

M<sup>a</sup> Isabel Cour Bóveda, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

**INFORMA:**

Que el trabajo titulado "DETECCION DE ADN DE PAPILOMAVIRUS HUMANOS (PVH) EN EPITELIOS DE TRACTO GENITAL FEMENINO", realizado bajo su dirección por M<sup>a</sup> Encarnación Fernández Contreras, Licenciada en CC. Biológicas, cumple todos los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral.

Madrid, 27 de Septiembre de 1992

*[Handwritten signature]*

M. I. Cour

LA RUTORA

*[Handwritten signature]*  
M<sup>a</sup> Encarnación Fernández Contreras



R. 21.861

## AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, por sus años de sacrificio y por su apoyo, sin los que jamás hubiera podido llegar hasta donde estoy.
- A la Prof. Dra. D<sup>a</sup> Isabel Cour Bóveda, por brindarse amablemente a dirigir este trabajo.
- Al Prof. Dr. D. Eduardo López de la Osa, por el entusiasmo con que ha apoyado siempre esta investigación.
- A los Dres. M. Rejas, J.A. Martínez, M. Prados, J.A. Pérez-Moro, R. Abildua, M. Herraiz, I. Cristóbal y al Prof. J.A. Vidart por su amabilidad al aportar las muestras objeto de este estudio.
- Al Dr. J.A. Martínez, por su inestimable ayuda en el análisis estadístico de los resultados.
- A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Inés Antón, Luisa Palau y Belén Martínez, que compartieron conmigo los primeros pasos en esta investigación, y a Valle Yagüe y Diana Nigro, por su colaboración en el procesamiento de parte de las muestras incluidas en la misma.
- A D. Jesús M<sup>a</sup> Rodríguez Losas, por la realización (desinteresada y "contra-reloj") de los gráficos incluidos en este trabajo.

- A los Dres E.-M. de Villiers y T. Kahn del Instituto Alemán de Investigación del Cáncer (DKFZ) de Heidelberg, Alemania, por su asesoramiento científico y técnico.
  
- Y, muy especialmente, a Julio, mi marido, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles y, además, por su colaboración en parte de la transcripción del texto.

En resumen, y como, inevitablemente, me olvidaré de alguien, a todos aquellos que, de una forma u otra, han hecho posible la realización de este trabajo.

Esta tesis está dedicada a todos los que me apoyaron en mis peores momentos y creyeron en mí, incluso cuando yo dejaba de hacerlo.

\* A mi familia:

- . A Julio, mi marido
- . A mis padres y a mi hermana, que inicia este año sus estudios universitarios
- . A Mari Tere, mi madre política

\* A mis compañeros de laboratorio y, muy especialmente, a Inés Antón.

\* A quienes me brindaron su apoyo "desde más lejos" y no pudieron ver terminado este trabajo:

- . a mis abuelos
- . a D. Germán Burriel Rodríguez
- . y, muy especialmente, a mi tío Dionisio

## INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>A. INTRODUCCION GENERAL</b>	
INTRODUCCION	1
HISTORIA	2
SISTEMATICA Y CLASIFICACION	5
I. Sistemática	5
II. Clasificación de los Papilomavirus	
Humanos (PVH)	8
1. PVH cutáneos	
2. PVH mucosos	
3. PVH mucosos y cutáneos	
ESTRUCTURA	11
ORGANIZACION GENETICA	13
MULTIPLICACION VIRAL	16
I. Replicación	16
1. Replicación plasmídica	
2. Replicación vegetativa	
II. Transcripción	21
TRANSFORMACION	27
I. Ensayos de transformación <i>in vitro</i>	27
II. Genes transformantes	29
1. Gen E5	
2. Genes E6 y E7	
III. Secuencias con influencia indirecta	31

EPIDEMIOLOGIA Y PATOGENIA	32
I. Infecciones cutáneas	34
1. Verrugas epidérmicas	
2. Epidermodisplasia verruciforme (EV)	
II. Infecciones respiratorias	35
1. Papilomas laríngeos	
2. Papilomas nasales	
III. Infecciones orales	36
1. Hiperplasia epitelial focal	
IV. Papilomas conjuntivos	38
V. Infecciones genitales	38
1. Verrugas anogenitales (condilomas)	
2. Neoplasia intraepitelial (CIN)	
3. Cáncer cervical	
DIAGNOSTICO	45
I. Técnicas inmunohistoquímicas	45
II. Detección de ácidos nucleicos	45
1. <i>Southern-blot.</i>	
2. <i>Dot-blot.</i>	
3. Hibridación <i>in situ</i>	
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
TRATAMIENTO Y PROFILAXIS	49
1. Agentes citotóxicos	
2. Métodos destructivos	
3. Interferón.	

## **B. APORTACION PERSONAL**

<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>50</b>
<b>I. Pacientes y muestras</b>	<b>50</b>
1. Pacientes	
2. Muestras	
<b>II. Técnicas</b>	<b>51</b>
1. Extracción de ADN	
2. PCR	
3. Identificación de genotipos de PVH	
<b>III. Análisis estadístico</b>	<b>56</b>
 <b>RESULTADOS</b>	 <b>60</b>
<b>I. Método</b>	<b>60</b>
<b>II. Datos obtenidos</b>	<b>60</b>
1. Grupo Normal	
2. Grupo Patológico	
 <b>DISCUSION</b>	 
<b>I. Técnica</b>	<b>79</b>
<b>II. Datos obtenidos</b>	<b>79</b>
1. Grupo Normal (GN)	<b>79</b>
2. Grupo Patológico (GP)	<b>81</b>
 <b>CONCLUSIONES</b>	 <b>89</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>93</b>

Los datos obtenidos en numerosas investigaciones ponen de manifiesto la existencia de una clara asociación entre la aparición en el tracto genital femenino de alteraciones de diverso grado de malignidad y la presencia de virus del género *Papillomavirus*. Además, se ha correlacionado la severidad de las lesiones producidas con el genotipo infectante, identificable únicamente mediante métodos de detección de ácidos nucleicos, entre los que destaca por su sensibilidad la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada recientemente.

La práctica inexistencia en nuestro país de estudios sobre prevalencia y distribución de genotipos de Papilomavirus Humanos (PVH) nos ha llevado a realizar el presente trabajo, con el fin de conocer la frecuencia de aparición de estos virus en mujeres de nuestro medio con y sin alteraciones en el epitelio genital y su influencia en la aparición de las mismas.



El caracter infeccioso de las verrugas humanas se sospechaba desde hace siglos, pero fue Ciuffo, en 1907, quien estableció por primera vez la naturaleza viral de estos tumores al demostrar su transmisión a través de filtrados acelulares. En 1933 Richard Shope describió el primer papilomavirus, reconociéndolo como agente etiológico de la papilomatosis cutánea del conejo de cola de algodón, el CRPV (del inglés *Cottontail Rabbit Papillomavirus*). Este virus, que aparece habitualmente en los papilomas cutáneos de esta raza de conejos, producía lesiones análogas en el conejo doméstico que progresaban hacia la malignidad en la mayoría de los casos. Este fue el primer ejemplo experimental de la producción de cáncer en mamíferos por parte de un virus ADN oncógeno. Además, a partir del estudio de Shope se dedujeron las propiedades más importantes de la acción de los virus ADN oncógenos (1):

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

Las descripciones morfológicas del virión llegaron con el uso generalizado del microscopio electrónico (2). Sin embargo,

si éste se observaba fácilmente en algunos tipos de verrugas como las plantares, su demostración era difícil en otras localizaciones (tracto genital, laringe). La imposibilidad de cultivar estos virus *in vitro* (la replicación sólo tiene lugar en queratinocitos diferenciados) enlenteció considerablemente su estudio. El análisis bioquímico e inmunológico de las proteínas virales llevó a pensar durante los años 60 que existía un único tipo de Papilomavirus Humano (PVH) y que la morfología y el comportamiento del mismo dependían de la localización y del tipo de epitelio infectado.

Gracias al desarrollo de las técnicas de Genética Molecular el estudio de los Papilomavirus experimentó un considerable avance a finales de la década de los 70 (3, 4). Los métodos de hibridación y clonaje de ácidos nucleicos permitieron la identificación de más de 60 tipos diferentes de PVH (5), dependiendo el tipo de lesión del genotipo infectante. También fue posible la definición de sus genes y el estudio de las funciones desempeñadas por cada uno de ellos. Con la puesta a punto, durante la década de los 80, de los ensayos de transformación *in vitro* se inició el estudio de las funciones virales implicadas en la inducción de la proliferación celular (6).

En los últimos años el interés despertado por los Papilomavirus Humanos ha sido creciente. La asociación de ciertos PVH con diversos tipos de cáncer parece cada vez más evidente (3,7).

Algunos PVH de localización cutánea podrían desempeñar un papel decisivo en la aparición de los carcinomas de células

escamosas típicos de la epidermodisplasia verruciforme (EV). Por otra parte, la infección del tracto genital por estos virus constituye actualmente una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más frecuente (8-10), lo que tiene una importancia fundamental si se considera la asociación, cada vez más clara, que existe entre algunos 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 alteraciones respiratorias que en muchos casos tienen mal pronóstico (11, 12).

## SISTEMATICA Y CLASIFICACION

### I. SISTEMATICA

Tanto papilomavirus como poliomavirus se agrupan en una sola familia, *PAPOVAVIRIDAE*, cuyo nombre proviene de las dos letras iniciales de los primeros virus que se agruparon en ella (papilomavirus del conejo, poliomavirus del ratón y virus vacuolizante de los simios -SV40-). Todos ellos se caracterizaban por ser pequeños, desnudos e icosaédricos, por poseer una molécula de ADN circular de cadena doble y por multiplicarse en el núcleo de la célula infectada (6).

La familia *PAPOVAVIRIDAE* se dividió inicialmente en dos géneros atendiendo al tamaño de los viriones:

- Papillomavirus (55 nm)
- Polyomavirus (45 nm)

Sin embargo, estudios posteriores pusieron de manifiesto la existencia de diferencias tan evidentes en su organización genómica y en sus propiedades biológicas, que desaconsejaban su inclusión como miembros de la misma familia. Esto llevó a la diferenciación de dos subfamilias:

- *POLYOMAVIRINAE*
- *PAPILLOMAVIRINAE*

En efecto, existen antígenos específicos de cada subfamilia

que permiten su identificación por técnicas serológicas. En cuanto a la homología de su material genético, se ha observado que, en condiciones de baja astringencia, los miembros de cada subfamilia hibridan entre sí, pero nunca con los de la otra subfamilia.

Por tanto, la sistemática de los papovavirus quedaría de la siguiente forma:

FAM. *PAPOVAVIRIDAE*

- SF. *POLYOMAVIRINAE*: Gen. Polyomavirus

\* Humanos (BK, JC)

\* Diversas especies de animales (ej. SV40)

- SF. *PAPILLOMAVIRINAE*: Gen. Papillomavirus

\* Humanos (PVH)

\* Diversas especies de animales

Las características de ambas subfamilias se resumen en la Tabla I.

	<i>PAPILLOMAVIRINAE</i>	<i>POLYOMAVIRINAE</i>
<b>Tamaño</b>	55nm	45nm
<b>Simetría</b>	Icosaédrica	Icosaédrica
<b>Mat. genético</b>	ADN doble circular ( $5 \times 10^6$ d -8 kb-)	ADN doble circular ( $3,6 \times 10^6$ d -5kb-)

**TABLA I: Características generales de la familia PAPOVAVIRIDAE**

## II. CLASIFICACION DE LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS (PVH)

Hasta el momento se han aislado cerca de 70 tipos distintos de PVH, diferenciables únicamente mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (5, 13). Hasta ahora, se consideraba que un determinado aislado era un nuevo genotipo cuando éste presentaba un grado de homología del 50% o menos con el resto de los conocidos.

Inicialmente la "homología" se determinaba según el grado de hibridación, en fase líquida (14) del nuevo genotipo con otros establecidos. Sin embargo, este método hace difícil el reconocimiento de aquellos PVH que tengan escasa relación con los conocidos, como es el caso de PVH-41, aislado directamente de partículas virales y cuya homología con el resto del grupo es casi nula. Ello ha hecho que se esté recurriendo a la secuenciación para identificar nuevos PVH de forma más precisa. Actualmente se considera que nos encontramos ante un nuevo genotipo de PVH cuando éste presenta una homología inferior al 90% en los genes E6, E7 y L1 (2)

La clasificación se ha hecho considerando el lugar preferente de aparición de dichos genotipos distinguiéndose los siguientes grupos:

### 1. PVH CUTANEOS:

La mayoría de los papilomavirus humanos pertenecientes a este grupo han sido aislados de pacientes de epidermodisplasia verruciforme (EV); de ellos, PVH-5, PVH-8 y, en menor grado, PVH-14, 17 y 20 se han relacionado con carcinomas de células escamosas que aparecen en algunos de estos enfermos tras la

exposición al sol (15).

Otros PVH cutáneos no asociados a EV son PVH-1 y PVH-4, aislados de verrugas plantares y vulgares, PVH-7 observado en "verrugas de los carniceros", frecuentes en manipuladores de carne y PVH-41, detectado en ciertos carcinomas (16, 17).

## **2. PVH MUCOSOS:**

La diferenciación dentro de este grupo no es estricta y muchos PVH pueden aparecer en distintas mucosas; sin embargo, se pueden distinguir los siguientes subgrupos:

**2.1. Genitales:** Genotipos relacionados con lesiones benignas y malignas del tracto genital. Aunque cada uno de ellos aparece típicamente en uno u otro tipo de lesiones (ej: PVH-6 y 11 se consideran benignos, mientras que PVH-16 y 18 suelen relacionarse con alteraciones malignas), a veces es posible encontrar genotipos "malignos" en lesiones benignas y viceversa.

**2.2. Respiratorios y del tracto digestivo:** Numerosos papilomavirus genitales han sido aislados también en tumores de los tractos respiratorio y digestivo, aunque la mayoría de ellos no aparecen en lesiones malignas. En cualquier caso, hasta el momento sólo se tiene noticia de dos genotipos exclusivamente orales: PVH-13 (18) y PVH-32 (19), detectados ambos en pacientes con hiperplasia epitelial focal; PVH-32 se ha encontrado, además, en papilomas orales.



### 3. MUCOSOS Y CUTANEOS:

Algunos genotipos de PVH han sido aislados, tanto de lesiones mucosas como cutáneas, constituyendo, por lo tanto, excepciones a la anterior clasificación. Algunos ejemplos de ello son PVH-57 (20); PVH-2 que, aunque presente típicamente en lesiones cutáneas, se ha detectado en papilomas orales (21); PVH-7, productor, como ya se ha reseñado, de las "verrugas de los carniceros" y que es frecuentemente observado en papilomas orales de pacientes de SIDA (22) o PVH-16, que, además de en lesiones genitales, se ha detectado en algunas afecciones cutáneas como la enfermedad de Bowen (5, 23).

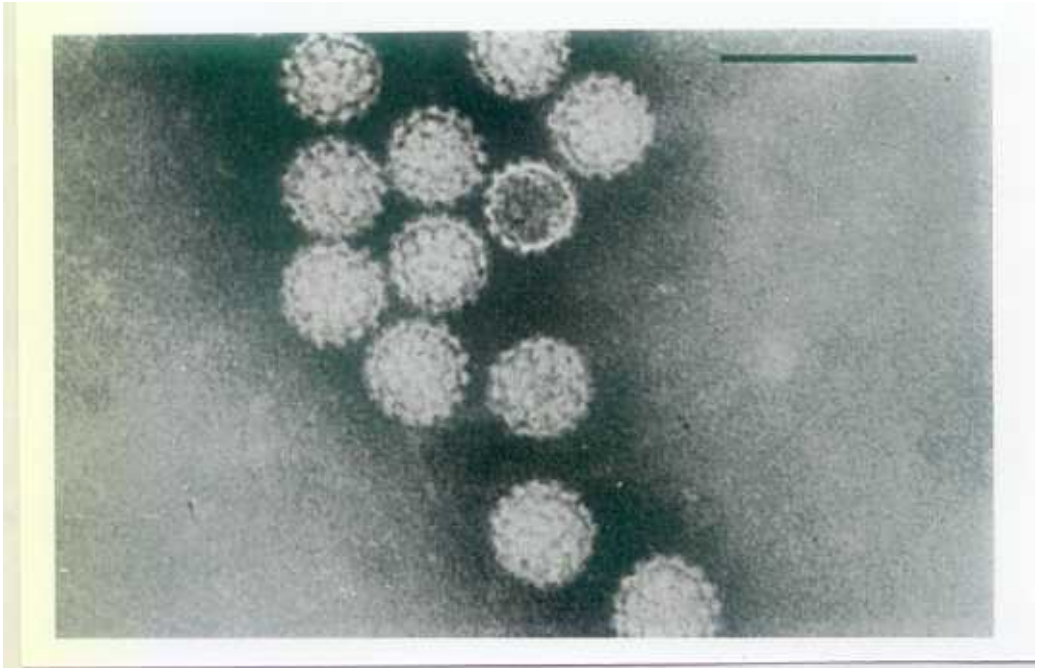
### ESTRUCTURA

Los virus del género Papillomavirus son pequeños (52-55 nm), desnudos y con simetría icosaédrica. El virión está formado por una molécula de ADN circular rodeado de una cápside protéica y que tiene una densidad de 1,34 g/ml en gradiente de CsCl (6).

La cápside está compuesta por 72 capsómeros y en ella se distinguen al menos dos proteínas estructurales, denominadas *major* y *minor* según su proporción en el contenido protéico total de la partícula. La proteína *major* constituye el 80% de las totales y tiene un peso molecular aproximado de 50.000 d, frente a los 70.000 d de la *minor*, que se encuentra en mucho menor proporción. Además, el análisis de las proteínas del virión ha puesto de manifiesto la presencia de histonas de origen celular que se asocian al ADN viral formando un complejo parecido a la cromatina (3, 24, 25).

Como se indicaba al principio de este apartado, el genoma de Papillomavirus consiste en una molécula de ADN circular de cadena doble. Dicho ADN tiene una longitud aproximada de 8.000 pb, un peso molecular de unos  $5,2 \times 10^6$  d y un contenido medio de pares G:C del 42%. El material genético constituye aproximadamente el 12% del peso del virión (6).

**FIGURA 1: Micrografía electrónica de partículas de papilomavirus (Tomado de Zuckerman AJ. et al. John Wiley & Sons. 1987)**



**FIGURA 1:** Micrografía electrónica de partículas de papilomavirus (Tomado de Zuckerman AJ. *et al.* John Wiley & Sons. 1987)

## ORGANIZACION GENETICA

La disposición genética de los papilomavirus es muy similar en todos los miembros del género. Gracias al análisis de ARNs codificados por Papilomavirus bovino tipo 1 (PVB 1), se ha determinado que sólo una de las hebras sirve como molde para la transcripción, característica que parece ser común para todos estos virus (26-28). Dentro de la hebra codificadora pueden distinguirse las siguientes regiones atendiendo a su localización:

### **1. REGION REGULADORA**

También llamada "no codificadora" (NCR -*non coding region*-) o "de control largo" (LCR -*long control region*-). Su tamaño aproximado es de 1 kb y en ella se encuentran el origen de la replicación y numerosos elementos de control de replicación y transcripción.

### **2. REGION E**

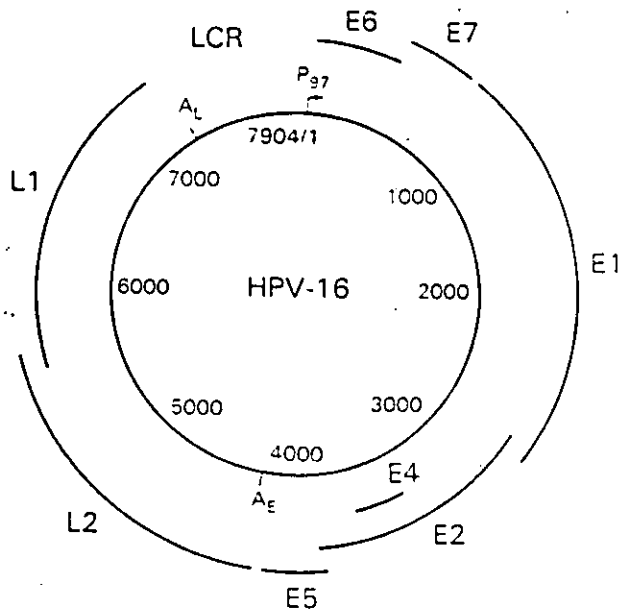
Contiene al menos seis genes tempranos (*early*), que constituyen el 69% del genoma y tienen un tamaño total aproximado de unas 4,5 kb.

Se ha comprobado que esta región es suficiente para inducir transformación (29) y, por tanto, es la que confiere a los papilomavirus esta propiedad biológica. Se expresa en células infectadas no productivas y en células transformadas (28).

