. De Brux J. *Epidémiologie et évolution des lésions HPV*. Nouv Dermatol 1989; 8: 271.

## **Bibliografía**

---

66. Syrjänen K. *Infecciones de transmisión sexual por papillomavirus humano (HPV): Evaluación de su historia natural y significación clínica*. *Enf Trans Sex* 1987; 1: 7.
67. Olmos L. *Condilomas acuminados (verrugas genitales). I. II*. *Enf Trans Sex* 1990; 4: 73-81, 131-142.
68. Puig - Tintore LM, Jou Collel P. *Carcinogénesis del cuello uterino. Papel del papillomavirus humano (HPV)*. *Enf trans Sex* 1988; 2: 67.
69. Singer A, Phil D. *Epidemiological feature of lower genital tract neoplasia. Genitoanal papillomavirus infection*. Geo Von Krogh & Eva Rylander. 1989: 235-259.
70. Cisterna R, Gallego L, Arrese E, Basaras M. *Poxvirus, adenovirus, papillomavirus y parvovirus*. En: García-Rodríguez JA, Picazo JJ, editores. *Microbiología Médica*. Madrid. Mosby/Doyma libros, S.A. 1996; 1: 439-451.
71. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. *Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
72. Mullis KB, Faloona FA. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.

## **Bibliografía**

---

73. Syrjänen S, Syrjänen K. *Human papillomavirus infections of the genital tract: Clinical significance and diagnosis by polymerase chain reaction*. In: Becker Y, Darai G, editors. *Diagnosis of human viruses by polymerase chain reaction technology 1992*: 185-207.
74. Manos M, Lee K, Greer C, Waldman J, Kiviat N, Holmes K et al. *Looking for human papillomavirus type 16 by PCR*. *Lancet* 1990; 24: 734.
75. Syrjänen SM, Saastamoinen J, Chang F, Ji H, Syrjänen K. *Colposcopy, punch biopsy, "in situ" DNA hybridization and the polymerase chain reaction in searching for genital human papillomavirus (HPV) infections in women with normal PAP Smears*. *J Med Virol* 1990; 31: 259-266.
76. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J et al. *Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method*. *JAMA* 1991; 265: 472-477.
77. Evander M, Wadell G. *A general primer pair for amplification and detection of genital human papillomavirus types*. *J Virol Methods* 1991; 31: 239-250.
78. Gregoire L, Arella M, Campione-Piccaro J, Lancaster WD. *Amplification of human papillomaviruses DNA sequences by using conserved primers*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2660-2665.

## **Bibliografía**

---

- 79.** Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. *Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses.* Cancer cells 1989; 7: 209-214.
- 80.** Van der brule AJC, Meijer CJLM, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JMM. *Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol 1990; 28: 2739-2743.
- 81.** Greer CE, Peterson SL, Kiviat N, Manos MM. *PCR amplification from paraffin-embeddeb tissue.* Am J Clin Pathol 1991; 95: 117-124.
- 82.** Wright DK, Manos MM. *Sample preparation from paraffin-embeddeb tissues.* In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego. Academic Press. 1990: 153-159.
- 83.** García de Lomas L, Catalán V. *Amplificación de ADN (polymerase chain reaction: PCR) en el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual.* Enf Trans Sex 1990; 4(4): 187-193.

## **Bibliografía**

---

- 84.** Gravitt PE, Manos MM. *Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA*. In: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, editors. *The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus*. Lyon, France. IARC Scientific Publications 1992: 121-133.
- 85.** Kawasaki ES. *Sample preparation from blood, cells and other fluids*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JJ, editors. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego. Academic Press. 1990: 160-169.
- 86.** Beutner KR, Ferenczy A. *Therapeutic approaches to genital warts*. *Am J Med* 1997; 102 (5 A ): 28-37.
- 87.** Coutlee F, Mayrand MH, Provencher D, Franco E. *The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research*. *Clin Diagn Virol* 1997; 8 (2): 123-141.
- 88.** Trofatter KJ Jr. *Diagnosis of human Papillomavirus genital tract infection*. *Am J Med* 1997; 102 (5 A ): 21-27.
- 89.** Beutner KR, Tyring S. *Human Papillomavirus and human disease*. *Am J Med* 1997; 102 (5 A): 9-15.

## **Bibliografía**

---

- 90.** Evander M, Edlung K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R et al. *Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human Papillomavirus infection in young swedish women.* J Clin Microbiol 1992; 30(4): 987-992.
- 91.** Suárez A, Pérez C, Sánchez-Nuñez F, Pérez J, Picazo JJ. *Diagnosis and typing of human Papillomavirus (HPV) in genital samples.* International Congress of Sexually Transmitted Diseases. Seville, Spain, 1997.
- 92.** Suárez A, Pérez C, Sánchez F, Pérez J, Picazo JJ. *Detección y tipado de Papillomavirus en muestras genitales.* VII Congreso SEIMC. Torremolinos. 1996.
- 93.** de Sanjose S, Bosch XF, Muñoz N, Chichareon S, Ngelangel C, Balaguero L et al. *Screening for genital human Papillomavirus: results from an international validation study on human Papillomavirus sampling techniques.* Diagn Mol Pathol 1999; 8 (1): 26-31.
- 94.** Torroella - Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M et al. *HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes.* Gynecol Oncol 1998; 70 (1): 115-120.
- 95.** Gjoen K, Siebke M, Flikke R, Häger G, Ertzeid A, Halsos J et al. *Genital human Papillomavirus infection in Oslo studied by dot blot DNA hybridization and the polymerase chain reaction.* J Med Virol 1991; 34: 159-164.