### 3. REGION L

Esta región está constituida por dos genes tardíos (*late*),  $L_1$  y  $L_2$  que codifican respectivamente las proteínas *major* y *minor* de la cápside y que sólo se expresan en células infectadas productivamente (26, 30).

5805324907



**FIGURA 2: Mapa genético de PVH-16. (Tomado de Fields et al Raven Press Ltd. New York, 1990).**

## MULTIPLICACION VIRAL

Aunque el ADN de los papilomavirus puede detectarse en células basales y parabasales del epitelio infectado (31), la expresión de los genes estructurales (L) y el ensamblaje sólo son posibles en queratinocitos altamente diferenciados. Además, y como veremos más adelante, es en este tipo de células en las únicas en las que es posible la replicación vegetativa. Esto indica un tropismo específico por células escamosas que impide la propagación de estos virus en cultivos celulares, lo que dificulta su estudio *in vitro*. No obstante, la capacidad de algunos de ellos y, en especial del PVB 1, de transformar células de roedores, ha permitido investigar a cerca de las funciones implicadas tanto en la multiplicación viral como en la transformación de las células infectadas. Aunque la mayoría de los datos se han obtenido de PVB 1, parece que pueden hacerse extensivos al resto de los papilomavirus.

### I. REPLICACION

El ADN de los papilomavirus puede aparecer en forma episómica o integrado en el genoma de la célula infectada, existiendo, por tanto, dos tipos de replicación viral (6)

- Plasmídica: Tiene lugar en células de la porción epidérmica inferior, en las que el ADN viral episómico se encuentra en un alto número de copias.
  
- Vegetativa: Sólo se produce en células diferenciadas, en las que normalmente no hay síntesis de ADN.



## 1. REPLICACION PLASMIDICA

Como se verá más adelante, el modelo más extendido divide este proceso en dos fases:

- Amplificación o "establecimiento": El ADN viral se amplifica, pasando de bajo a moderado número de copias.
- Mantenimiento: El número de copias obtenido permanece relativamente constante durante varias generaciones celulares.

### 1.1. Secuencias implicadas

El origen de la replicación se encuentra dentro de la LCR (33), interviniendo, además otros elementos:

- **Secuencias de mantenimiento del plásmido o PMS** (*plasmid maintenance sequences*) (33-35). Se han detectado dos:
  - . **PMS 1**, cerca del origen de replicación (del nucleótido 7116 al 7234).
  - . **PMS 2**, dentro del gen E1 (del nucleótido 1515 al 1615).
- **Elementos estimuladores**. Parece que las PMSs necesitan este tipo de elementos para que haya replicación. Se ha detectado una secuencia que podría desempeñar esta función, del nucleótido 6.706 al 6793.

- **Gen E1.** Este gen es responsable de al menos dos funciones implicadas en la replicación, realizadas por los siguientes elementos:

. **E1-M:** Es una proteína de unos 23.000 d, codificada por el extremo 5'; fue identificada con un antisuero dirigido contra el posible extremo N-terminal del E1 (36). Existen numerosos datos que indican que E1-M o *factor mod* es en realidad un modulador, ya que las alteraciones del mismo no impiden las primeras fases de la replicación, pero los mutantes pierden la capacidad reguladora de este proceso (17). Además, E1-M suprime la replicación de plásmidos quiméricos SV-40/PVB-1 (40, 41).

. **E1-R:** No se ha identificado ninguna proteína correspondiente a los dos tercios del extremo 3' (C-terminal) del E1; sin embargo, se han detectado homologías entre ciertas secuencias de este segmento y antígenos T largos de poliomavirus, directamente implicados en la replicación de éstos (37); además, los virus con mutaciones en esta zona no pueden replicarse como plásmidos. Todo ello indica que existe un elemento, E1-R o *factor rep*, responsable de la replicación propiamente dicha (35, 36).

- **Secuencias con influencia indirecta.** Otras secuencias posiblemente implicadas en la replicación son:

. **Genes E6 y E7.** Algunas mutaciones en estos genes dan lugar a virus que se replican en bajo número de copias de (mutantes *cop*) (38, 39), lo que sugiere que E6 y E7 codificarían elementos controladores del número de copias de ADN viral.

. **Gen E2.** Se ha observado que las mutaciones en este gen producen virus defectivos en replicación (41-44). Como se verá mas adelante, las proteínas del gen E2 se unen a secuencias específicas del ADN viral, por lo que se le atribuye, al menos, un papel regulador.

## 1.2. Mecanismo

Se desconoce cual es el mecanismo exacto de replicación plasmídica. Sin embargo, las funciones asignadas al gen E1 han llevado a algunos autores a proponer el modelo de dos etapas mencionado al principio de esta sección (38):

- **Fase de amplificación:** El segmento correspondiente del gen E1 codifica el factor *rep* (E1-R) y, durante un corto espacio de tiempo, el genoma viral, que se encuentra en bajo número de copias, se amplifica, consiguiéndose entre 50 y 400 copias de ADN plasmídico por genoma diploide.

- **Fase de mantenimiento:** Durante esta etapa el ADN viral continua replicándose, pero de forma que se obtiene sólo una copia de plásmido por cada ciclo de división celular. Se piensa que el factor *mod* (E1-M) podría actuar en esta fase "marcando" los genomas virales hijos para que no se repliquen hasta el siguiente ciclo celular; de esta forma, y como ya se ha mencionado, el número de copias de plásmido permanece constante. Se ha propuesto un modelo alternativo, según el cual, los plásmidos se replicarían obteniéndose una copia por genoma celular sin necesidad de ningún "marcaje" (45).

## 2. REPLICACION VEGETATIVA

Se produce en células epiteliales diferenciadas. Cuando se alcanza este grado de diferenciación, estas células pierden la capacidad de 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 (6, 46). Es posible que el factor E1-R esté implicado en este proceso.

## II. TRANSCRIPCION

La transcripción en los papilomavirus es un proceso complejo, caracterizado por:

- Numerosos promotores.
- Numerosos y complejos modelos de maduración del ARN.
- Producción diferencial de ARNm según el tipo de célula.

## 1. TIPOS DE ARNm VIRAL

Existen dos sitios de poliadenilación de los ARNm de papilomavirus:

### 1.1. A<sub>c</sub>

Es el más común. Está situado en el nucleótido 4.180 (inmediatamente después de la región E). Utilizan el A<sub>c</sub> ARNm de factores implicados en replicación plasmídica, regulación de la transcripción y transformación celular y es el único que se emplea en células transformadas (28).

### 1.2. A<sub>1</sub>

Situado en el nucleótido 7.156 (después de la región L), los ARNs que lo utilizan aparecen en células productivas (queratinocitos diferenciados), pero no en células transformadas o infectadas no productivas.

## 2. PROMOTORES

Se ha detectado un total de siete promotores activos, que se designan mediante la letra P y un subíndice que indica la posición 5' de la especie más abundante expresada a partir del mismo. Estos promotores son:

- P<sub>89</sub>, P<sub>890</sub>, P<sub>2443</sub>, P<sub>3080</sub>, P<sub>7185</sub> Y P<sub>7940</sub>, activos en células transformadas (30, 46-49).

- $P_{7250}$  o  $P_L$  (promotor tardío), activo en queratinocitos productivos, da lugar a los ARNm tardíos (región L y gen E4) (30)

### 3. ELEMENTOS *cis*

La LCR de los papilomavirus contiene elementos estimuladores o de respuesta (RE, del inglés *responsive elements*) capaces de responder, tanto a factores reguladores de la transcripción de origen viral, como a factores celulares. Se ha demostrado que dichos elementos tienen cierta especificidad por tejidos o células y fueron observados por primera vez en PVH-16 y 18 (50, 51); dos de los más importantes son  $E2RE_1$  y  $E2RE_2$  que, como veremos, son necesarios para la acción del transactivador codificado por el gen E2. Se ha descrito otro elemento de este tipo más allá de la región E, al que se ha llamado "estimulador distal" (51), cuya función se desconoce por el momento.

### 4. PROTEINAS E2

#### 4.1. Transactivador E2TA

El E2TA (*E2 trans-activator*) es una proteína de 48 Kd (410 aminoácidos), correspondiente a la secuencia completa del gen E2. Se expresa a partir del promotor  $P_{2443}$ , aunque podría utilizar algún otro, como el  $P_{890}$  y actúa estimulando la transcripción de genes virales mediante la interacción con los elementos de respuesta  $E2RE_1$  y  $E2RE_2$ . Parece que el propio  $P_{2443}$  está también regulado por elementos de respuesta localizados en la LCR (53).

El transactivador E2TA presenta dos dominios muy conservados

y una región interna no conservada (6, 54). Las regiones conservadas son:

- **Extremo N-terminal:** Es una secuencia de 220 aminoácidos (aa) que podría presentar zonas con estructura de alfa-hélice. Es responsable de la transactivación.
  
- **Extremo C-terminal:** Consta de 100 aa y no parece presentar estructuras especiales. Podría estar implicada en la formación de dímeros. Se ha observado cierta homología entre esta región y el producto del oncogen *c-mos* (54).

#### 4.2. Represores

Como su nombre indica, reprimen la acción del E2TA. Su función también está regulada por elementos de respuesta de la LCR. El gen E2 codifica dos proteínas represoras:

- **E2TR** (*E2 transcriptional represor*), de 31 Kd, que se expresa a partir del promotor P<sub>3080</sub>
  
- **E8/E2TR** (*E8/E2 transcriptional represor*), de 28 Kd, debe su denominación a que está formada por una secuencia de 11 aminoácidos codificada por el gen E8 unida a la porción C-terminal (del aminoácido 206 al 410) del E2. El E8/E2TR se traduce a partir de un ARNm que incluye la secuencia correspondiente al gen E8 unida a la posición 3' del E2.

Los elementos E2TR y E8/E2TR sólo se han descrito en PVB 1, pero se piensa que podrían existir productos con estructura y funciones equivalentes en los PVH genitales (55)

#### 4.3. Mecanismo de acción de las proteínas E2

Las proteínas E2 son capaces de unirse al ADN a través de secuencias específicas. Se ha establecido la existencia de dos tipos de secuencias consenso con esta función: ACCN<sub>6</sub>GGT y ACCN<sub>6</sub>GTT, donde N<sub>6</sub> es cualquier combinación de seis nucleótidos. Dentro del genoma de PVB 1 existe un total de 17 sitios de unión específicos con afinidad variable por los productos E2, determinada por las N<sub>6</sub> (111). Por otra parte, se han observado fenómenos de cooperatividad entre los sitios de unión (56).

. **E2TA.** Aunque se desconoce el mecanismo exacto de activación de la transcripción, se sabe que es necesaria la unión en forma de dímeros del E2TA a sitios específicos dentro de los elementos estimuladores. Como ya se ha mencionado, la dimerización tiene lugar a través del extremo C-terminal.

Se ha observado que el E2TA puede actuar sobre promotores no homólogos, lo que implica que podría activar también promotores celulares (57, 58).

. **Represores.** Podrían ejercer su función de varias formas:

1. Formación de homodímeros que competirían con el E2TA por los sitios de unión.



## 2. Formación de heterodímeros inactivos con moléculas de E2TA (recuérdese que el C-terminal es común)

Parece existir otro mecanismo de represión, basado en la unión del E2TA a sitios de baja afinidad situados justo antes de los promotores: esto impediría la transcripción a partir de los mismos. Dicho mecanismo se apoya en estudios realizadas en PVH 18 (59).

## 5. OTROS REGULADORES

Se piensa que los genes E6 y E7 de PVH 16 y 18 tienen también funciones reguladoras de la transcripción, aunque no se ha determinado su significado fisiológico. Se ha observado que el producto E7 de PVH 16 es capaz de activar el promotor E2 de adenovirus y también se han asignado propiedades activadoras al producto E6 de PVH 18 (6, 60).

## 6. TRANSCRIPCION DE LOS GENES L

Como ya se ha mencionado, la expresión de los promotores tardíos  $P_{7250}$  y  $P_L$  sólo se produce en queratinocitos diferenciados. En las células transformadas (no diferenciadas), la transcripción de estos promotores es inhibida por la influencia de secuencias situadas dentro de la región L, que evitan el reconocimiento de la señal de poliadenilación por el complejo ARN polimerasa II y, por tanto, la expresión de los genes tardíos. También existen secuencias que inducen la degradación rápida de los ARNm correspondientes. Tras la diferenciación, la replicación pasa a

ser vegetativa, descendiendo considerablemente la síntesis de ADN y, con ella, los factores celulares implicados en estos procesos. Esto explicaría la capacidad de los queratinocitos de expresar los genes L. Se han propuesto otros modelos de regulación transcripcional de estos genes durante la diferenciación celular, pero se desconoce aún el mecanismo exacto (61).

## TRANSFORMACION

Los virus del género Papillomavirus se caracterizan por inducir tumores en el epitelio infectado. Aparecen en el mismo cambios morfológicos como acantosis (aumento del espesor de la epidermis) e hiperqueratosis debidos, muy probablemente a la acción de los productos virales.

Aunque, como ya se ha comentado, no pueden propagarse en cultivos *in vitro*, son capaces de provocar transformaciones morfológicas en ciertas líneas celulares. Esta propiedad se describió por primera vez a principios de los años 60 en PVB 1 (6), por lo que este virus ha servido de modelo para el estudio de los fenómenos asociados a la transformación.

### **I. ENSAYOS DE TRANSFORMACION *IN VITRO***

En este tipo de ensayos se han empleado preferentemente células de roedores como C127, NIH, 3T3 y otras líneas de hamster y rata. Además de la aparición de cambios morfológicos (las células C127 toman forma afilada, pierden la inhibición por contacto y adquieren carácter tumorigénico en ratones desnudos), se han comprobado los siguientes aspectos:

1. El ADN viral, en estado episómico, no necesita integrarse en el genoma celular para mantener el fenotipo transformado. No obstante, si dicha integración no se produce debe conservarse un alto número de copias ya que, en caso contrario, se perderá dicho fenotipo, tal y como ocurre en los mutantes *cop* (39, 62).

2. Los virus con replicación defectiva también tienen capacidad transformante, lo que indica que el estado episómico no es necesario aunque, como veíamos en la sección dedicada a la replicación, es el más frecuente (43, 44, 63, 64).
3. Se ha observado que los ratones curados del genoma viral por tratamiento con interferón pierden el fenotipo transformado, por lo que la transformación dependería de la expresión continua del ADN viral (65).
4. Para la transformación sólo se requiere un fragmento subgenómico que constituye el 69% del ADN viral, en el que se encuentran los genes tempranos (29).

Existen estudios más recientes, realizados en papilomavirus humanos genitales en los que se ha conseguido la transformación de células *in vitro* mediante diversos métodos, como la cotransfección con marcadores selectivos dominantes (66) o el empleo de células primarias o de queratinocitos (67-70). Así, ha podido comprobarse que los PVH asociados con lesiones malignas (PVH 16 o 18) son capaces de transformar, lo que no ocurre con los considerados como "benignos"; sin embargo, se ha conseguido producir *in vitro* partículas de PVH 11 completas mediante la exposición de células de prepucio o cérvix uterino a extractos de condiloma y su posterior implantación en ratones atímicos (71).

## II. GENES TRANSFORMANTES

### 1. GEN E5

Codifica una proteína de 44 aa que es suficiente para transformar ciertas células en cultivo (6, 70) y que es la más pequeña que se conoce con esta propiedad. Presenta un dominio fuertemente hidrofóbico, correspondiente al extremo N-terminal y otro fuertemente hidrófilico, correspondiente al C-terminal, capaz de inducir síntesis de ADN. Además, cuenta en su cadena con dos restos de cisteína necesarios para la transformación, posiblemente responsables de la formación de dímeros (70, 72).

El gen E5 está muy conservado dentro del género, existiendo también similitudes estructurales entre las distintas proteínas E5, pero se desconoce su función exacta, sobre todo en los PVH (73). Se piensa, no obstante, que la proteína E5 podría actuar alterando la actividad de las proteínas de membrana implicadas en la proliferación celular (6).

### 2.2. GENES E6 Y E7

Ambos genes son imprescindibles para la aparición del fenotipo transformado y podrían codificar dos proteínas correspondientes respectivamente a los genes completos E6 y E7 y un producto mixto E6-E7 (74). Además, los genotipos humanos PVH 16 y 18 podrían dar lugar a una proteína E6 truncada (E6\*) (75).

Los productos completos E6 y E7 presentan una gran similitud estructural. Ambas presentan varias zonas con cisteínas en la forma Cys-X-X-Cys, propia de numerosas proteínas que se unen al ADN (76).

Las proteínas E6 y E7 de PVH 16 y 18 pueden transformar

células de roedores por separado, pero para la transformación de fibroblastos o queratinocitos es necesaria la presencia de la proteína E6 (77, 88).

- **Proteína E6:** Su longitud se ha estimado en 158 aa, a partir de la secuencia del gen E6. Posee gran cantidad de restos de cisteína (79). Se piensa que podría asociarse con proteínas celulares implicadas en la regulación de la proliferación o diferenciación.
  
- **Proteína E7:** Consta de unos 98 aa y presenta una curiosa similitud entre los 37 aa de su extremo N-terminal y ciertos segmentos del producto del gen E1A de adenovirus (Ad E1A) que permiten la asociación de éste con el producto del gen p105-RB, supresor del retinoblastoma (80). Se ha comprobado que la proteína E7 de los PVH genitales también puede formar complejos *in vitro* con el p105-RB (81). Algo similar podría suceder *in vivo*, interfiriéndose el funcionamiento normal de este gen y dando lugar, de este modo, a la aparición del fenotipo transformado. Este tipo de secuencias del producto E7 está muy conservado en todos los PVH genitales, lo que indica que la asociación con el p105-RB no basta para la transformación, ya que los considerados no oncógenos (PVH 6 y PVH 11) carecen de esta propiedad.

Como ya se mencionó en la sección dedicada a la replicación, las proteínas E6 y E7 podrían tener, además, un papel modulador

en la replicación, controlando el número de copias de ADN episómico.

### **III. SECUENCIAS CON INFLUENCIA INDIRECTA: GENES E1 y E2**

Se ha observado que las mutaciones en los genes E1 y E2 influyen aumentando o suprimiendo respectivamente la capacidad transformante de PVB 1 (82, 83). Sin embargo, su papel parece ser indirecto y se debe más bien a las funciones que desempeñan tanto en la replicación plasmídica como en la transcripción.

## EPIDEMIOLOGIA Y PATOGENIA

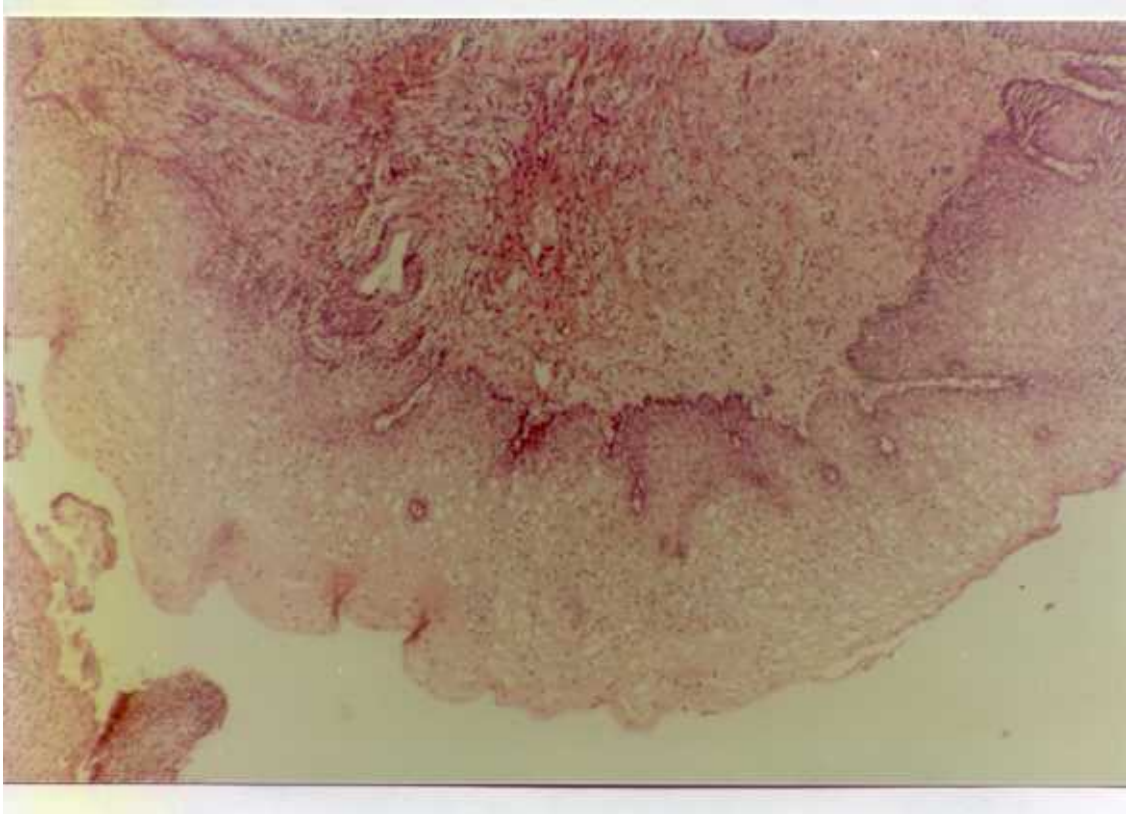
Los papilomavirus se transmiten por contacto directo con la partícula viral, generalmente asociado con pequeños traumatismos del epitelio como abrasiones (PVH cutáneos) o contacto sexual (PVH genitales). También es posible la transmisión perinatal (PVH respiratorios), quedando algunos casos en los que se desconoce el modo de infección.

Las lesiones más típicas de los papilomavirus son las **verrugas**, la mayoría de las cuales son benignas y autolimitantes y tienen origen monoclonal (1, 84). El virus infecta las células basales del epitelio, induciendo su proliferación. Muchas de las células infectadas presentan una gran cavidad perinuclear, rodeada por un citoplasma denso. Este tipo de morfología se conoce como **coilocitosis** y sirve, muchas veces, como diagnóstico de la infección (1) (Figura 3).

La multiplicación viral tiene lugar exclusivamente en el núcleo, de modo que los productos virales sólo se detectan en el citoplasma cuando se rompe la membrana nuclear. Como ya se ha mencionado en otras secciones, la expresión de unos genes u otros depende del grado de diferenciación de las células.

La progresión hacia la malignidad de este tipo de lesiones depende del genotipo de PVH infectante (sólo unos cuantos tienen poder oncogénico) y de la acción de cofactores (1, 5, 7). La gravedad de las mismas depende, además de su localización.





**FIGURA 3: Morfología de los coilocitos (parte superior) obsérvense los halos perinucleares característicos.**

## I. INFECCIONES CUTANEAS

### 1. VERRUGAS EPIDERMICAS

Suelen ser de tres tipos:

- **Comunes o vulgares:** Tienen forma de domo y numerosas proyecciones cónicas, que dan a la superficie aspecto rugoso (**papilomatosis**). Suelen aparecer en las manos.
  
- **Plantares:** Se caracterizan por un considerable aumento del espesor de la capa córnea (**hiperqueratosis**). Aparecen en la planta del pie.
  
- **Planas:** No presentan papilomatosis. Aparecen sobre todo en brazos, cara y alrededor de las rodillas.

La transmisión puede ser **directa**, por contacto con el tejido infectado de otra persona o por autoinoculación, o **indirecta**, por exposición a partículas virales presentes en objetos contaminados.

Aunque la correlación entre el genotipo de PVH infectante y el tipo de verruga no es absoluta, PVH-1 suele aparecer en verrugas plantares, mientras que PVH-2 lo hace en las vulgares y PVH-3 y 10 en las planas; PVH-7 se asocia, sin embargo, con las lesiones que aparecen en las manos de los manipuladores de carne ("verrugas de los carniceros") (5).

Las verrugas suelen ser pequeñas y escasas, excepto en casos de inmunodepresión. En general, regresan espontáneamente a los dos tal vez debido a mecanismos de inmunidad celular (1).

## 2. EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME (EV)

Se trata de una enfermedad larga que se caracteriza por la no regresión de las lesiones papilomatosas, algunas de las cuales progresan hacia la malignidad (85).

El modo de transmisión de la EV es desconocido. Se ha observado que afecta a miembros de la misma familia, existiendo en los enfermos antecedentes frecuentes de consanguinidad parental, lo que sugiere algún tipo de asociación con factores genéticos; de hecho, esta enfermedad se consideró hereditaria hasta principios de los años 60 (1). Se piensa que la EV podría estar favorecida por algún defecto genético del sistema inmunitario (muchos de los pacientes tienen afectada la inmunidad celular). Además, la enfermedad se comporta en ocasiones como un carácter recesivo ligado al cromosoma X (86).

Se han aislado numerosos genotipos de PVH de lesiones de EV, pero los más frecuentes son PVH-5, 8, 14, 17 y 20, asociados también con carcinomas cutáneos de células escamosas, de donde también se ha aislado PVH-41 (5, 17). Este último virus aún no ha sido detectado en pacientes de EV.

La enfermedad se inicia en la infancia con lesiones generalizadas en forma de verrugas planas y de placas rojizas que recuerdan a la pityriasis versicolor. En un tercio de los casos se produce malignización de las placas, especialmente de las expuestas a la radiación solar.

## II. INFECCIONES RESPIRATORIAS

La mayoría de estas infecciones están producidas en realidad por papilomavirus genitales, especialmente PVH-6 y PVH-11, presentes en casi todos los papilomas respiratorios (5, 87-90).

### 1. PAPILOMAS LARINGEOS

Se trata de lesiones poco frecuentes, que pueden producir obstrucciones más o menos graves de las vías respiratorias. Afectan principalmente a laringe y cuerdas vocales, aunque también pueden aparecer en las cavidades oral y nasal, tráquea o pulmones.

Se piensa que la transmisión es perinatal, especialmente en niños y jóvenes. Se ha observado que el 60% de las madres de niños con papilomas laríngeos tienen antecedentes de verrugas genitales (11, 12). Además, el parto rara vez ha sido por cesarea. La aparición en pacientes adultos podría deberse a un periodo de latencia más largo del normal o a la adquisición de la infección mediante prácticas de sexo oral.

Estas lesiones suelen tratarse mediante cirugía, existiendo a menudo fenómenos de recurrencia o diseminación de la infección después de las intervenciones. Ello indica que el virus se encuentra también en las células del epitelio normal adyacente (91).

### 2. PAPILOMAS NATALES

Se clasifican como escamosos o fungiformes, invertidos y de células cilíndricas.

Su modo de transmisión se desconoce y, aunque también suelen

atribuirse a PVH-6 y 11 (1, 5), se ha aislado PVH-16 en algunos de ellos.

### **3. CANCER DEL TRACTO RESPIRATORIO**

Los papilomas respiratorios rara vez progresan hacia cáncer. No obstante, existen datos que describen un aumento de las malignizaciones tras la irradiación con rayos X (92).

Tampoco parece existir una asociación clara con ningún genotipo concreto, aunque PVH-30 fué aislado de un carcinoma laríngeo (93) y se han observado secuencias relacionadas con PVH-16 (94).

## **III. INFECCIONES ORALES**

### **1. HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL (HEF)**

Aunque es cosmopolita, la prevalencia de esta enfermedad es mayor en ciertas poblaciones indias y esquimales (1).

Los papilomavirus más frecuentes son PVH-13 y PVH-32, que son los únicos que parecen exclusivos de la mucosa oral (1,5).

La HEF se caracteriza por la aparición de nódulos elevados en la mucosa infectada que persisten durante varios años y no sufren transformación maligna. Aparece preferentemente en niños y suele afectar a miembros de la misma familia.

### **2. OTRAS LESIONES ORALES**

Las más benignas son los papilomas escamosos, que no han podido relacionarse con ningún genotipo concreto (1). La morfología y el genotipo causal del resto de las lesiones indica que se producen por contacto con otros epitelios infectados. Así,

es posible observar **condilomas acuminados** y otras lesiones mucosas, producidos por PVH genitales, y **verrugas vulgares labiales**, asociadas con PVH-2. También se ha detectado PVH-7 en lesiones orales de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (22).

#### **IV. PAPILOMAS CONJUNTIVOS**

Son raros y aparecen a cualquier edad, estando en su mayoría producidos por PVH-6 y 11 (95, 96).

#### **V. INFECCIONES GENITALES**

La transmisión sexual de las verrugas genitales se estableció ya a finales de los años 60. Otros autores (97, 98) observaron la frecuencia de las infecciones cervicales por PVH y su semejanza con distintos grados de neoplasia. Por otra parte, este tipo de lesiones se transmite en un alto porcentaje a las parejas de los pacientes afectados, donde suele encontrarse el mismo genotipo causal (1).

##### **1. VERRUGAS ANOGENITALES (CONDILOMAS)**

Son las lesiones más típicas de PVH. Suelen aparecer en adultos jóvenes y promiscuos (99), parejas de pacientes afectados e individuos inmunodeprimidos (100, 101).

Los condilomas suelen tener más de una localización anogenital (102), pudiendo ser de dos tipos:

- **Acuminados:** Tienen proyecciones superficiales y son exofíticos. En la mujer es raro encontrarlos en cérvix.

- **Planos:** Carecen de proyecciones. Son más comunes en cérvix que los anteriores, donde, a veces sólo son visibles por colposcopia, confundiendo fácilmente con lesiones de tipo CIN-1 (ver apartado siguiente).

Los condilomas acuminados están asociados en su mayoría con la infección por PVH-6 y 11 (5, 103), aunque PVH-16 puede aislarse en un 10% de ellos, mientras que los planos presentan una etiología más heterogénea.

## 2. NEOPLASIAS INTRAEPITELIALES. CIN

Los estados cancerosos en el tracto genital van precedidos de lesiones precursoras llamadas **neoplasias intraepiteliales**. Aunque la significación es equivalente en otras localizaciones como vulva y pene, el mayor número de datos se refiere a la neoplasia intraepitelial cervical o **CIN** ( del inglés *cervical intraepithelial neoplasia*). Según su gravedad, se distinguen tres tipos (1).

- **CIN-1:** displasia leve (se han agrupado aquí los condilomas planos).
- **CIN-2:** displasia moderada.
- **CIN-3:** displasia severa.

El carácter precursor de estas lesiones se apoya en diversos datos. Los tejidos con lesiones graves tienen áreas contiguas con lesiones moderadas y el genotipo infectante suele ser el mismo (104, 105).

Casi todos los PVH están presentes en lesiones moderadas y subclínicas (5), mientras que los genotipos 18 y 18 suelen hacerlos en CIN-3 y carcinomas (7, 106, 107). Además se ha observado que las neoplasias en que aparecen PVH-16 y 18 progresan en mayor número hacia la malignidad que las causadas por PVH-6 y 11 (108).

### **3. CANCER CERVICAL**

Se estima que PVH-16 aparece en el 50-60% de los carcinomas invasivos de cérvix, mientras que PVH-18 lo hace en un 10-20% y, en menor proporción, otros genotipos como PVH-31, 33, 35, 39, 45, 52 y 56 (7).

Por otra parte, se ha aislado ADN de PVH de líneas celulares obtenidas a partir de carcinomas: PVH-16 aparece en células CaSki o SiHa (106, 109) y PVH-18 lo hace en varias líneas, como HeLa, C4-1 o SW756 (7). Recientemente se han detectado células portadoras de otros genotipos, como 31 o 39 (7). Otro dato indicativo de la relación entre presencia de PVH y cáncer cervical es el hecho de que las metástasis asociadas con estos carcinomas tengan el mismo genotipo que el tumor de origen (110, 111).

#### **3.1. Estado del genoma viral**

En las lesiones benignas y premalignas el ADN de PVH aparece en estado episómico, mientras que en las malignas suele integrarse en el genoma celular (7, 112).

Para la integración es necesaria la rotura y linearización del genoma viral, que tiene lugar por la región E1/E2, impidiendo



la síntesis de los factores reguladores codificados por estos genes (75, 113). De este modo se pierde el control sobre la expresión de los genes transformantes E6 y E7, que aumenta considerablemente en lesiones malignas (7) y pasa, posiblemente, a estar regulada por factores celulares adyacentes.

### 3.2. Influencia de factores celulares

Las infecciones por PVH no siempre progresan hacia cáncer y, cuando esto ocurre, el periodo de latencia entre dichas infecciones y la malignización oscila entre 20 y 50 años (114). Ésta y otras observaciones sugieren que la presencia de PVH podría no ser suficiente para la aparición de transformaciones malignas.

Stanbridge (115) demostró que las células HeLa, portadoras de PVH-18 perdían su carácter tumoral al fusionarlas con fibroblastos o queratinocitos normales. Posteriormente Saxon (116) observó que estas células perdían la capacidad de inducir tumores en ratones desnudos tras la adición de cromosoma 11. Por otra parte, se ha observado que PVH-16 no puede malignizar *in vitro* fibroblastos normales, pero sí aquellos que presentan delecciones en dicho cromosoma (117). La introducción de cromosoma 11 normal también suprime el carácter tumoral en las células SiHa (118); probablemente, las delecciones en el mismo implican la pérdida de genes supresores de tumores. Según zur Hausen, el cromosoma 11 expresa un factor llamado CIF (*cellular interfering factor*), que regula negativamente la expresión de los PVH oncógenos en estas líneas celulares (119, 120).

Parece que el lugar donde se produce la integración también

es un aspecto a tener en cuenta. Las etapas tardías de los carcinomas cervicales están asociadas con un aumento de la expresión del oncogén *c-myc* (102). Las células HeLa y C4-1 contienen secuencias integradas en el cromosoma 8, cerca de este locus (7). Existen otros estudios que indican que los PVH se integran preferentemente cerca de los genes *myc* en carcinomas invasivos, lo que apoya la teoría de que dicha integración favorece la activación de ciertos oncogenes celulares (121).

Como ya se mencionó en el capítulo dedicado a la multiplicación viral, también es posible que los factores codificados por algunos genes de PVH alteren el funcionamiento de ciertos genes supresores de tumores (7, 81).

### 3.3. Factores exógenos

Existen otros factores que podrían tener cierta influencia sobre la carcinogénesis anogenital.

Se piensa, por ejemplo, que la infección por el virus *Herpes simplex* podría favorecer la replicación plasmídica de los papilomavirus (7).

El tabaco también ha sido considerado como un factor de riesgo importante para la aparición de cáncer cervical y se ha observado que sustancias como la nicotina aparecen concentradas en el fluido vaginal de las fumadoras (122). También podrían acumularse otros productos mutagénicos en el tracto genital como consecuencia del metabolismo de ciertas bacterias (7).

Por último, el riesgo de cáncer cervical parece ser levemente superior en mujeres que utilizan anticonceptivos orales. Algunos autores han descrito en la LCR un elemento

sensible a la progesterona que estimula la expresión genética de PVH y, posiblemente, la proliferación de células portadoras de ADN viral (123, 124).

LESION	PVH (GENOTIPO)
<b>Epidérmicas</b>	
Verrugas	1, 2, 3, 4, 10, 26, 29, 38, 41, 49, 57, 63, 65
Quiste epidermoide	60
Verrugas de carniceros	2,7
EV	2, 3, 10 (exclusivos) 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 37, 47, 50.
Alt. bowenoides	16, 34, 35
Carc. c. escamosas	5, 8, 14, 17, 20, 47, 41
<b>Genitales</b>	
Condiloma acuminado	6, 11, 42, 44, 51, 55, 53, 58, 67
N. intraepitelial	6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 52, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64
Carcinoma	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 66
<b>Tumores de cabeza y cuello</b>	
Papilomatosis	6, 11, 32, 7, 57, 2.
HEF	13, 32
Carcinoma	2, 6, 11, 16, 18, 30

**TABLA II: Genotipos de papiloma presentes en diversas lesiones (tomado de Muñoz et al. IARC Scientific Publications 1992)**

## DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES GENITALES POR PVH

### **I. TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS**

Parte de ellas se basan en la detección del antígeno específico de grupo. La prueba sólo es positiva en aquellas lesiones en las que existe producción de partículas virales y, además, no es posible la identificación de los genotipos implicados (2, 125).

Existen también pruebas basadas en la producción de antisueros contra proteínas específicas virales, obtenidas por clonaje en bacterias de fragmentos específicos del genoma (2, 126). Aún hay que comprobar, sin embargo, si los anticuerpos conseguidos son realmente específicos para cada uno de los genotipos estudiados.

### **II. DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS**

Basadas en la hibridación del ADN de la célula infectada con el ADN (o ARN) viral marcado, que recibe el nombre de **sonda**. Para evitar reacciones inespecíficas se recomienda la separación de dichas sondas de los vectores bacterianos en los que se clonan para permitir su amplificación, ya que las muestras clínicas suelen estar contaminadas con ADN bacteriano.

El marcaje de las sondas puede ser isotópico o pueden utilizarse moléculas detectables por reacciones enzimáticas (biotina, digoxigenina, etc).

#### **1. SOUTHERN-BLOT**

El ADN celular se digiere con una enzima de restricción, separándose los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel

de agarosa. Tras un paso de desnaturalización, dichos fragmentos se transfieren a un filtro de nylon o nitrocelulosa y se procede a la hibridación (127)

Esta técnica tiene una alta sensibilidad (pueden detectarse entre 0,1 y 0,001 copias por célula) y permite conocer el estado del genoma viral, aunque tiene la desventaja de ser larga y laboriosa (2). Existe una variante (*blot inverso*), consistente en la fijación al filtro del ADN viral no marcado, que se hibrida con ADN genómico marcado. La ventaja de este método consiste en que en un solo experimento puede determinarse la positividad de una muestra a numerosos genotipos de PVH. Su sensibilidad máxima es de unas 5 copias por célula (128).

## 2. 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 también tiene una variante en la cual, las células infectadas se fijan sobre el filtro y se desnaturalizan, sin extraer el ADN, pasando a la hibridación (129). 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.

## 3. HIBRIDACION IN SITU

Realizada directamente sobre secciones tisulares, esta técnica permite localizar exactamente el genoma viral, preservando la morfología celular. Su sensibilidad es, sin embargo, inferior a las anteriores (entre 20 y 50 copias por

célula dependiendo del tipo de marcaje) (2). Recientemente Nuovo y cols. han desarrollado un método mediante el cual se amplifican secuencias de HPV dentro de la misma sección (130) y que permite detectar hasta una copia de genoma viral por célula.

#### 4. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Desarrollada recientemente (131, 132), consiste en la amplificación de secuencias específicas de ADN mediante ciclos sucesivos de desnaturalización-apareamiento de iniciadores-amplificación, gracias a la acción de una polimerasa termoestable dependiente de iones  $Mg^{++}$ . Esta enzima, denominada **polimerasa Taq**, debe su nombre a la bacteria *Thermus aquaticus*, de la que fue aislada. Su temperatura óptima de reacción oscila entre los 70 y los 80°C, por lo que no se destruye durante las fases de desnaturalización y, además, se impide la actuación inespecífica de polimerasas celulares. De esta forma, el número de secuencias de ADN aumenta de forma exponencial con cada ciclo de amplificación, pudiendo llegar a detectarse una secuencia por cada 100.000 células (2).

Para la amplificación de secuencias de PVH pueden utilizarse iniciadores consenso (2, 133) o iniciadores específicos para cada genotipo (134). Los primeros tienen la ventaja de que permiten la detección de un gran número de genotipos de PVH e incluso de algunos nuevos o no secuenciados por ser complementarios a secuencias situadas dentro de genes muy conservados, como E1 o L1. También se han diseñado iniciadores de este tipo complementarios a zonas de la región E6/E7 (135, 136), pero su eficacia disminuye al existir diferencias de secuencia entre

distintos PVH. Los iniciadores específicos se utilizan para detectar la presencia de genotipos concretos de PVH y como método de confirmación de los resultados obtenidos con los iniciadores consenso.

Tras la amplificación, el producto obtenido (amplión) se visualiza fácilmente en geles de agarosa o poliacrilamida. Si se han utilizado iniciadores consenso, es necesaria su identificación mediante hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas (133), digestión con enzimas de restricción (137) o nueva amplificación con iniciadores tipoespecíficos (138).

En cualquier caso, la extraordinaria sensibilidad de esta técnica hace que deban exptremarse las precauciones a la hora de procesar las muestras y preparar la mezcla de reacción, ya que cualquier contaminación con secuencias problema dará lugar fácilmente a falsos positivos.



## TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

La únicas medidas eficaces de prevención de las infecciones por papilomavirus son las tendentes a reducir el riesgo de contagio sexual. Al no haberse identificado los determinantes inmunogénicos capaces de generar anticuerpos protectores no se han desarrollado, por el momento, vacunas efectivas.

En cuanto al tratamiento de estas infecciones, los métodos empleados más utilizados son los siguientes:

### 1. AGENTES CITOTOXICOS

- **Podofilina:** Resina de *Podophyllum peltatum* o *P. emedi*. Se trata de un poderoso antimitótico, pero debe administrarse con precaución por sus efectos irritantes (139).

- **5-Fluorouracilo (5-FU):** Inhibe la síntesis de ADN (139).

### 2. METODOS DESTRUCTIVOS

- Electrocoagulación
- Crioterapia (con N<sub>2</sub> líquido o hielo seco)
- Vaporización con laser
- Cirugía (139).