## **Bibliografía**

---

- 96.** Margall N, Matías - Guiu X, Chillón M, Coll P, Alejo M, Nunes V et al. *Detection of human Papillomavirus 16 and 18 DNA in epithelial lesions of the lower genital tract by in situ hybridization and polymerase chain reaction: cervical scrapes are not substitutes for biopsies.* J Clin Microbiol 1993; 31 (4): 924-930.
- 97.** Barraso R. *Latent and subclinical HPV external anogenital infection.* Clin Dermatol 1997; 15(3): 349-353.
- 98.** Koutsky L. *Epidemiology of genital human Papillomavirus infection.* Am J Med 1997; 102(5A): 3-8.
- 99.** Chuang TY, Perry HO, Kurland LT, Ilstrup DM. *Condyloma acuminatum in Rochester, Minn. 1950-1978.* Arch Dermatol 1984; 120: 469-475.
- 100.** DHSS. Sexually transmitted diseases. Extract from the annual report of the chief medical officer of the department of health and social security for the year 1982. Br J Vener Dis 1984; 60: 199-203.
- 101.** Strand A, Rylander E, Evander M, Wadell G. *Genital human Papillomavirus infection among patients attending an STD clinic.* Genitourin Med 1993; 69: 446-449.

## **Bibliografía**

---

- 102.** Grce M, Husnjak K, Magdic L, Ilijas M, Zlacki M, Lepusic D et al. *Detection and typing of human Papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of croatian women with abnormal cytology.* Eur J Epidemiol 1997; 13(6): 645-51.
- 103.** Chabaurd M, Le Cann P, Mayelo V, Leboulleux D, Diallo AS, Enogat N et al. *Detection by PCR of human Papillomavirus genotypes in cervical lesions of senegalese women.* J Med Virol 1996; 49: 259-263.
- 104.** Chen S, Tabrizi SN, Fairley CK, Borg AJ, Garland SM. *Simultaneous detection and typing strategy for human Papillomaviruses based on PCR and restriction endonuclease mapping.* Biotechniques 1994; 17(1): 138-140.
- 105.** Martinez A, Nás R, La cruz C, Hellín T, Tercero JC, Valverde E, et al. *Detección y tipado de Papilomavirus humano por amplificación genómica en biopsias, frotis y orina.* Acta Gin 1995; 2: 51.
- 106.** Chang DY, Chen RJ, Lee SC, Huang SC. *Prevalence of single and multiple infection with human Papillomaviruses in various grades of cervical neoplasia.* J Med Microbiol 1997; 46(1): 54-60.

## **Bibliografía**

---

- 107.** Voltz JM, Drobacheff C, Derancourt C, Coumes-Marquet S, mougin C, Laurent R. *Papillomavirus induced anogenital lesions in 121 HIV seropositive men. Clinical, histological, viral study, and evolution.* Ann Dermatol Venereol 1999; 126(5): 424-429.
- 108.** Goncalves MA, Massad E, Burattini MN, Villa LL. *Relation ship between human Papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, Sao Paulo, Brazil.* Int J STD AIDS 1999; 10(12): 803-807.
- 109.** Ferrera A, Melchers WJ, Velema JP, Figueroa M. *Association of infections with human immunodeficiency virus and human Papillomavirus in Honduras.* Am J Trop Med Hyg 1997; 57(2): 138-141.
- 110.** Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Lamborn K, Hollander H. *Natural history of anal cytologic abnormalities and Papillomavirus infection among homosexual men with group IV HIV disease.* J Acquir Immune Defic Syndr 1992; 5: 1258-1265.
- 111.** Unger ER, Vernon SD, Lee DR, Miller DL, Sharma S, Clancy KA et al. *Human Papillomavirus type in anal epithelial lesions is influenced by human immunodeficiency virus.* Arch Pathol Lab Med 1997; 121(8): 820-824.
- 112.** Hagensee ME, Kiviat N, Critchlow CW, Hawes SE, Kuypers J, Holte S. *Seroprevalence of human Papillomavirus types 6 and 16 capsid antibodies in homosexual men.* J Infect Dis 1997; 176(3): 625-631.