### 3. INTERFERON

El tratamiento con interferon se ha aplicado con éxito en lesiones genitales (1), aunque su eficacia parece disminuir en portadores sanos de VIH . Sin embargo, los buenos resultados obtenidos en estas infecciones no pueden hacerse extensivos a los papilomas respiratorios (1).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **I. PACIENTES Y MUESTRAS**

#### **1. PACIENTES**

Se ha estudiado la presencia de ADN de PVH en un total de 345 mujeres distribuidas en dos grupos:

##### **1.1. Grupo Patológico (GP)**

Constituido por 96 pacientes con signos clínicos y/o citológicos sugestivos de infección por PVH, procedentes del Servicio de Ginecología y Obstetricia y del Centro de Enfermedades de Transmisión Sexual (C.E.T.S.) del Hospital Universitario de San Carlos.

##### **1.2. Grupo Normal (GN)**

Formado por 249 mujeres que acudían a revisión ginecológica, sin alteraciones citológicas o clínicas relacionadas con presencia de PVH. Dichas mujeres procedían de un centro de planificación familiar de Guadalajara, de la Asociación Española contra el Cáncer y del Hospital de Madrid.

Todas las pacientes contestaron cuestionario donde se recogían diversos datos epidemiológicos y demográficos como edad de la primera relación sexual, consumo de tabaco, antecedentes de E.T.S., utilización de anticonceptivos orales, etc.

## **2. MUESTRAS**

Los tipos de muestra tomados para este estudio y su distribución en los grupos estudiados fue la siguiente:

### **2.1. Grupo Patológico:**

- Exudado endocervical (en 80 mujeres)
- Lavado cervicovaginal (en 73 mujeres)
- Biopsia cervical (en 63 mujeres)
- Biopsia vulvar (en 68 mujeres)

### **2.2. Grupo Normal:**

- Exudado endocervical (249 mujeres)

Todas las muestras se tomaron bajo control colposcópico. Las biopsias se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, conservándose a -70°C hasta el momento de la extracción del ADN. Los exudados se incluyeron en un medio de transporte especial (Vira Pap Specimen Collection Kit -IZASA; BRL-), congelándose, junto con los lavados, a -20°C hasta su procesamiento.

## **II. TÉCNICAS**

### **1. EXTRACCION DEL ADN**

Los exudados endocervicales y los lavados se repartieron en alícuotas de 500 ul, añadiéndose 33 ul de SDS al 22% y 20 ul de una sol de 6 mg/ml de proteinasa K. La mezcla se incubó durante una hora a 37°C y se purificó mediante una extracción con fenol y otra con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Para precipitar el ADN se añadieron al sobrenadante final 50 ul de acetato sódico

3M (pH= 5,5) y dos volúmenes de etanol absoluto, manteniéndose a -20°C al menos dos horas.

Las biopsias fueron troceadas y resuspendidas en 2 ml de tampón de lisis (EDTA 10mM, NaCl 100mM, SDS al 1% y Tris HCl 10 mM, pH= 7,5), al que se añadieron unos 15 ul de una solución de 20 mg/ml de proteinasa K. La mezcla se incubó a 65°C 2-3 horas o a 37°C toda la noche. Las proteínas se eliminaron añadiendo 600 ul de una solución de NaCl 6M y centrifugando a unas 3000-3500 rpm durante 15 minutos para favorecer su sedimentación. El sobrenadante se decantó en otro tubo y se sometió a dos centrifugaciones más. El ADN se precipitó en unos 20 minutos añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente.

Tras una nueva centrifugación, las muestras se aspiraron mediante vacío y se dejaron secar al aire para eliminar los restos de etanol, resuspendiéndose en agua destilada estéril.

## 2. PCR

### 2.1. Preparación de la mezcla de reacción

Los reactivos y concentraciones utilizados fueron los siguientes:

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	VOLUMEN POR TUBO	CONCENTRACION FINAL
MY09	50 uM	5 ul	2,5 uM
MY11	50 uM	5 ul	2,5 uM
Tampón de reacción	10X <sup>1</sup>	10 ul	1X
dATP	10 mM	2 ul	200 uM
dGTP	10 mM	2 ul	200 uM
dCTP	10 mM	2 ul	200 uM
dTTP	10 mM	2 ul	200 uM
Polimerasa Taq	5 U/ul	0,5 ul	2,5 U
H <sub>2</sub> O destilada estéril	--	hasta 100 ul <sup>2</sup>	--
ADN	--	--	1 ug (aprox.)

<sup>1</sup> Composición: KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, Tris 100 mM; pH= 8,5.

<sup>2</sup> Hay que tener en cuenta el volumen de ADN.

Para reducir el riesgo de contaminaciones y errores debidos al pipeteo de los reactivos, se calculó la mezcla de reacción necesaria para todos los tubos incluidos en la reacción, teniendo en cuenta las concentraciones finales y excluyendo muestras y controles. La mezcla se repartió en los tubos añadiéndose, posteriormente, las muestras y los controles. La preparación se cubrió con 50-100 ul de aceite mineral, para evitar condensaciones que pudieran alterar la amplificación (este paso puede realizarse en primer lugar, antes de la adición de la mezcla, precipitándose los reactivos por centrifugación breve).

Los controles utilizados fueron los siguientes:

- **Control negativo:** La ausencia de contaminaciones se comprobó incluyendo un tubo con todos los componentes de la mezcla de reacción y agua en lugar de ADN.
  
- **Control interno:** Para verificar la ausencia de inhibidores de la reacción y la presencia de suficiente ADN, también se añadieron a la mezcla los iniciadores PC04 y GH20 (Perkin-Elmer), específicos del gen de la beta-globina, que dan lugar a un amplicón de 268 pb.
  
- **Control positivo de PVH:** Plásmidos portadores de los genomas de PVH-18 y PVH-33. Dichos plásmidos se utilizaron para transformar la cepa DH5-alfa de *E. coli*, extrayéndose mediante métodos convencionales (140)

## 2.2. Amplificación

Se realizaron 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constaba de los siguientes pasos:

- **Desnaturalización:** 95°C, 1 minuto
- **Apareamiento de los iniciadores:** 37°C, 2 minutos
- **Polimerización:** 72°C, 1,5 minutos

La reacción se completó con un ciclo adicional en el que la fase de polimerización se prolongó durante 5 minutos. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se consideraron positivas aquellas muestras que presentaron una banda de 400-500 pb. (Fig 4).

## 3. IDENTIFICACION DE GENOTIPOS DE PVH

### 3.1. Marcaje de sondas específicas.

Las sondas MY12, MY13, MY14, WD74 y MY16, específicas para PVH-6, 11, 16, 18 y 33 respectivamente (133) se marcaron mediante una técnica no isotópica para oligonucleótidos desarrollada por Schmitz *et al* (141). Este método consiste en la adición de uno o varios nucleótidos marcados con digoxigenina al extremo 3'-OH de la secuencia, gracias a la acción de una **transferasa terminal**, en presencia de iones Co. Cuando se añade un solo nucleótido, la molécula utilizada es la digoxigenin-di-desoxiuridina-trifosfato (DIG-dd-UTP), mientras que en las reacciones de adición múltiple (*tailing*) se utiliza digoxigenin-desoxiuridina-trifosfato (DIG-d-UTP). El ADN marcado se detecta mediante una reacción enzimática

(ver apartado 3.3.).

La reacción se llevó a cabo utilizando un kit de Boehringer-Manheim, según los siguientes pasos:

1. Preparación de la siguiente mezcla de reacción:

- 4 ul de tampón de reacción
- 4 ul de solución de  $\text{CoCl}_2$
- 1 ug de oligonucleótido
- 1 ul de mezcla de dNTPs, con DIG-d-UTP.
- 50 U de transferasa terminal.

2. Incubación a 37°C durante una hora

3. Frenado de la reacción con 2 ul de una mezcla de glucógeno y EDTA 0,2M, pH= 8.

4. Precipitación del oligonucleótido marcado con etanol absoluto y LiCl 4M.

### 3.2. Hibridación

La hibridación se llevó a cabo mediante la técnica de *Dot-blot*. Se tomaron 10 ul de las muestras y se diluyeron en 500 ul de agua estéril, transfiriéndose 75 ul de esta dilución a filtros de nylon (Boehringer-Manheim) mediante vacío.

Para comprobar la sensibilidad de la deección se prepararon diluciones seriadas (de 1/50 a 1/3200) del amplicón obtenido de PVH-1. Dichas diluciones se incluyeron, junto con el amplicón de PVH-33 en todos los filtros con objeto de verificar, además,

la especificidad de las sondas empleadas.

Tras la transferencia mediante vacío se procedió según los siguientes pasos:

1. **Fijación** del ADN a la membrana mediante calor (120°C, 30 minutos).
2. **Prehibridación** a 68°C durante una hora con una solución compuesta de SSC 5X, N-Lauroylsarcosina al 0,1%, SDS al 0,02% y reactivo bloqueante (Boehringer-Manheim) al 1%.
3. **Hibridación** a 54°C durante al menos 6 horas con 50 ng de sonda por ml de la solución anterior.
4. **Lavado** de los filtros, dos veces con SSC 2X y SDS al 0,1% y dos veces con SSC 0,1X y SDS al 0,1%, a la temperatura de hibridación.

### 3.3. Detección

Para el revelado de la reacción se utilizó un *kit* de detección de Boehringer-Manheim, siguiéndose las instrucciones del fabricante: el filtro se bloqueó durante 30 minutos y se incubó en una solución 1/5000 de fragmento Fab-anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina. Posteriormente se adicionaron los dos sustratos de esta enzima: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y sal de nitro-azul de tetrazolio (NBT, del inglés *nitroblue tetrazolium*). Si la reacción es positiva, ambos compuestos dan lugar a un precipitado azulado (Figura 5)

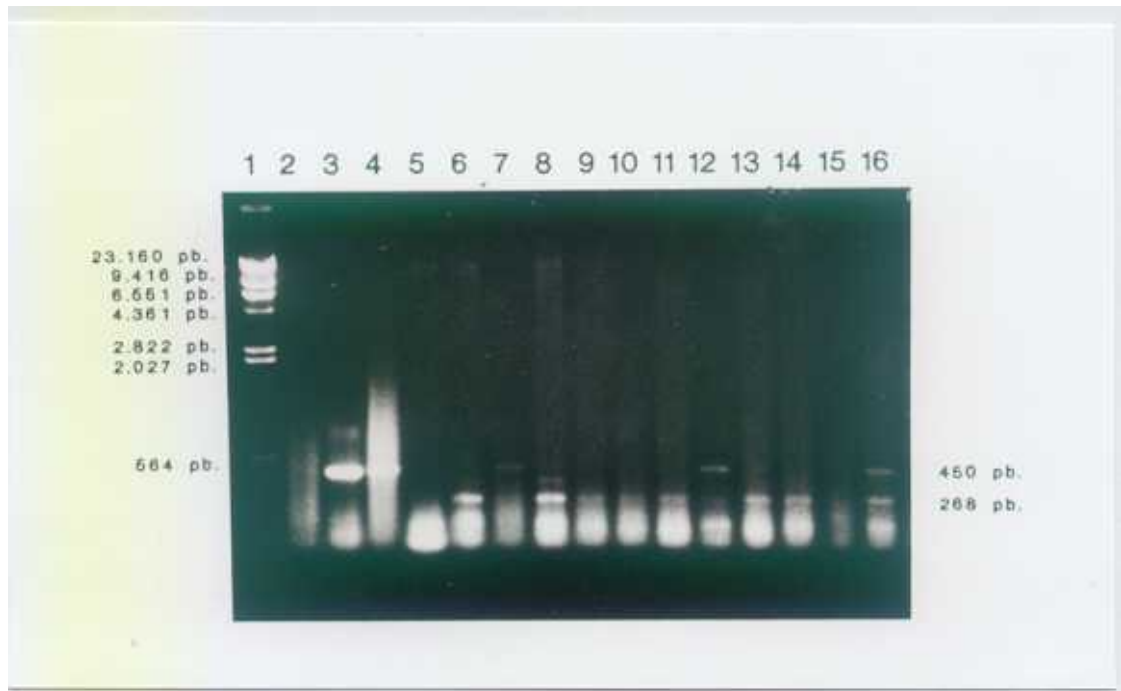


### III. ANALISIS ESTADISTICO

Las pruebas estadísticas utilizadas para el tratamiento de los resultados han sido el test de la  $X^2$  y el test de homogeneidad de muestras (comparación de medias y de porcentajes), para datos no apareados. En todos los casos se fijó un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

Por otra parte, con el fin de comprobar si las mujeres infectadas por PVH tenían mayor riesgo de presentar ciertas alteraciones clínicas y/o citológicas en tracto genital que las no infectadas, hemos realizado un estudio retrospectivo (casos-control). En él hemos determinado la  $X^2$ , la Odd Ratio (O.R.) y el intervalo de confianza (95%) para la O.R. poblacional.

También se ha estudiado de forma análoga la relación entre la presencia de dichas alteraciones y otros factores como consumo de tabaco, utilización de anticonceptivos orales, antecedentes de E.T.S., aparición de otras infecciones, etc, con objeto de comparar su influencia con la de la infección por PVH (142).



**FIGURA 4: PCR para detección de PVH**

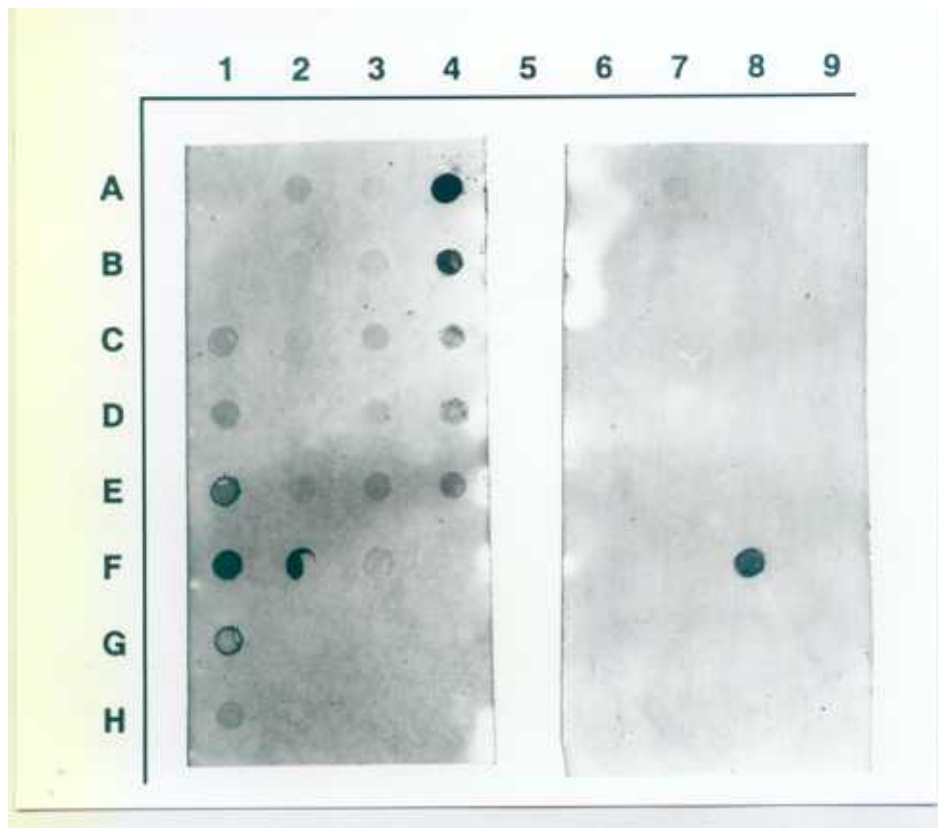
**Pocillo 1: fago lambda digerido con HindIII**

**Pocillo 2: control negativo**

**Pocillos 3 y 4: plásmidos de PVH-33 y 18**

**Pocillos 5 a 16: muestras clínicas.**

**(la banda de 450 pb indica positividad; la banda de 268 pb corresponde al producto del gen de la beta-globina)**



**FIGURA 5: Detección de productos de PCR de PVH mediante oligonucleótidos marcados con digoxigenina.**  
**Filtro izquierdo: sonda WD74 (PVH-18)**  
**Filtro derecho: sonda MY16 (PVH-33)**  
 (Filas 4 y 9, diluciones seriadas de amplicon de PVH-18; pocillos F3 y F8, amplicón de PVH-33)

## RESULTADOS

### **I. METODO**

Se detectó ADN hasta la dilución 1/800 del amplicón de PVH-18, correspondiente a 4,02 ng de ADN.

Ninguno de los controles utilizados en la hibridación (PVH-18 y 33) fue positivo al reaccionar con las sondas específicas de los PVH estudiados (Figura 4)

### **II. DATOS OBTENIDOS.**

En la Tabla III se recogen los porcentajes de positividad en las muestras de exudado de las mujeres del grupo normal y patológico (1,20% y 11,25% respectivamente).

#### **1. GRUPO NORMAL (GN)**

Sólo tres de las mujeres de este grupo fueron positivas para PVH. En una de ellas el genotipo encontrado fue PVH-18, mientras que en las otras dos fue indeterminado.

#### **2. GRUPO PATOLOGICO (GP)**

Hubo 41 mujeres que presentaron alguna muestra positiva en este grupo (42,7%). Las frecuencias obtenidas en cada uno de los tipos recogidos se muestra en la Tabla IV y en la Figura 6. Los más frecuentes fueron PVH-6 (en lavados), PVH-16, PVH-18 (en biopsias) y, en mucha mayor proporción, los PVH indeterminados (en todos los tipos de muestra).

Se diagnosticaron alteraciones citológicas en 29 de las mujeres positivas (23 tenían papiloma, 7 CIN-1, 11 CIN-2 y 6 CIN-

3). Al comprobar la distribución de los distintos genotipos de PVH en cada tipo de alteración (Figuras 7 a 12) se observó que los designados como indeterminados fueron siempre los más frecuentes, aunque PVH-18 destaca en las mujeres con CIN-1 y 2.

Los porcentajes de positividad observados en los distintos tipos de muestra de las mujeres positivas se recogen en la Tabla V. Las cifras más altas se obtuvieron en biopsias, siendo similares en cérvix y vulva. La prevalencia obtenida en lavados fue levemente superior a la observada en exudados.

Hubo 13 mujeres positivas simultáneamente en cérvix y vulva. En once de ellas (84,6%) coincidió alguno de los genotipos encontrados (en 7 totalmente y en 4 parcialmente) (Figura 13).

Cinco de las mujeres positivas presentaron ADN de PVH en exudado y lavado, coincidiendo en todas ellas los genotipos encontrados (Figura 14).

En 44 de las mujeres estudiadas pudieron obtenerse todos los tipos de muestra. Quince (34,1%) presentaron alguna muestra positiva, coincidiendo en 11 de ellas (73,3%) los genotipos de PVH en al menos dos muestras (Figura 15).

En la Tabla VI y en las Figuras 16, 17 y 18 se recogen los datos sobre distintos factores de riesgo para la aparición de alteraciones clínicas y/o citológicas.

Además de la infección por PVH, se encontraron diferencias significativas entre el GP (con alteraciones) y el GN (sin alteraciones) con respecto a consumo y dosis de tabaco, antecedentes de ETS, presencia de otros microorganismos (hallazgos microbiológicos) y edad de la primera relación sexual.

No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de mujeres que utilizaban anticonceptivos orales en uno y otro grupo.

	G.P.		G.N.	
PVH	Nº	%	Nº	%
6	1/80	1,3	0	0
11	0	0	0	0
16	0	0	0	0
18	1/80	1,3	1/249	0,4
33	1/80	1,3	0	0
IND	6/80	7,5	2/249	0,8
I.M.	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>9/80</b>	<b>11,3</b>	<b>3/249</b>	<b>1,2</b>

*I.M. = Infecciones mixtas*

*IND. = Indeterminado*

**Tabla III: Porcentajes de positividad frente a PVH en exudados de mujeres normales y patológicas**

		EXUDADO		LAVADO		B. CÉRVIX		B. VULVA	
PVH		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
6		1/80	1,3	2/72	2,7	2/63	3,2	2/68	2,9
11		0	0	0	0	0	0	1/68	1,4
16		0	0	1/72	1,4	3/63	4,8	3/68	4,4
18		1/80	1,3	0	0	2/63	3,2	2/68	2,9
33		1/80	1,3	1/72	1,4	0	0	0	0
IND		6/80	7,5	6/72	8,3	7/63	9,6	9/68	13,2
I.M.		0	0	0	0	8/63	12,7	7/68	10,3
TOTAL		9/80	11,3	10/72	13,9	22/63	34,9	24/68	35,2

*I.M. = Infecciones mixtas*

*IND. = Indeterminado*

**Tabla IV: Distribución de PVH en las distintas muestras del G.P.**



MUESTRA	NUMERO	POSITIVAS
Exudado	32	9 (28,1%)
Lavado	30	10 (33,3%)
B. cérvix	30	22 (73,3%)
B. vulva	31	23 (74,2%)

**Tabla V: Porcentajes de positividad en la muestras de las mujeres positivas del G.P.**

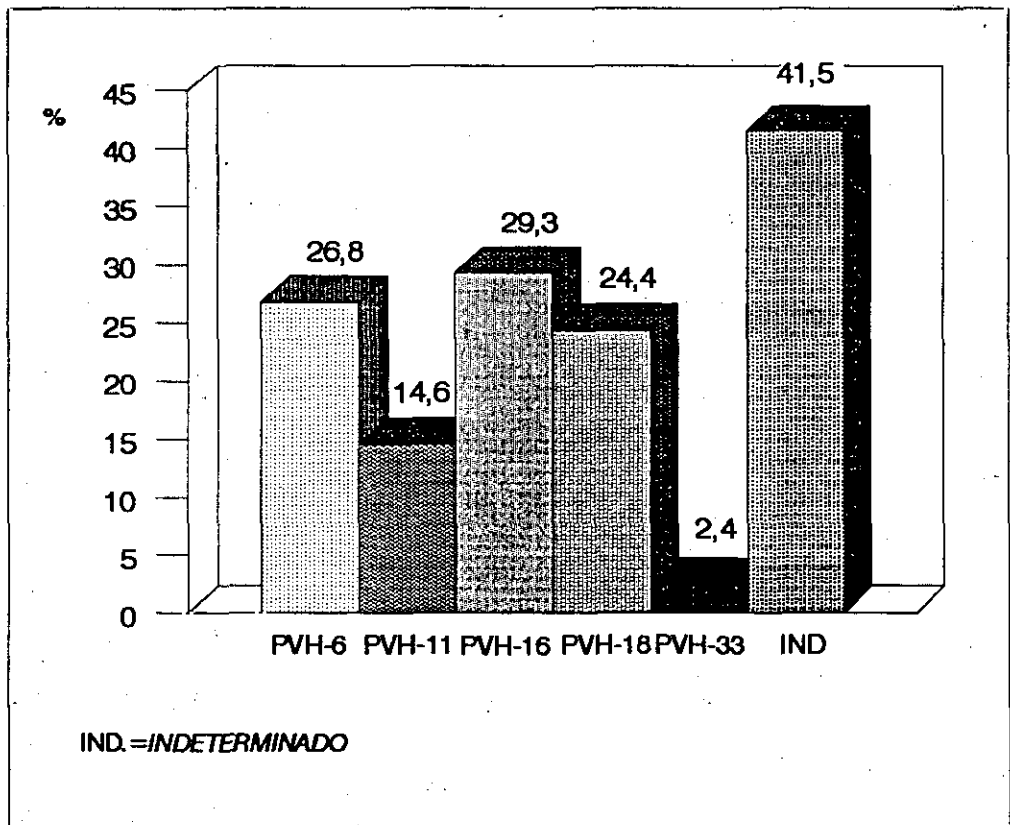


Figura 6 Distribución de genotipos de PVH en las mujeres positivas del GP.

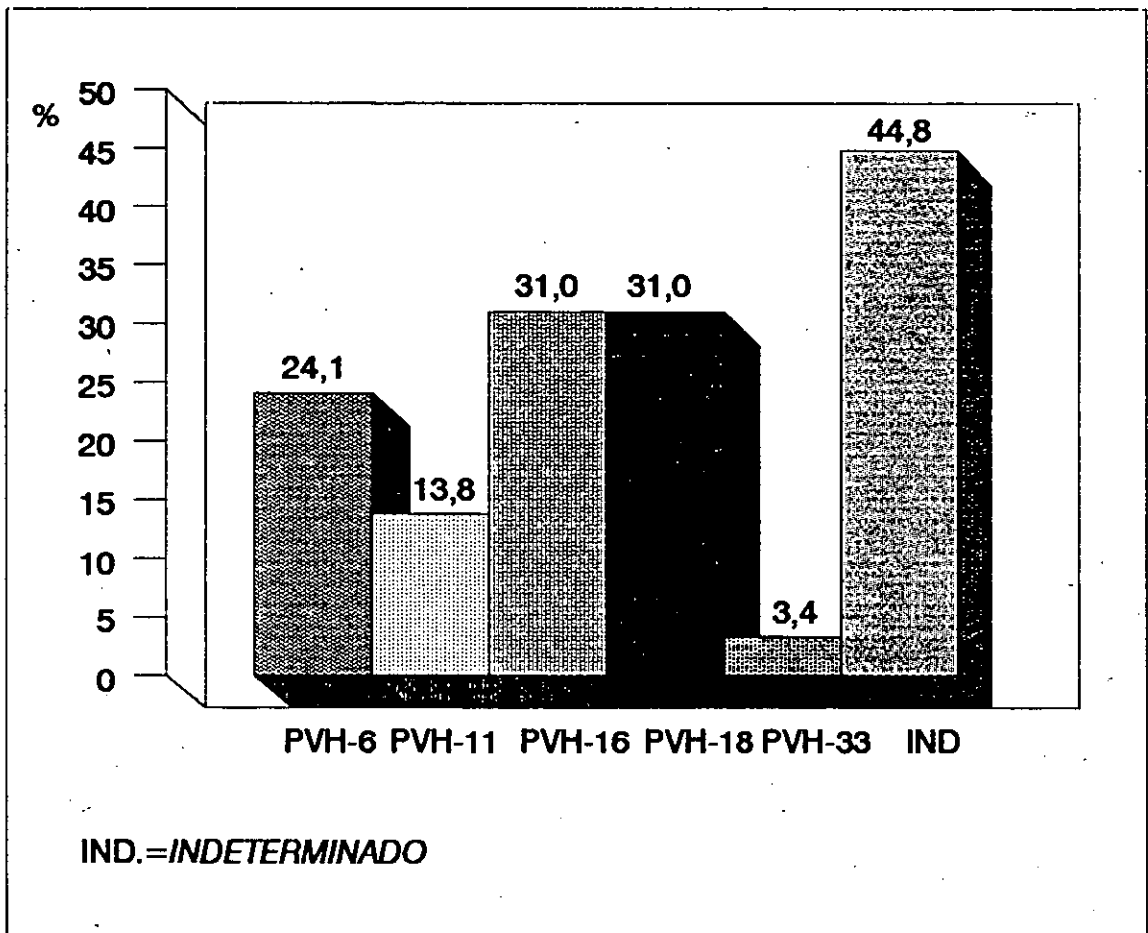


Figura 7 Distribución de genotipos de PVH en mujeres positivas con alteraciones citológicas.

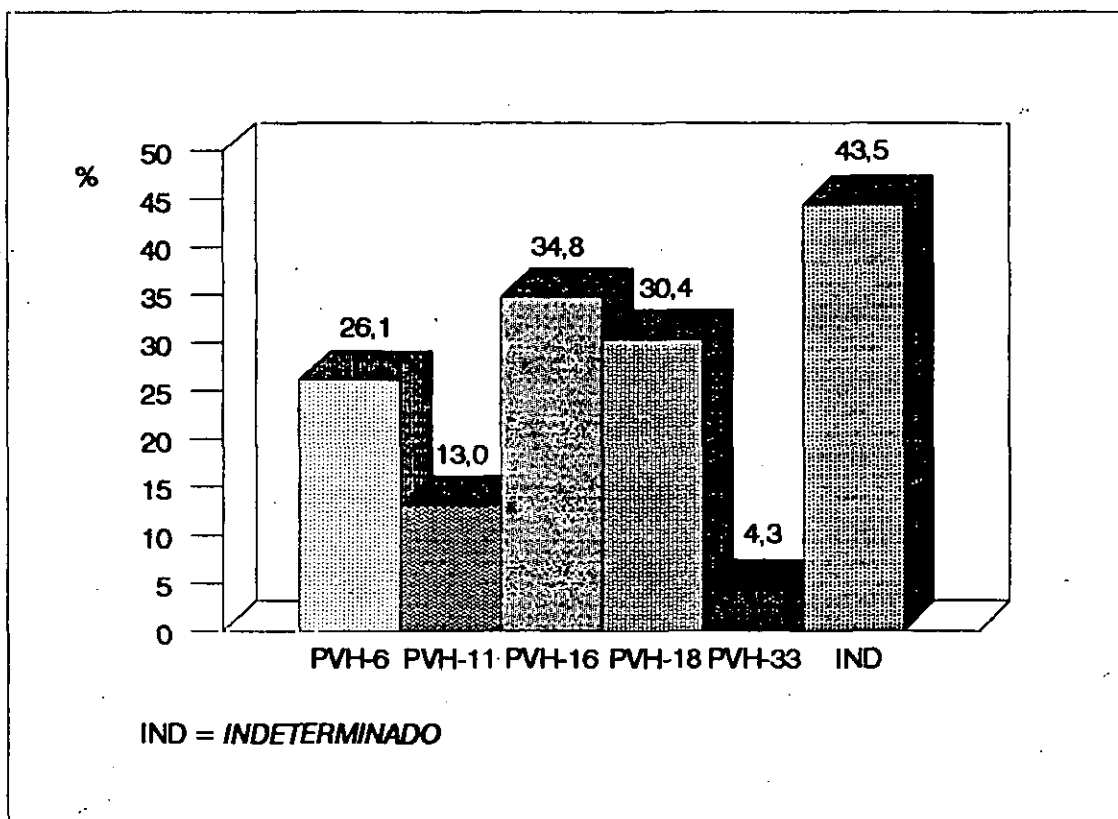


Figura 8 Distribución de genotipos de PVH en mujeres positivas con diagnóstico citológico de papiloma.

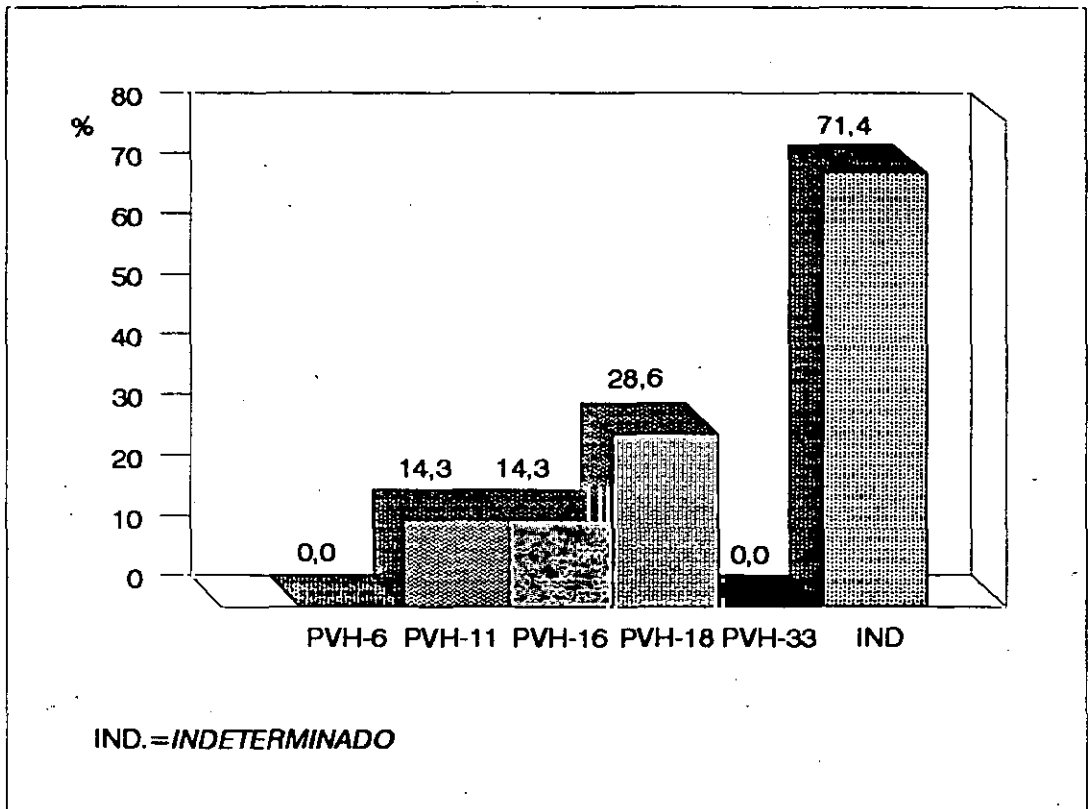


Figura 9 Distribución de genotipos de PVH en mujeres positivas con CIN-1.

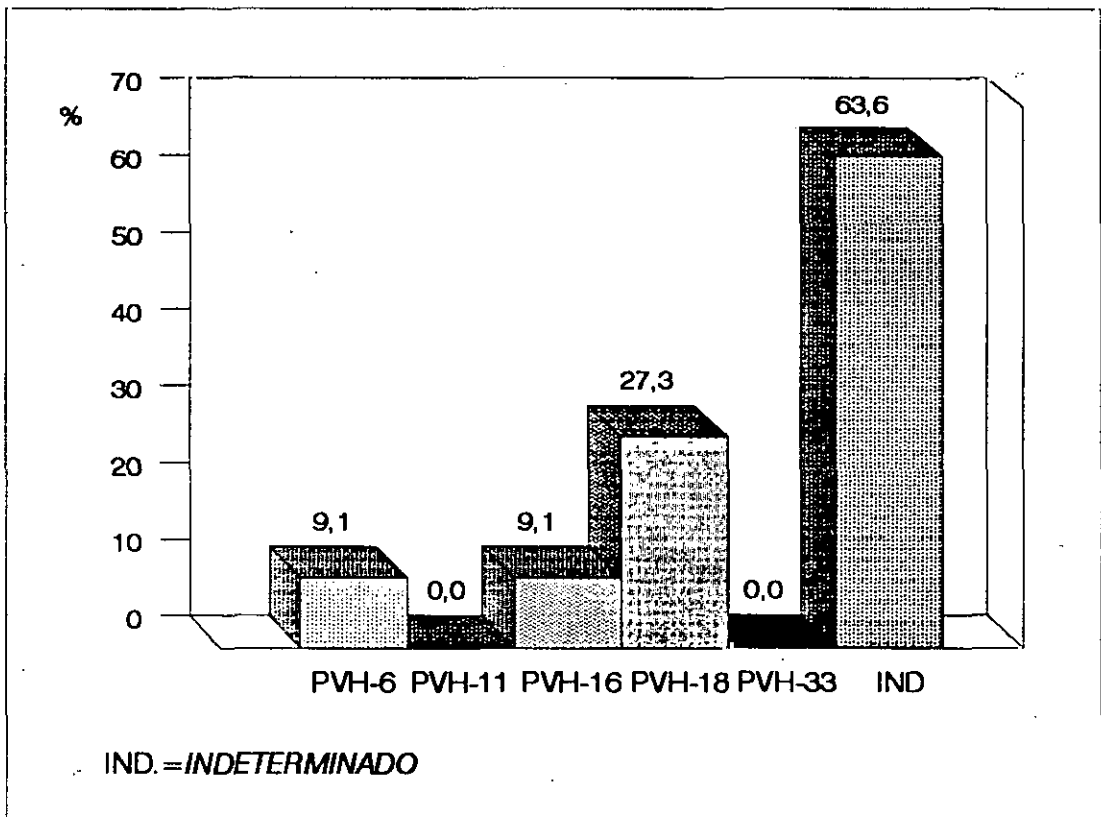


Figura 10 Distribución de genotipos de PVH en mujeres positivas con CIN-2.

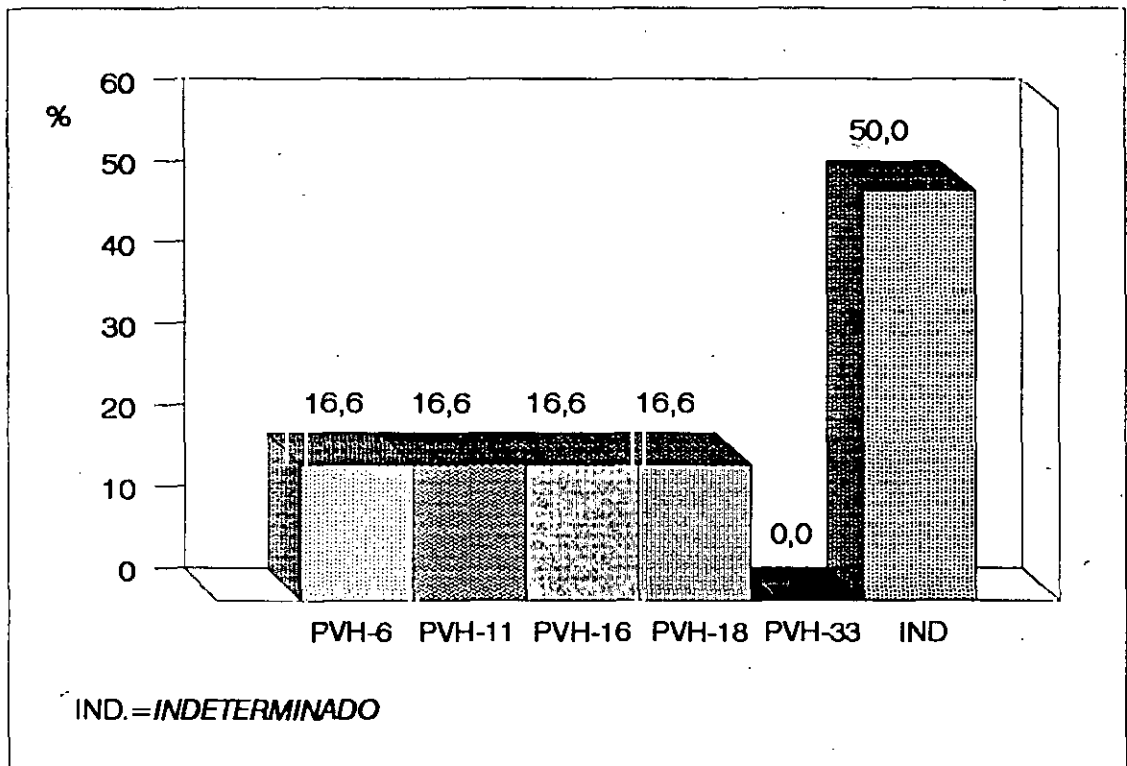
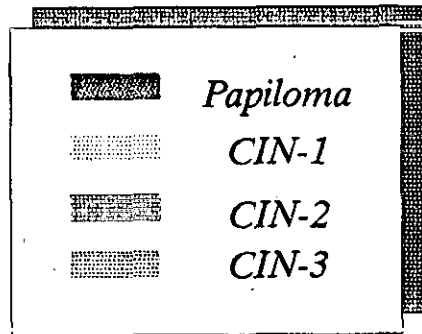


Figura 11: Distribución de genotipos de PVH en mujeres positivas con CIN-3.



IND. = Indeterminado

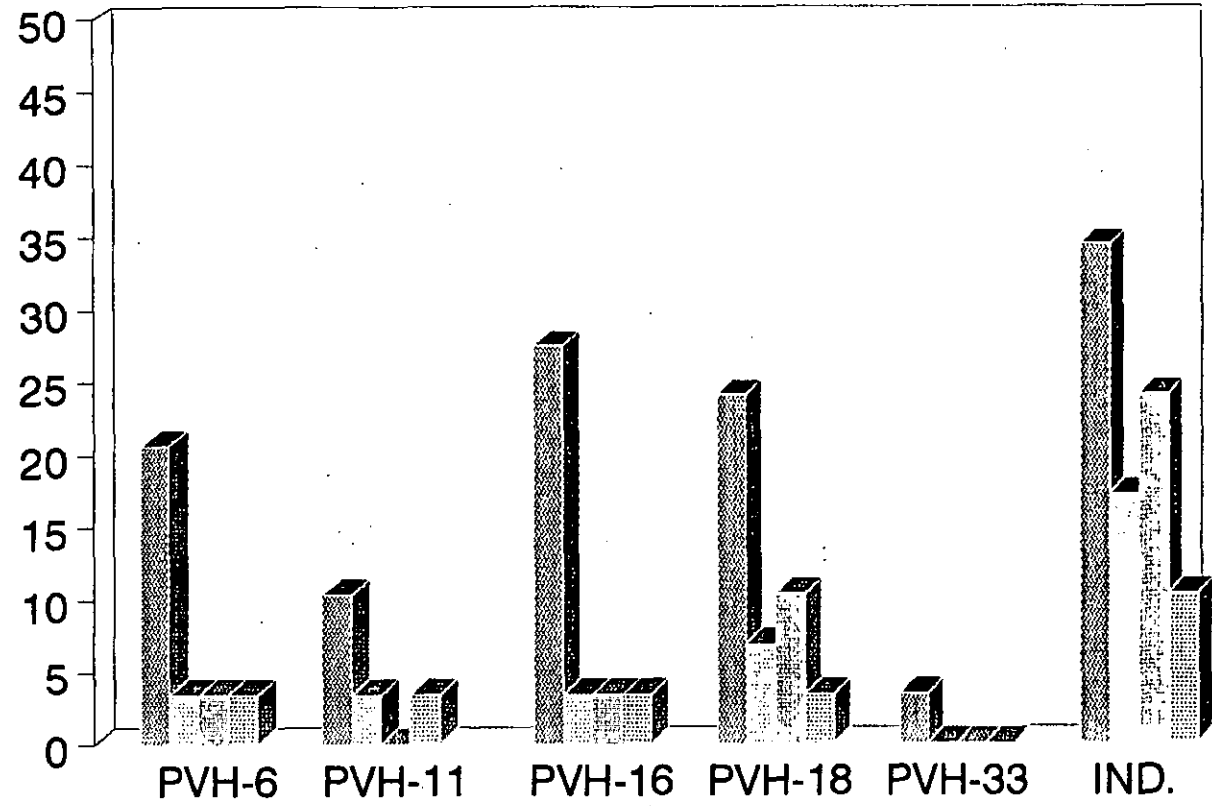


Figura 12 Distribución de genotipos de PVH en las distintas alteraciones citológicas.