## **Bibliografía**

---

- 113.** Cu-Uvin S, Hogan JW, Warren D, Klein RS, Peipert J, Schuman P et al. *Prevalence of lower genital tract infections among human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. HIV epidemiology research study group.* Clin Infect Dis 1999; 29(5): 1145-1150.
- 114.** Kuhn L, Sun XW, Wright TC Jr. *Human immunodeficiency virus infection and female lower genital tract malignancy.* Curr Opin Obstet Gynecol 1999; 11(1): 35-39.
- 115.** Chopra KF, Tying SK. *The impact of the human immunodeficiency virus on the human Papillomavirus epidemic.* Arch Dermatol 1997; 133(5): 629-633.
- 116.** Suárez A, Pérez C, Rodríguez-Avial I, Sánchez-Nuñez F, Picazo JJ. *Detection and typing of genital human Papillomavirus (PVH).* International Congress of Sexually Transmitted Diseases. Seville, Spain, 1997.
- 117.** Suárez A, Pérez C, Rodríguez-Avial I, García A, Sánchez-Nuñez F, Picazo JJ. *Diagnóstico de Papillomavirus humanos en muestras genitales.* VIII Congreso SEIMC. Palma de Mallorca. 1998.
- 118.** Suárez A, Pérez C, Rodríguez-Avial I, García A, Sánchez-Nuñez F, Picazo JJ. *Human Papillomavirus: Detection and typing of genital samples.* 38<sup>th</sup> ICAAC. San Diego, California, 1998.

## **Bibliografía**

---

- 119.** Williams AB, Darragh TM, Vranizan K, Ochia C, Moss AR, Palefsky JM. *Anal and cervical human Papillomavirus infection and risk of anal and cervical epithelial abnormalities in human immunodeficiency virus-infected women.* *Obstet Gynecol* 1994; 83(2): 205-211.
- 120.** Kjaer SK, Van-den-brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME et al. *Determinants for genital human Papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and no oncogenic HPV types?.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6(10): 799-805.
- 121.** Agorastos T, Bontis J, Lambropoulos AF, Constantinidis TC, Nasioutziki M, Tagou C et al. *Epidemiology of human Papillomavirus infection in greek asymptomatic women.* *Eur J Cancer Prev* 1995; 4(2): 159-167.
- 122.** Lambropoulos AF, Agorastos T, Frangoulides E, Karahaliou R, Bontis J, Dozi-vassiliades I. *Detection of human Papillomavirus using the polymerase chain reaction and typing for HPV 16 and 18 in the cervical smears of greek women.* *J Med Virol* 1994; 43: 228-230.

## **Bibliografía**

---

- 123.** De Sanjose S, Santamaría M, Alonso de Ruiz P, Aristizabal N, Guerrero E, Castellsague X et al. *HPV types in women with normal cytology*. En: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, editores. *Epidemiology of cervical cancer*. IARC 1992: 75-84.
- 124.** Vizcaino MJ, García Moreno A, Herruzo R. *Epidemiologic study of the Papillomavirus (HPV), micoplasma hominis (MH), ureaplasma urealiticum (UU) and clamidia tracomatis (CT) infections in the Madrid area*. International congress of sexually transmitted diseases. Seville, Spain, 1997.
- 125.** Mazzatenta C, Fimian M, Rubegni P, Andreassi L, Buffi P, Messina C. *Vertical transmission of human Papillomavirus in cytologically normal women*. *Genitourin Med* 1996; 72(6): 445-446.
- 126.** Tenti P, Zappatore R, Migliora P, Spinillo A, Maccarini U, De Benedittis M et al. *Latent human Papillomavirus infection in pregnant women at term: a case-control study*. *J Infect Dis* 1997; 176(1): 277-280.
- 127.** Pakarian F, Kaye J, Cason J, Kell B, Jewers R, Derios NW et al. *Cancer associated human Papillomaviruses: perinatal transmission and persistence*. *Br J Obstet Gynecol* 1994; 101(6): 514-517.

## **Bibliografía**

---

- 128.** De Roda Husman AM, Walboomers JMM, Hopman E, Bleker OP, Helmerhorst TM, Rozendoal L et al. *HPV prevalence in cytomorphologically normal cervical scrapes of pregnant women as determined by PCR: the age-related pattern.* J Med Virol 1995; 46(2): 97-102.
- 129.** Fife KH, Katz BP, Roush J, Handy VD, Brown DR, Hansell R. *Cancer associated human Papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy.* Am J Obstet Gynecol 1996; 174: 1487-1493.
- 130.** Peng TC, Searle CP, Shah KV, Repke JT, Johnson TRB. *Prevalence of human Papillomavirus infections in term pregnancy.* Am J Perinatol 1990; 7: 189-192.
- 131.** Smith EM, Johnson SR, Jiang D, Zaleski S, Lynch CF, Brundage S et al. *The association between pregnancy and human Papillomavirus prevalence.* Cancer Detect Prev 1991; 15(5): 397-402.
- 132.** Chang - Claude J, Schneider A, Smith E, Blettner M, Wahrendorf J, Turek L. *Longitudinal study of the effects of pregnancy and other factors on detection of HPV.* Gynecol Oncol 1996; 60: 355-362.

## **Bibliografía**

---

- 133.** Czegledy J, Rylander E, Evander M, Wadell G. *Relation between the presence of human Papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in cervicovaginal cells and general health condition.* Am J Obstet Gynecol 1993; 169(2 pt 1): 386-388.
- 134.** Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB et al. Epidemiologic evidence showing that human Papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst 1993; 85(12): 958-964.