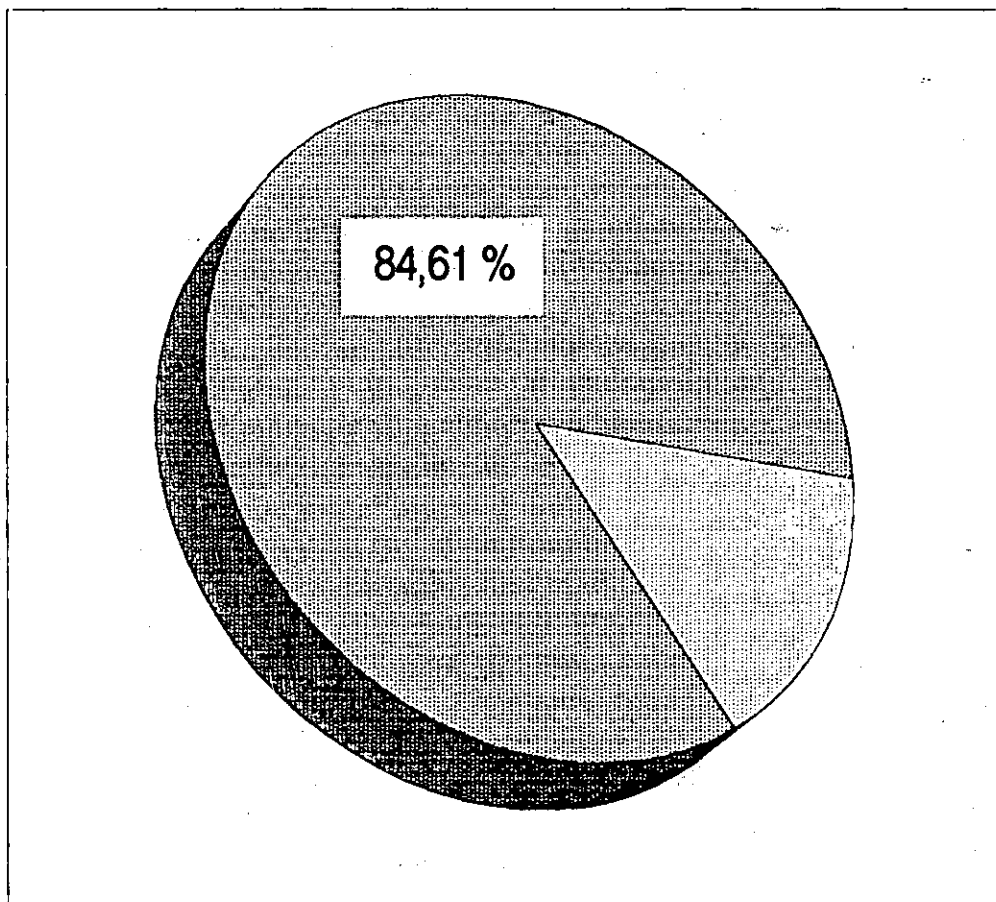


Figura 13 Coincidencia de genotipos de PVH en mujeres positivas en cervix y vulva.

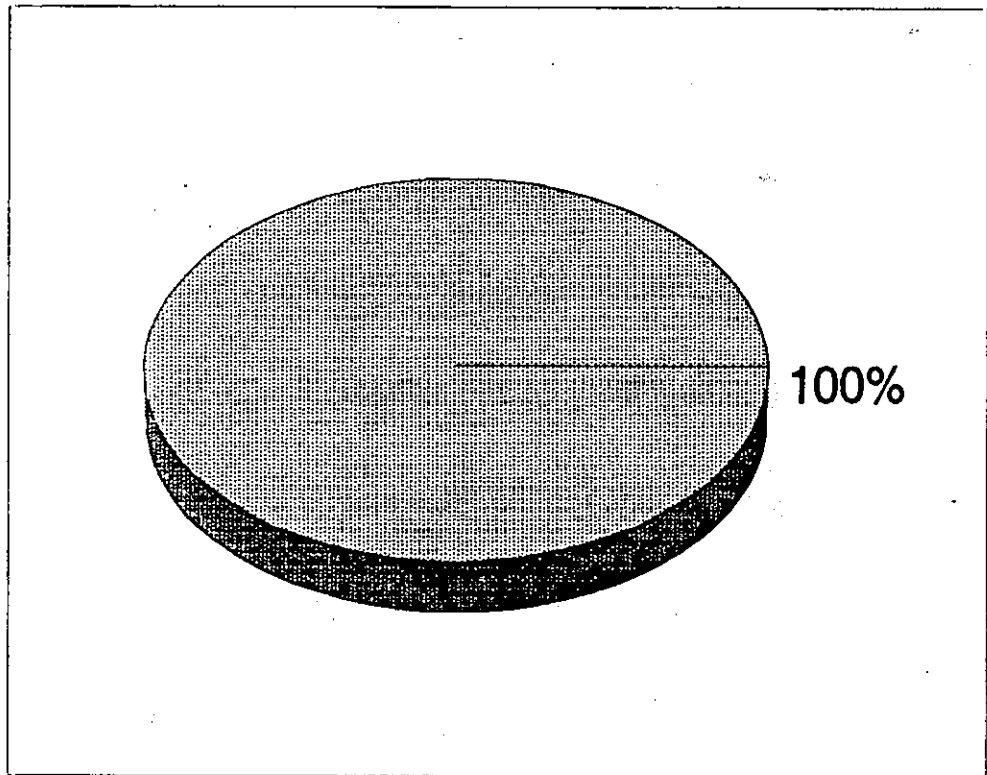


Figura 14 Coincidencia de genotipos de PVH en mujeres positivas en exudados y lavados.

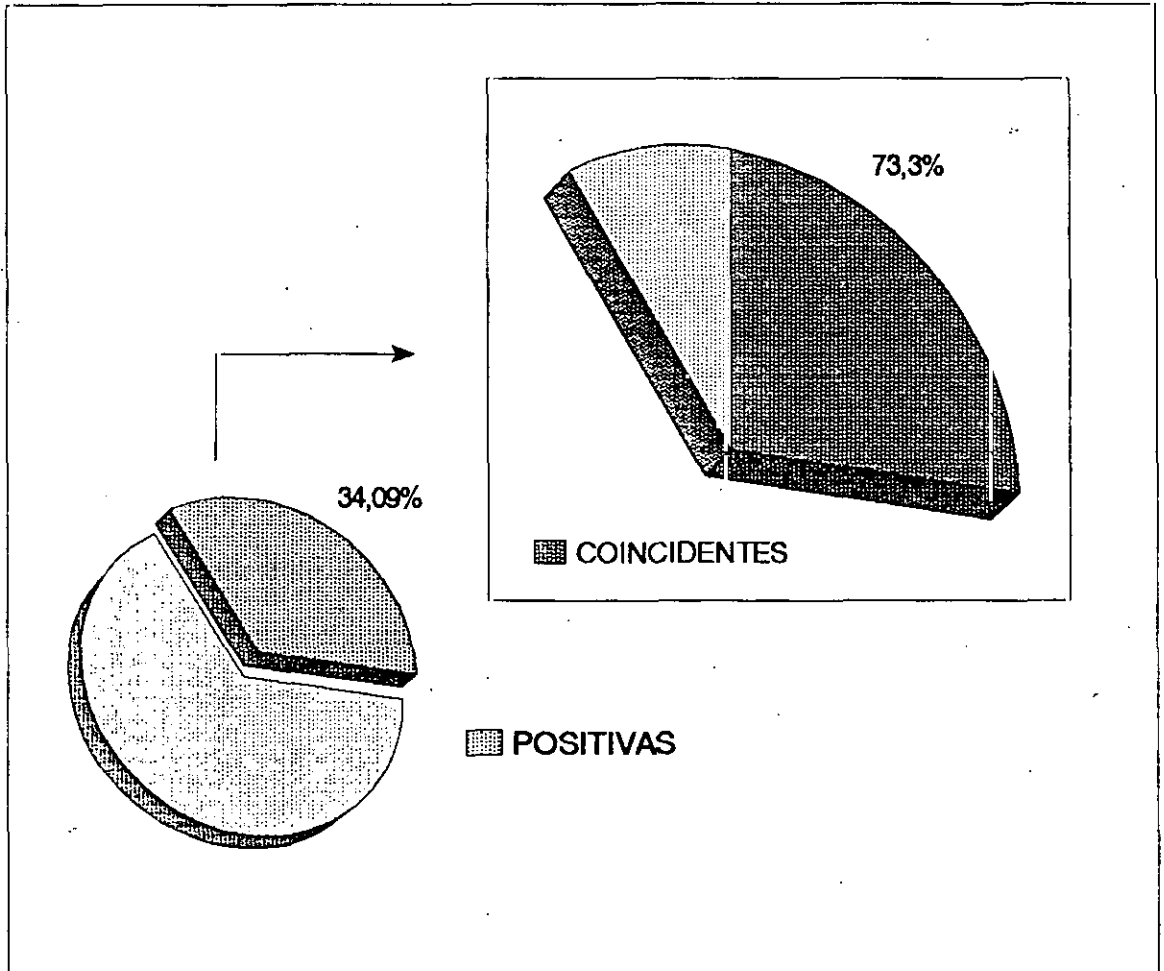


Figura 15 Grupo de mujeres con todas las muestras: coincidencia de genotipos de PVH.

<b>F. RIESGO</b>	<b>GN</b>	<b>GP</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>R(DE)</b>	<b>IC</b>	<b>X<sup>2</sup></b>
<b>PVH</b>	<b>11,3%</b>	<b>1,20%</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>10,39</b>	<b>90%</b>	<b>3,004-31,22</b>	<b>17,38</b>
<b>TABACO</b>	<b>41,22%</b>	<b>69,79%</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>3,29</b>	<b>70%</b>	<b>1,82-5,96</b>	<b>15,47</b>
<b>ANTEC. ETS</b>	<b>35,52%</b>	<b>77,08%</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>6,10</b>	<b>84%</b>	<b>1,44-25,76</b>	<b>46,61</b>
<b>H. MICROB.</b>	<b>14,03%</b>	<b>26,04%</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>2,15</b>	<b>53%</b>	<b>1,20-3,84</b>	<b>6,69</b>
<b>AC</b>	<b>46,2%</b>	<b>57,3%</b>	<b>N.S.</b>	<b>1,56</b>	<b>36%</b>	<b>2,5-0,97</b>	<b>3,42</b>

OR = ODD RATIO  
R(DE) = Riesgo atribuible  
IC = Intervalo de confianza

**Tabla VI: Incidencia de distintos factores de riesgo en las mujeres estudiadas. (asociación =  $X^2 > 3,84$ )**

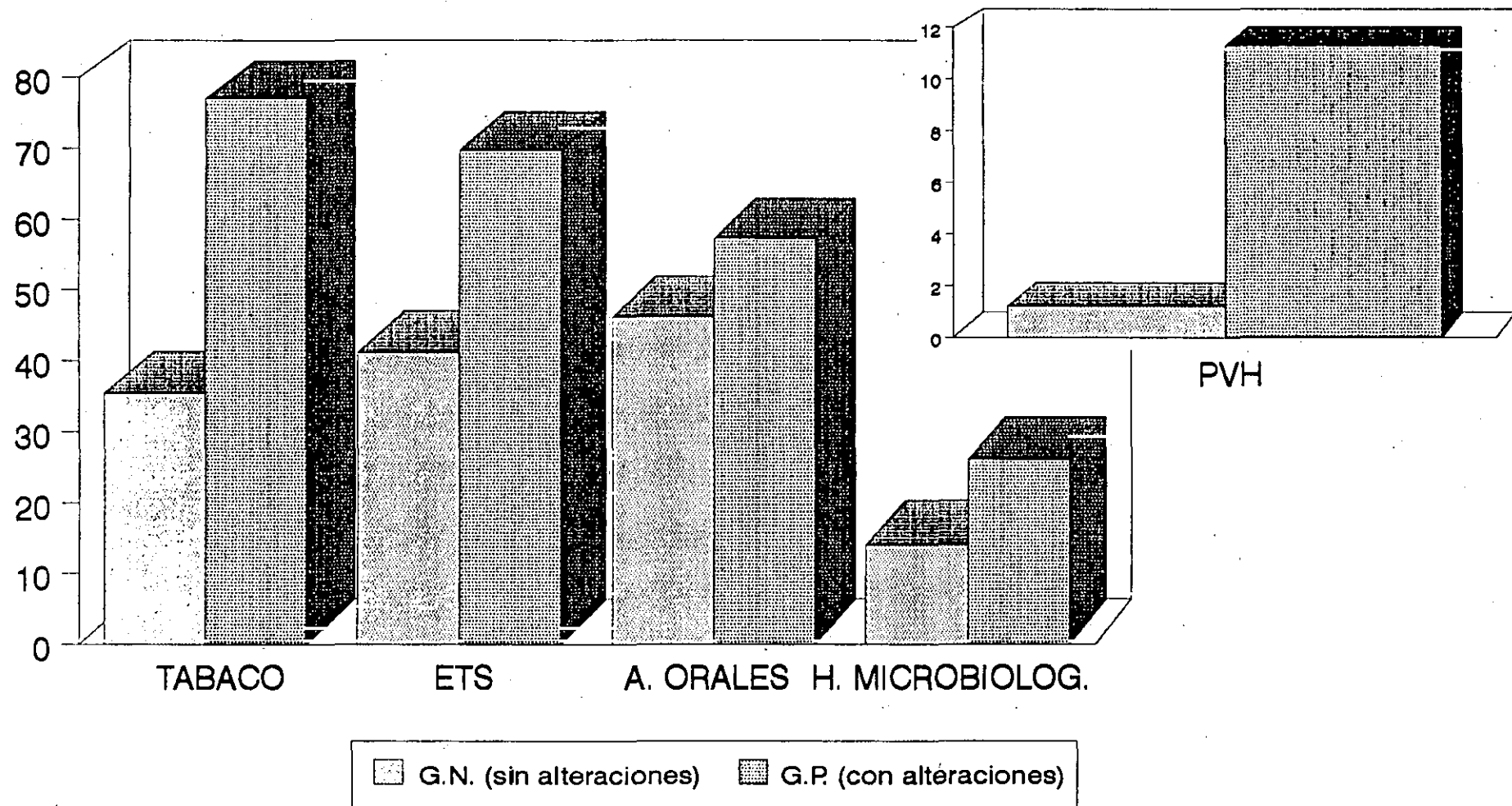


Figura 16 Relación de distintos factores de riesgo con la aparición de alteraciones clínicas y/o citológicas en tracto genital femenino.

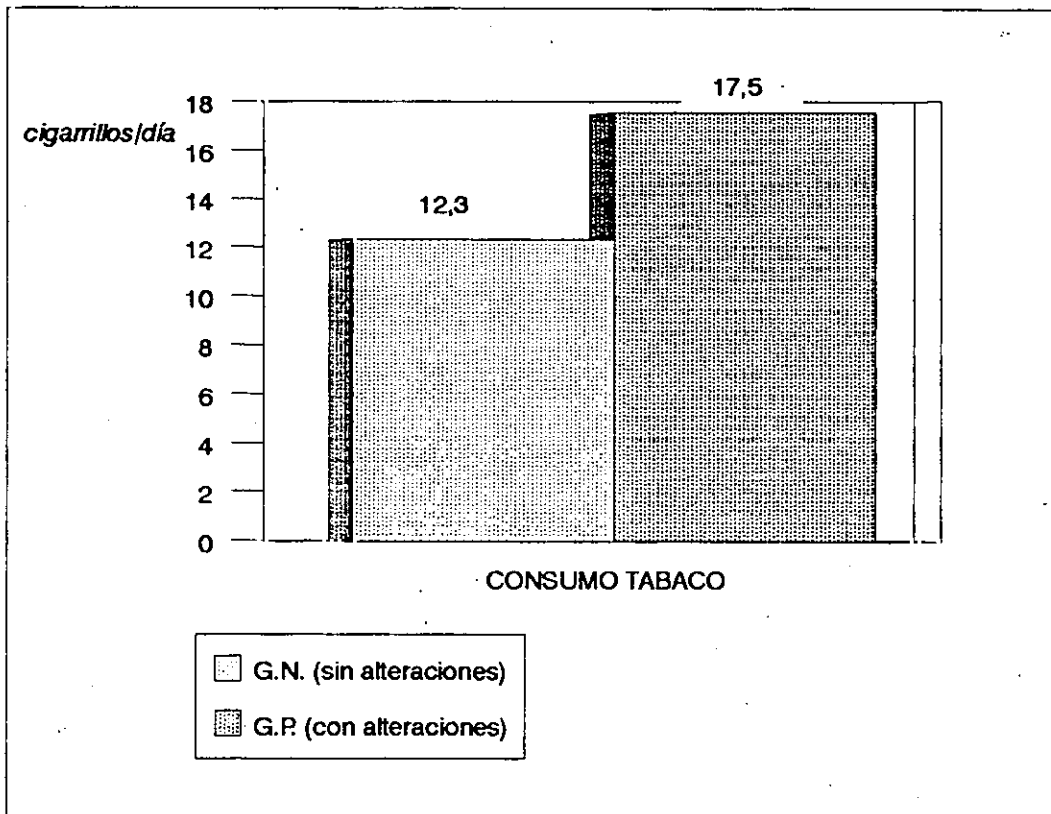


Figura 17 Relación entre consumo de tabaco (dosis) y aparición de alteraciones clínicas y/o citológicas en tracto genital femenino.

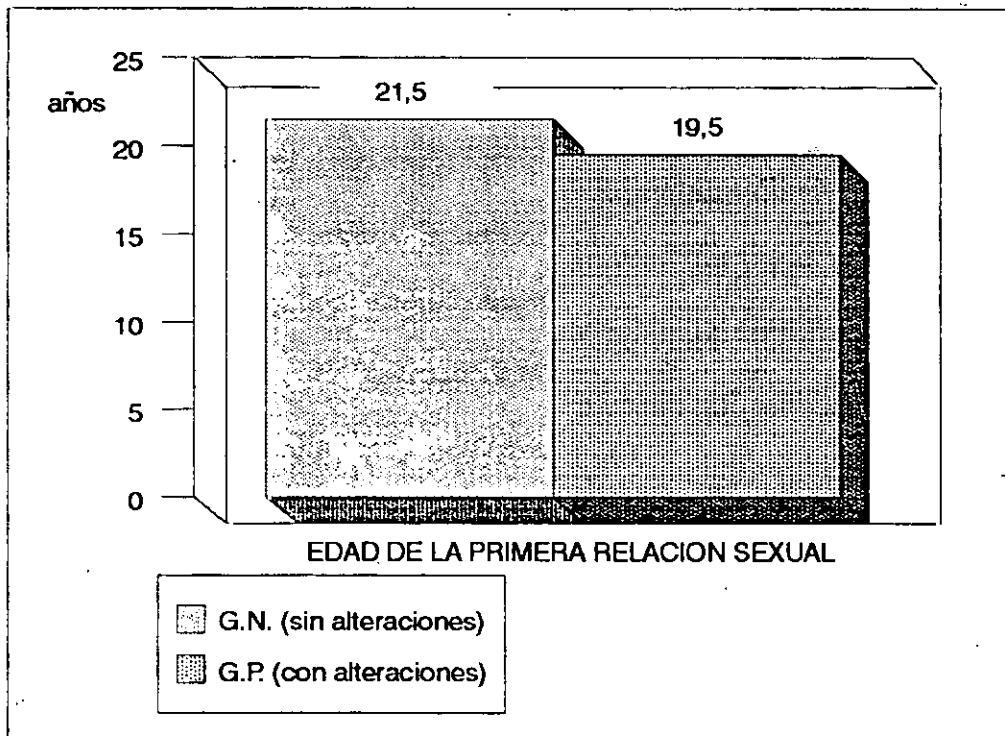


Figura 18: Relación entre edad de la primera relación sexual y aparición de alteraciones clínicas y/o citológicas en tracto genital femenino.

## DISCUSION

### **I. TECNICA**

Mediante el empleo de las sondas oligonucleotídicas marcadas con DIG-d-UTP fuimos capaces de detectar 4,02 ng de ADN en la hibridación posterior a la PCR. Schmitz et al (141) consiguen con este mismo método sensibilidades de hasta 50 pg.

A la gran sensibilidad descrita para este método en la bibliografía hay que añadir su rapidez: la reacción colorimétrica que se lleva a cabo al final del proceso (ver "Material y Métodos") tiene lugar en unas horas (a veces en unos minutos), mientras que para las autorradiografías el filtro debe estar expuesto a las películas fotográficas durante varios días.

También hay que considerar la mayor vida media de las sondas no isotópicas (varios años) frente a las radiactivas (las sondas marcadas con  $P^{32}$  duran menos de dos semanas). Si, además, tenemos en cuenta los inconvenientes de las sondas isotópicas, con las que se requieren numerosas precauciones de manejo, es lógico pensar en el marcaje no radiactivo como una alternativa cada vez más importante para la detección de secuencias específicas de ADN y, en particular, para la identificación de productos de PCR de peso molecular equivalente.

### **II. DATOS OBTENIDOS**

#### **1. GRUPO NORMAL (GN)**

Se detectó ADN de PVH en el exudado de 3 de las 249 mujeres del GN (1,2%). Esta cifra es inferior a la mayoría de las encontradas en los estudios revisados. No obstante, Claas et al,



en Holanda (143), encuentran un 1,4% de positividad en muestras de raspado cervical de mujeres normales. Otros autores hallan cifras algo más altas. Así, Evander et al (144), en Suecia, encuentran un 5,6% utilizando los iniciadores MY09 y MY11 diseñados por Manos et al (133) y empleados en nuestro estudio, porcentaje próximo al encontrado por Melchers en Holanda (5%) (145), con iniciadores tipospecíficos.

Existen otros trabajos en la bibliografía que estudian grupos de mujeres sin anomalías citológicas ni clínicas utilizando iniciadores tipospecíficos. La mayoría de ellos arrojan cifras de positividad sensiblemente superiores a las encontradas por nosotros, que oscilan entre 8,7% (146) y 53,2% (147). Van den Brule et al detectan porcentajes de positividad situados entre 3,5% y 13,9%, utilizando iniciadores consenso no degenerados (135). El propio Evander (144) observa como la prevalencia obtenida en su estudio con los iniciadores MY09 y MY11 se incrementa de un 5,6% a un 19,2% al realizar una segunda amplificación con los iniciadores no degenerados GP5 y GP6, utilizados por van den Brule. Parece que el mayor grado de homología de éstos y de los iniciadores tipospecíficos con las secuencias diana y la menor longitud del amplicón aumentarían considerablemente la eficiencia de la amplificación (144).

Sólo hemos encontrado un trabajo de este tipo en población española (148), donde las prevalencias oscilan alrededor del 4% (148). Dicho estudio está realizado, al igual que el nuestro, mediante amplificación con los iniciadores MY09 y MY11 y posterior hibridación con sondas específicas. Las diferencias con nuestros datos (1,2%) 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.

En una de las tres mujeres positivas encontradas en el grupo normal objeto de nuestro estudio se detectó ADN de PVH-18, mientras que las otras dos fueron indeterminadas. Claas (143) encuentra dos mujeres positivas en un grupo de 143 normales; en una de ellas se detectó ADN de PVH-16, siendo la otra indeterminada. Es significativo el alto porcentaje de PVH indeterminados hallados en otros trabajos. (137, 138, 144), que detectan, asimismo, una frecuencia elevada de PVH-16. También se observa un porcentaje significativo de PVH indeterminados en los estudios realizados en nuestro país (148) (no se diferencian las frecuencias de PVH-16 y 18).

También nos parece significativa la aparición en nuestro grupo de PVH-18, poco frecuente en población normal.

## **2. GRUPO PATOLOGICO**

### **2.1. Positividad en las muestras estudiadas.**

El porcentaje de muestras positivas fue mas elevado en las biopsias (alrededor del 35%), que en exudados y lavados (tabla IV). La positividad en este último tipo de muestra fue levemente superior a la encontrada en exudados (13,9% y 11,3% respectivamente). Las cifras más altas se observan en las biopsias, siendo similares en vulva y cérvix. Ello es debido a que la biopsia corresponde directamente a la lesión, mientras que el contenido de exudados y lavados consiste en células exfoliadas, que se encuentran en mayor número en los lavados, lo

que justificaría el mayor porcentaje de positividad de estas muestras, aunque no es significativo.

## **2.2. Prevalencia**

Al igual que sucedía en el GN, nuestra prevalencia en el GP ha sido, en general, inferior a la mayoría de las observadas en los estudios revisados, que oscilan entre 26,3% en raspados cervicales (144) y 90% (146) en exudados y biopsias. La mayoría de estos estudios se ha realizado con iniciadores tipospecíficos o consenso no degenerados. Evander encuentra un 26,3% de positivos en muestras de raspado cervical de mujeres con atipias analizadas con los iniciadores MY09 y MY11; al hacer una segunda amplificación con los iniciadores GP5 y GP6 (135, 149) el número de pacientes positivas aumenta hasta un 84,2%. Van Doornum (150), utilizando iniciadores tipospecíficos encuentra un 25% de positividad en exudados de mujeres con alto riesgo de ETS, algunas de las cuales presentaban clínica o antecedentes de condilomas, aunque sólo un 3% tenían anomalías citológicas.

Los genotipos más frecuentes en nuestro estudio fueron PVH-6 (en lavados), PVH-16 y, en mayor proporción, los PVH indeterminados. En otros estudios también se encuentra una prevalencia algo superior de PVH-16 (138, 143, 144, 145, 146, 151) aunque las cifras de PVH indeterminados son bastante altas (137, 138, 144).

## **2.3. Distribución en alteraciones citológicas**

Se diagnosticaron alteraciones citológicas en 29 de las 41 mujeres positivas de nuestro estudio. Los PVH indeterminados

fueron siempre los más frecuentes en cada tipo de alteración ( $p < 0,001$ ), seguidos de PVH-18 y 16 en menor proporción (Figuras 7 a 12). Se detectó ADN de PVH en 23/35 mujeres con diagnóstico citológico de papiloma (41,8%), 7/14 de CIN-1 (50%), 11/15 de CIN-2 (42,3%) y 6/16 de CIN-3 (37,5%). Estos datos no se corresponden con los estudios revisados (138, 143, 151), en los que el porcentaje de pacientes positivos para PVH aumenta con la severidad de la lesión. Hubo 12 mujeres con clínica sugestiva de infección por PVH y citología normal, de las que 7 (58,3%) fueron positivas. El genotipo más frecuente fue PVH-6 en tres de ellas, seguido de dos indeterminados. La mayor prevalencia dentro de este grupo se justifica por el hecho de que dichas mujeres tenían, sin embargo, lesiones clínicas evidentes. Ello explicaría también el mayor porcentaje de pacientes con PVH-6, genotipo frecuente en lesiones benignas.

A la vista de los datos de frecuencia global y parcial de cada genotipo de PVH, incluyendo los indeterminados, comenzamos a sospechar que tal vez su distribución varíe en nuestro país, donde genotipos como los estudiados aquí (PVH-6, 11, 16, 18 y 33) podrían no ser tan frecuentes, haciendo necesario el empleo de iniciadores que permitan la detección de otros PVH menos usuales. Este punto es compartido por otros autores (T. Kahn -DKFZ, Heidelberg-, comunicación personal), que han mostrado su interés en la realización de estudios de colaboración empleando iniciadores no degenerados y/o tipos específicos.

#### **2.4. Coincidencia de genotipos en distintas muestras**

Los genotipos encontrados coincidieron en un alto porcentaje de las muestras estudiadas. Hubo 13 mujeres positivas simultáneamente en cérvix y vulva; en 11 de ellas (84,6%) coincidía alguno de los genotipos de PVH detectados. La correlación fue total en las 5 mujeres positivas simultáneamente en exudado y lavado (Figuras 13 y 14).

El hecho de encontrar genotipos semejantes en cérvix y vulva no es raro, ya que la infección por PVH se transmite por contacto sexual y éste afecta a ambas localizaciones. La coincidencia total en las 5 mujeres con exudado y lavado positivos se debería a que, en realidad, lo que varía en estos dos tipos de muestras es la cantidad de las células existentes en ellas, pero no su tipo ni su localización.

Fue posible tomar todos los tipos de muestra en 44 mujeres, 15 de las cuales (34,1%) tuvieron alguna muestra positiva; en 11 de ellas (73,3%) coincidieron los genotipos encontrados en al menos dos muestras (Figura 15).

#### **2.5. Influencia de otros factores de riesgo**

Se ha sugerido la posibilidad de que, además de la infección por PVH, intervengan otros factores en el desarrollo de alteraciones del tracto genital femenino (2), aunque los datos aportados dan a éstos una importancia variable (2, 143, 152, 153).

En nuestro estudio hemos determinado la asociación entre consumo y dosis de tabaco, antecedentes de ETS, presencia de otros microorganismos (hallazgos microbiológicos), utilización

de anticonceptivos orales, edad de la primera relación sexual y, por supuesto, detección de PVH (Tabla VI; Figuras 16, 17 y 18).

Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Normal (sin alteraciones citológicas y/o clínicas) y el Grupo Patológico (con alteraciones citológicas y/o clínicas) con respecto a todos los factores estudiados, a excepción del uso de anticonceptivos orales. Esto significa que para las 345 mujeres incluidas en nuestro estudio existía relación entre dichos factores y aparición de alteraciones clínicas y/o citológicas en el tracto genital.

- **Consumo de tabaco:** Hemos encontrado asociación entre consumir tabaco y tener alteraciones en el tracto genital. El valor de la OR indica que la probabilidad de que aparezcan dichos signos es 3,29 veces mayor en las mujeres fumadoras que en las no fumadoras. El valor del riesgo atribuible R(DE) (0,7) indica que el 70% de las mujeres que tienen ciertos signos citológicos o clínicos en el tracto genital los tienen por ser fumadoras, el resto (30%) presentarán estos signos a pesar de no serlo. El intervalo de confianza IC indica los valores entre los que se encontraría la OR de la población general con una confianza del 95% (1,82-5,96).

La asociación entre consumo de tabaco y aparición de alteraciones ha sido observada por otros autores (122, 152). Se ha sugerido que la aparición de estas atipias podría deberse a la influencia de ciertos constituyentes del tabaco presentes en fluido vaginal.

También hemos encontrado diferencias significativas entre las dosis medias consumidas por los fumadores del grupo patológico (GP) (17,5 cigarrillos/día) y por las del grupo normal (GN) (12,3 cigarrillos/día) (Figura 17)

- **Antecedentes de ETS:** La probabilidad de que aparezcan alteraciones clínicas y/o citológicas en el tracto genital es 6,1 veces mayor en aquellas mujeres con antecedentes de ETS, con un riesgo atribuible del 84% (IC= 1,44-25,76).

El 77,1% de las mujeres con alteraciones citológicas habían tenido algún episodio de ETS. El antecedente mas frecuente se refería a historia previa de condilomas, seguido, en mucho menor grado, por micosis y tricomoniasis. La asociación entre historia previa de condilomas y aparición de neoplasias ha sido observada por otros autores (154, 155).

- **Presencia de otros microorganismos:** También se ha encontrado asociación, aunque algo inferior, con la presencia de otros agentes microbiológicos. En nuestro estudio el riesgo de aparición de alteraciones es 2,15 mayor entre las mujeres que presentan otras infecciones, siendo el riesgo atribuible de 53% (IC= 1,20-3,84). Según zur Hausen (2) la presencia de otros microorganismos podría contribuir a la producción de sustancias carcinogénicas, procedentes, en parte, del metabolismo de los mismos. En nuestro estudio, el microorganismo más frecuente fue *Candida*, seguida de *Chlamydia*. Existen datos que indican

asociación entre este último agente y aparición de alteraciones del tracto genital (140, 143, 156). Sin embargo, en un estudio más reciente (143) no parece existir una asociación significativa entre *Chlamydia* y atipias cervicales. La prevalencia de otros agentes como HSV, relacionado frecuentemente con displasias genitales (2), o VIH ha sido muy escasa.

Los datos existentes son, sin embargo, contradictorios y no parece existir una asociación clara entre presencia de otras infecciones y alteraciones del tracto genital (153).

- **Utilización de anticonceptivos orales:** Las diferencias con respecto a este factor están cercanas a la significación ( $X = 3,42$ ;  $X_s = 3,84$ ); sin embargo, no podemos afirmar que exista asociación entre estos dos factores, aunque otros autores sí hablan de una posible relación entre ambos, ésta es muy leve y no es posible establecer si las diferencias se deben al anticonceptivo o a aspectos comportamentales de las mujeres que los utilizan (152). Se ha sugerido la existencia de regiones en el genoma de PVH sensibles a la acción de la progesterona, lo que podría sugerir una acción sinérgica con PVH (123, 124).
  
- **Edad de la primera relación sexual:** Se han encontrado diferencias entre el Grupo Normal (21,5 años) y el Grupo Patológico (19,5 años) ( $p < 0,001$ ) (Figura 18).

No hemos podido valorar otros datos como número de parejas sexuales, ya que esta pregunta no fue contestada uniformemente



por las mujeres incluidas en este estudio.

- **Infección por PVH:** Se determinó que las mujeres infectadas por PVH tienen 10,4 veces más probabilidad de presentar alteraciones clínicas y/o citológicas en tracto genital que las no infectadas, con un valor  $R(DE) = 0,9$ . Esto indica que el 90% de las mujeres con clínica y/o citología en tracto genital presentan dichos signos por estar infectadas por PVH y sólo un 10% tendrá estas alteraciones sin que se detecte este virus ( $IC = 3-31,2$ ). Por lo tanto, para las mujeres incluidas en nuestro estudio, el factor de riesgo más importante para la aparición de alteraciones en epitelio genital ha sido la infección por PVH, lo que coincide con los datos existentes en la bibliografía, que confieren a este virus un carácter oncogénico.

### CONCLUSIONES

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

1. El método de detección no radioactivo utilizado (marcaje terminal con DIG-d-UTP) constituye una útil alternativa a las sondas radioactivas .
2. Los genotipos encontrados en el grupo normal fueron PVH-18 en una paciente e indeterminados en dos.
3. El 42,7% de las mujeres del grupo patológico presentó al menos una muestra positiva para PVH.
4. El porcentaje de positividad fue más elevado en las biopsias, siendo equivalentes las cifras obtenidas en vulva y cérvix.
5. El porcentaje de muestras positivas fue mayor en lavados que en exudados, aunque sin diferencia significativa.
6. El tipo de PVH más frecuentemente encontrado en todos los tipos de muestras fue el indeterminado, seguido de PVH-16 en biopsias y PVH-6 en lavados.
7. Trece de las mujeres estudiadas fueron positivas simultáneamente en vulva y cérvix. En 11 de ellas (84,6%) coincidía al menos uno de los genotipos encontrados.

8. Hubo cinco mujeres positivas simultáneamente en exudado y lavado. En todas ellas coincidieron los genotipos encontrados.
9. Fue posible obtener exudado, lavado, biopsia de cérvix y biopsia de vulva en 44 mujeres, presentando 15 de ellas alguna muestra positiva. Los genotipos detectados coincidieron en al menos dos muestras de 11 de estas pacientes (73,3%).
10. En las mujeres con alteraciones citológicas los PVH más frecuentes fueron los indeterminados, tanto en el total de ellas, como en cada uno de los tipos diagnosticados (papiloma, CIN-1, CIN-2, CIN-3) .
11. Se detectó ADN de PVH en 7/12 (58,3%) mujeres con clínica sugestiva de infección por PVH, pero con citología normal, siendo PVH-6 el genotipo más frecuente.
12. La probabilidad de padecer alteraciones clínicas y/o citológicas de tracto genital es 3,29 veces superior en las mujeres fumadoras que en las no fumadoras de nuestro estudio, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre la dosis de cigarrillos consumida por las mujeres del GN y de GP.

13. La probabilidad de padecer alteraciones clínicas y/o citológicas en el tracto genital es 6,1 veces mayor en las mujeres con antecedentes de ETS que entre las que no los tenían, siendo la historia previa de condilomas el episodio más frecuente.
14. La posibilidad de padecer alteraciones del tracto genital es 2,15 veces mayor en las mujeres en las que existían otras infecciones que en las que no las presentaban, siendo *Candida* y *Chlamydia* los agentes más frecuentes.
15. La edad de la primera relación sexual de las mujeres con alteraciones del tracto genital (GP) era inferior con diferencia significativa a la de las mujeres sin alteraciones (GP).
16. No se encontró asociación entre la aparición de alteraciones del tracto genital y la utilización de anticonceptivos orales.
17. La probabilidad de padecer alteraciones en el tracto genital fue 10,3 veces mayor en las mujeres infectadas por PVH que en las no infectadas. La infección por este virus es, por tanto, el factor de riesgo más importante entre los estudiados.

18. La frecuencia de aparición de los genotipos de PVH estudiados (PVH-6, 11, 16, 18 y 33) no se corresponde con la encontrada en otros países. Esto, junto con el alto porcentaje de PVH indeterminados sugiere que la distribución de estos virus podría variar en nuestro país.

BIBLIOGRAFIA

1. SHAH K.V., HOWLEY P.M.: *Papillomaviruses* En: Fields B.N., Knipe D.M. et al Eds. *Virology* Raven Press, Ltd. New York 1990, pp. 1651-1676.
2. DE VILLIERS E.-M.: *Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection*. *Genitourin Med* 1992; **68**: 50-54.
3. GISSMANN L., PFISTER H., ZUR HAUSEN H.: *Human papillomaviruses characterization of four different isolates*. *Virology* 1977; **76**: 569-580.
4. ORTH G., FAVRE M., CROISSANT O.: *Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts*. *J Virol*, 1977; **24**: 108-120.
5. DE VILLIERS E.-M.: *Heterogeneity of the human papillomavirus group*. *J Virol*, 1989; **63**: 4898-4902.
6. HOWLEY P.M.: *Papilomavirinae and their replication*. En: Fields B.N., Knipe D.M. et al. *Virology*. Raven Press, Ltd. New York, 1990; pp 1625-1650.
7. ZUR HAUSEN H.: *Molecular mechanisms in the malignant transformation by DNA viruses*. *Prog Obstet Gynecol*, 1992; **35**: 239-249.

8. U.S. Department of Health and Human Services: *Sexually transmitted disease statistics, 1985*. Issue No.135. Public Health Service. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control, 1987.
9. SULIGOI B., GIULIANI M., BINKIN N.: *The National surveillance Systems for sexually transmitted diseases in Italy*. CDC Surveillance summaries. MMWR, 1992; 41: 35-41.
10. VILATA J.J., NOGUEIRA J.M.: *Condiloma acuminado ( Verugas genitales. Verrugas venéreas )*. En : *Enfermedades de transmisión sexual producidas por virus*. Ed. EMISA ( Editorial Médica Internacional ) Madrid, 1990; pp.105-114.
11. COOK T.A., BRUNSCHWIG J.P., BUTEL J.S. et al: *Laryngeal papilloma: etiologic and therapeutic considerations*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1973; 82: 649-655.
12. QUICK C.A., WATTS S.L., KRZYZEK R.A. et al: *Relationship between condylomata and laryngeal papillomata. Clinical and molecular virological evidence*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1980; 89: 467-471.
13. DE VILLIERS E.-M: *Hybridization methods other than PCR: An update*. En : Muñoz N., Bosch F.X., Shah K.V. and Meheus eds. *The Epidemiology of Human Papillomavirus and cervical cancer*. IARC, 1992; pp. 111-119.

14. COGGIN J.R., ZUR HAUSEN H.: *Workshop on papillomaviruses and cancer*. Cancer Res, 1979 ; 39: 545-546.
15. ORTH G.: *Epidermiodisplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomavirus in human cancer*. En: Papillomaviruses-Symposium No. 120. CIBA Foundation-Symposium J. Wiley and Sons, Inc. New York 1986; pp. 156-174.
16. ORTH G., JABLONSKA S., FAVRE M. et al: *Identification of papillomavirus in butchers' warts*. J Invest Dermatol, 1981; 76:97-102.
17. GRIMMEL M., DE VILLIERS E.-M., NEUMANN C. et al: *Characterization of a new papillomavirus ( HPV-41 ) from disseminated warts and detection of its DNA in some skin carcinomas*. Int J Cancer, 1988; 41: 5-9.
18. PFISTER H., HETTICH I., RUNNE U. et al: *Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions*. J Virol, 1983; 47: 363-366.
19. BEAUDENON S., PRAETORIUS F., KREMSDORF D. et al: *A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia*. J Invest Dermatol, 1987; 88: 130-135.



20. DE VILLIERS E.-M., HIRSCH-BEHNAN A., VON KNEBEL-DOEBERITZ C., NEUMANN C. AND ZUR HAUSEN H: *Two newly identified human papillomavirus types ( HPV-40 and 57 ) isolated from mucosal lesions. Virology, 1989; 171: 248-253.*
21. DE VILLIERS E.-M., WEIDAVER H., OTTO H. AND ZUR HAUSEN H: *Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. Int J Cancer, 1985; 36: 575-578.*
22. GREENSPAN D., DE VILLIERS E.-M., GREENSPAN J.S. et al: *Unusual HPV types in oral warts in association with HIV infection. J Oral Pathol, 1988; 17: 482-487.*
23. OSTROW R.S., MARISAS D., MITCHEL A.J. et al : *Epidermodysplasia verruciformis. A case associated with primary lymphatic dysplasia, depressed cell-mediated immunity and Bowen disease containing HPV-16 DNA. Arch Dermatol, 1987; 123: 1511-1516.*
24. FAVRE M., BREITBURD F., CROISSANT O. et al: *Structural polypeptides fo rabbit, bovine and human papilloma vireuses. J Virol, 1975; 15: 1239-1247.*
25. PFISTER H., GISSMAN L., ZUR HAUSEN H.: *Partial characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) 1-3. Virology, 1977 ; 83: 131-137.*

26. AMTMANN E., SAUER G.: *Bovine papilloma virus transcription: polyadenylated RNA species and assessment of the direction of transcription.* J Virol, 1982; 43: 59-66.
27. ENGEL L.W., HEILMAN C.A., HOWLEY P.M.: *Transcriptional organization of the bovine papillomavirus type 1.* J Virol, 1983; 47: 516-528.
28. HEILMAN C.A., ENGEL L., LOWY D.R. et al : *Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cells.* Virology, 1982; 119: 22-34.
29. LOWY D.R., DVORETZKY I., SHOBER R. et al : *In vitro tumorigenic transformation by a defined sub-genomic fragment of bovine papilloma virus DNA.* Nature, 1980; 287: 72-74.
30. BAKER C.C., HOWLEY P.M.: *Diferential promoter utilization by the papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues.* EMBO J, 1987; 6: 1027-1035.
31. SCHNEIDER A., OLTERS DORF T., SCHNEIDER V.: *Distribution of human papillomavirus 16 genome in cervical neoplasia by molecular in situ hybridization of tissue sections.* Int J Cancer, 1987; 39: 717-721.

32. STOLER M.H., BROKER T.R.: *In situ hybridization detection of human papillomavirus DNA and messenger RNA in genital condylomas and a cervical carcinoma.* Hum Pathol, 1986; 17: 1250-1258.
33. WALDECK S., ROSL F., ZENTGRAF H.: *Origin of replication in episomal bovine papilloma virus type 1 DNA isolated from transformed cells.* EMBO, 1984; 3: 2173-2178.
34. LUSKY M., BOTCHAN M.R.: *Characterization of the bovine papilloma virus plasmid maintenance sequences.* Cell, 1984; 36: 391-401.
35. LAMBERT P.F.: *Papillomavirus DNA replication.* J Virol, 1991; 65: 3417-3420.
36. THORNER L., BUCAY N., CHOE J. et al : *The product of the bovine papillomavirus type 1 modulator gene (M) is a phosphoprotein.* J Virol, 1988; 62: 2474-2482.
37. SEIF I.: *Sequence homology between the large tumor antigen of polyomaviruses and the putative E1 protein of papillomaviruses.* Virology, 1984; 138: 347-352.
38. BERG L., LUSKY M., STENLUND A. et al : *Repression of bovine papilloma virus replication is mediated by a virally encoded trans-acting factor.* Cell, 1986; 46: 753-762.

39. BERG L.J., SINGH K., BOTCHAN M.: *Complementation of a bovine papilloma virus low-copy-number mutant: evidence for a temporal requirement of the complementing gene.* Mol Cell Biol, 1986; 6: 859-869.
40. ROBERTS J.M., WEINTRAUB H.: *Negative control of DNA replication in composite SV40-bovine papilloma virus plasmids.* Cell, 1986; 46: 741-752.
41. DIMAIO D., SETTLEMAN J.: *Bovine papillomavirus mutant temperature defective for transformation, replication and transactivation.* EMBO J, 1988; 7: 1197-1204.
42. GROFF D.E., LANCASTER W.D.: *Genetic analysis of the 3' early region transformation and replication functions of bovine papillomavirus type 1.* Virology, 1986; 150: 221-230.
43. RABSON M.S., YEE C., YANG Y.C. et al : *Bovine papillomavirus type 1 3'early region transformation and plasmid maintenance functions.* J Virol, 1986; 60: 626-634.
44. SARVER N., RABSON M.S., YANG Y.C. et al : *Localization and analysis of bovine papillomavirus type 1 transforming functions.* J Virol, 1984; 52: 377-388.
45. GILBERT D.M., COHEN S.N.: *Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle.* Cell, 1987; 50: 59-68.

46. BURNETT S., KIESSLING U., PETTERSSON U.: *Loss of bovine papillomavirus DNA replication control in growth-arrested transformed cells.* J Virol, 1989; **63**: 2215-2225.
47. CHOE J., VAILLANCOURT P., STENLUND A. et al : *Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs.* J Virol, 1989; pp. 1743-1755.
48. STENLUND A., BREAM G.L., BOTCHAN M.R.: *A promoter with an internal regulatory domain is part of the origin of replication in BPV-1.* Science, 1987; **236**: 1666-1671.
49. STENLUND A., ZABIELSKI J., AHOLA H. et al: *Messenger RNAs from the transforming region of bovine papilloma virus type 1.* J Mol Biol, 1985 ; **182**: 541-554.
50. CRIPE T.P., HAUGEN T.H., TURK J.P., et al : *Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis.* EMBO J , 1987 ; **6**: 3745-3753.
51. THIERRY F., GARCIA-CARRANCA A., YANIV M. : *Elements that control the transcription of genital papillomavirus type 18.* Cancer cells , 1987 ; **5**: 23-32.

52. LUSKY M., BERG L., WEIHER H. et al : Bovine papilloma virus contains an activator of gene expression at the distal end of the early transcription unit. *Mol Cell Biol* , 1983 ; 3: 1108-1122.
53. HERMONAT P.L., SPALHOLZ B.A., HOWLEY P.M. : The bpvine papillomavirus  $P_{2443}$  promoter is E2 trans-responsive: evidence for E2 autoregulation. *EMBO J* , 1988 ; 7: 2815-2822.
54. GIRI I., DANOS O., YANIV M. : Genomic structure of the cottontail rabbit ( Shope ) papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1985 ; 82 : 1580-1584 .
55. HIROCHIKA H., HIROCHIKA R., BROKER T.R., et al : Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the trans-acting E2 protein. *Genes Dev* , 1988 ; 2: 54-67.
56. SPALHOLZ B.A., BYRNE J.C., HOWLEY P.M. : Evidence for cooperativity between E2 binding sites in E2 trans-regulation of bovine papillomavirus type 1. *J Virol* , 1988 ; 62 : 3143-3150.
57. HAUGEN T.H., CRIPE T.P., GINDER G.D. , et al : Trans-actication of an upstream early gene promoter of bovine papilloma virus-1 by a product of the viral E2 gene. *EMBO J* , 1987 ; 6: 145-152.

58. HEIKE T., MIYATAKE S., YOSHIDA M. , et al : *Bovine papillomavirus encoded E2 protein activates lymphokine genes through DNA elements, distinct from the consensus motif, in the long control region of its own genome.* EMBO J, 1989 ; 8: 1411-1417.
59. THIERRY F., YANIV M. : *The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV 18 regulatory region .* EMBO J , 1987 , 6: 3391-3397.
60. GUI S D., GROSSMAN S., BEDELL M.A., et al : *Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18 .* J Virol, 1988 ; 62: 665-672.
61. BAKER C.C., NOE J.S. : *Transcriptional termination between bovine papillomavirus type 1 ( BPV-1 ) early and late polyadenylation sites blocks late transcription in BPV-1 transformed cells.* J Virol , 1989 ; 63: 3529-3534.
62. LAW M.F., LOWY D.R., DVORETZKY I., et al : *Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences.* Proc Natl Acad Sci USA , 1981 ; 78 : 2727-2731.
63. LUSKY M., BOTCHAN M.R. : *Transient replication of bovine papilloma virus type 1 plasmids : cis and trans requirements.* Proc Natl Acad Sci USA , 1986 ; 83 : 3609-3613.

64. PATEL K.R., SMITH K.T., CAMPO M.S. : *Bovine papillomavirus type 4 ( BPV-4 ) , genome sequence. J Gen Biol , 1987 ; 68 : 2117-2128.*
65. TUREK L.P., BYRNE J.C., LOWY D.R., et al : *Interferon induces morphologic reversion with elimination of extrachromosomal viral genomes in bovine papillomavirus-transformed mouse cells. Proc Natl Acad Sci USA , 1982 ; 79 : 7914-7918.*
66. YASUMOTO S., BURKHARDT A.L., DONINGER J., et al : *Human papillomavirus type 16-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. J Virol , 1986 ; 57 : 572-577.*
67. KANDA T., WATANABE S., YOSHIIKO K. : *Immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic fragments controlled by the SV40 promoter. Virology , 1988 ; 165 : 321-325.*
68. MATLASHEWSKI G., SCHNEIDER J., BANKS L. et al : *Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. EMBO J , 1987 ; 6 : 1741-1746.*
69. PIRISI L., YASUMOTO S., FELLER M., et al : *Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. J Virol, 1987 ; 61:1061-1066.*



70. SCHLEGEL R., PHELPS W. C., ZHANG Y. L., et al: *Quantitative Keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associates with cervical carcinoma.* EMBO J, 1988 ; 7:3181-3187.
71. KREIDER J. W., HOWETT M. K., WOLFER S. A., et al: *Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata.* Nature, 1985 ; 317:639-641.
72. GREEN M., LOEWENSTEIN P. M.: *Demonstration that a chemically synthesized BPV1 oncoprotein and its C-terminal domain function to induce cellular DNA synthesis.* Cell, 1987 ; 51:795-802.
73. BUBB V., McCANCE D. J., SCHLEGEL R.: *DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoder protein.* Virology, 1988 ; 163:243-246.
74. YANG Y. C., OKAYAMA H., HOWLEY P. M.: *Bovine papillomavirus contains multiple transforming genes.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985 ; 82:1030-1034.
75. SCHEWARZ E., FREESE U. K., GISSMAN L., et al: *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells.* Nature, 1985 ; 314:111-114.

76. COLE S. T., DANOS O.: *Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome.* J Mol Biol, 1987 ; 159:599-608.
77. MÜNGER K., PHELPS W. C., BUBB V., et al: *The E6 and E7 genes of human papillomavirus together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes.* J Virol, 1989 ; 63:4417-4421.
78. WATANABE S., KANDA T., YOSHIIKE K.: *Human Papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7.* J Virol, 1989 ; 63:965-969.
79. BARBOSA M. S., LOWY D. R., SCHILLER J. T.: *Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc binding proteins.* J Virol, 1989 ; 63:1404-1407.
80. WHYTE P., BUCHKOVICH K. J., HOROWITZ J. M., et al: *Association between an oncogene and anti-oncogene: the adenovirus E1a proteins bind to the retinoblastoma gene product.* Nature, 1988 ; 334:124-129.
81. MÜNGER K., WERNESS B., DYSON N., et al: *Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma gene product.* EMBO J, 1989 ; 8:4099-4105.

82. LAMBERT P. F., HOWLEY P. M.: *Bovine papillomavirus type 1 E1 replication - defective mutants are altered in their transcriptional regulation.* J Virol, 1988 ; 62:4009-4015.
83. SCHILLER J. T., KLEINER E., ANDROPHY E. J., et al: *Identification of bovine papillomavirus E1 mutants with increased transforming and transcriptional activity.* J Virol, 1989 ; 63:1775-1782.
84. MURRAY R., HOBBS J., PAYNE B.: *Possible clonal origin of common warts (verruca vulgaris).* Nature, 1971 ; 232:51-52.
85. JABLONSKA S., DABROWSKI J., JAKUBOWICZ K.: *Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis.* Cancer Res, 1972 ; 32:583-589.
86. ANDROPHY E. J., DVORETZKY I., LOWY D. R.: *X-linked inheritance of epidermodysplasia verruciformis: genetic and virologic studies of a kindred.* Arch Dermatol, 1985 ; 121:864-868.
87. GISSMANN L., DIEHL V., SCHULTZ-LOULON H. J., et al: *Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from a laryngeal papilloma.* J Virol, 1982 ; 44:393-400.

88. MOUNTS P., SHAH K.: *Respiratory papillomatosis: etiological relation to genital tract papillomaviruses*. Prog Med Virol, 1984 ; 29:90-114.
89. MOUNTS P., SHAH K. V., KASHIMA H.: *Viral etiology of juvenile and adult onset squamous papilloma of the larynx*. Proc Enatl Acad Sci USA, 1982 ; 79:5425-5429.
90. TERRY R. M., LEWIS F. A., GRIFFITHS S., et al: *Demonstration of human papillomavirus types 6 and 11 in juvenile laryngeal papillomatosis by in situ DNA hybridization*. J Pathol, 1987 ; 153:245-248.
91. STEINBERG B., TOPP W., SCHENEIDER P. S., et al: *Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission*. N Engl J Med, 1983 ; 308:1261-1264.
92. GALLOWAY T. C., SOPER G.R., ELSEEN G.: *Carcinoma of the Larynx after irradiation for papilloma*. Arch Otolaryngol, 1960 ; 72:289-294.
93. KAHN T., SCHWARZ E., ZUR HAUSEN H.: *Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV30) from a laryngeal carcinoma*. Int J Cancer, 1986 ; 37:61-65.

94. BRANDSMA J. L., STEINBERG B. M., ABRAMSON A. M., et al: *Presence of human papillomavirus type 16 related sequences in verrucous carcinoma of the larynx.* Cancer Res, 1986 ; 46:2185-2188.
95. LASS J. H., JENSON A. B., PAPALE J. J., et al: *Papillomavirus in human conjunctival papillomas.* Am J Ophthalmol, 1983 ; 95:364-368.
96. McDONELL P. J., McDONELL J. M., KESSIS T., et al: *Detection of human papillomavirus type 6/11 DNA in conjunctival papillomas by in situ hybridization with radioactive probes.* Hum Pathol, 1987 ; 18:1115-1119.
97. MEISELS A., FORTIN R., ROY M.: *Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic colpostopic and histopathologic study .* Acta Cytol, 1977 ; 21:379-390.
98. MEISELS A., MORIN C., CASAS-CORDERO M.: *Human papillomavirus infection of the uterine cervix.* Int J Gynecol Pathol, 1982 ; 1:75-94.
99. ORIEL J.: *Natural history of the genital warts.* Br J Vener Dis, 1971 ; 47:1-13.

100. ALLUB M. I., BARR B. B. B., McLAREN K. B., et al: *Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in woman with renal allografts*. Br Med J, 1989 ; **298**:153-156.
  
101. HALPERT R., FRUCHTER R. G., SEDLIS A., et al: *Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients*. Obstet Gynecol, 1986 ; **68**:251-258.
  
102. REID R., GREENBERG M., JENSON A. B., et al: *Sexually transmitted papillomavirus infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types*. Am J Obstet Gynecol, 1984 ; **156**:212-222.
  
103. GISSMANN L., WOLNICK L., IKENBERG H., et al: *Human papillomaviruses types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers*. Proc Natl Acad Sci USA, 1983 ; **80**:560-563.
  
104. REID R., CRUN C. P., HERSCHMAN B. R., et al: *Genital warts and cervical cancer. III. Subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change*. Cancer, 1984 ; **53**:943-953.

105. SAITO K., SAITO A., FU Y. S., et al: *Topographical study of cervical condyloma and intraepithelial neoplasia*. *Cancer*, 1987 ; 59:2064-2070.
106. BOSHART M., GISSMANN L., IKENBERG H., et al: *A new type of papilloma virus DNA and its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer*. *EMBO J*, 1984 ; 3:1151-1157.
107. LÖRINCZ A., TEMPLE T., KURMANN G. F., et al: *Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia*. *J Natl Cancer Inst*, 1987 ; pp.671-677.
108. CAMPION M. J., McCANCE D. J., CUZICK J., et al: *Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic, and virological study*. *Lancet*, 1986 ; 2:237-240.
109. YEE C., KRISHNAN-HEWLETT I., BAKER C. C., et al: *Presence and expression of papilloma virus sequences in human cervical carcinoma cell lines*. *Am J Pathol*, 1985 ; 119:361-366.
110. FUCHS P. G., GIRARDI F., PFISTER H.: *Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancers and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastases?*. *Int J Cancer*, 1989 ; 43:41-44.

111. LANCASTER W. E., CASTELLANO C., SANTOS C., et al: *Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in cervical carcinoma from primary and metastatic sites*. Am J Obstet Gynecol, 1986 ; 154:115-119.
112. McCANCE D. J.: *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 1987 ; I:986.
113. BAKER C. C., PHELPS W. C., LINDGREN V., et al: *Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines*. J Virol, 1987 ; 61:962-971.
114. ZUR HAUSEN H., SCHNEIDER A.: *The role of papillomaviruses in human anogenital cancer*. Salzman N. P., Howley P. M., eds. In: *The papovaviridae, vol 2: the papillomaviruses*. New York Plenum Press, 1987 ; pp.245-263.
115. STANBRIDGE E. J.: *Suppression of malignancy in human cells*. Nature, 1976 ; 260:17-20.
116. SAXON P. J., SRIVATASEN E. S., STANBRIDGE E. J.: *Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells*. EMBO J, 1986 ; 5:3461-3466.



117. SMITS H. L., HAADSHEER E., ROOD S., et al: *Induction of anchorage-independence growth on human embryonic fibroblasts with a deletion in the short arm of chromosome 11 by human papillomavirus type 16 DNA.* J Virol, 1988 ; 62:4538-4543.
118. ATKIN N. B., BAKER M. C.: *Deficiency of all or part of chromosome 11 in several types of cancer: Significance of a reduction in the number of normal chromosomes 11.* Cytogenet Cell Genet, 1988 ; 47:106-107.
119. ROSL R., DURST M., ZUR HAUSEN H.: *Selective suppression of human papillomavirus transcription in non-tumorigenic cells by 5 - azacytidine.* EMBO J, 1988 ; 7:1321-1328.
120. ZUR HAUSEN H.: *Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient control of papillomavirus infection.* Lancet, 1986 ; 2:489-491.
121. COUTOURIER J., SASTRE-GARAU X., SCHNEIDER-MAUNOURY S., et al: *Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression.* J Virol, 1991 ; 8:4534-4538.
122. HOFFMANN D., HECHT S. S., HALEY N. J., et al: *Tumorigenic agents in tobacco products and their uptake by chewers, smokers and non-smokers.* J Cell Biochem (Suppl), 1985 ; 90:33.

123. GLOSS B., BERNARD H.U., SEEDORF K., et al : *The upstream regulatory region of the human papillomavirus-16 contains an E2 protein-independent enhancer wich is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones.* EMBO J , 1987 ; 6: 3735-3743.
124. PATER M.M. , HUGHES G.A., HYSLOP D.E. , et al : *Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by typs 16 and not type 11 human papillomavirus DNA.* Nature, 1988 ; 335: 832-834.
125. FIRZLAFF J.M., KIVIAT N.B., BECKMANN A.M., et al : *Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 and L2. Open Reading Frames.* Virol, 1988 ; 164 : 467-477.
126. MATLASHEWSKI G., BANKS L., WU-LIAO J., et al : *The expression of human papillomavirus type 18 E6 protein in bacteria and the production of anti-E6 antibodies.* J Virol , 1986 ; 67: 1909-1916.
127. SOTHERN E.M. : *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J Mol Biol, 1975 ; 98: 503-517.

128. de VILLIERS E.-M., SCHNEIDER A., GROSS G., et al : *Analysis of benign and malignant urogenital tumours for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA*. *Med Microbiol Immunol*, 1986 ; 174 : 281-286.
129. WAGNER D., IKENBERG H., BOHM N., et al : *Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization*. *Obstet Gynecol*, 1984 ; 64 : 767-772.
130. NUOVO G.J., McCONNELL P., FORDE A., et al: *Detection of human papillomavirus DNA in formalin - fixed tissues by in situ hybridization after amplification by polymerase chain reaction*. *Am J Pathol*, 1991 ; 139:847-854.
131. SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA F., et al: *Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 1985 ; 230:1350-1354.
132. SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFELS S., et al: *Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988 ; 239:487-491.
133. MANOS M. M., TING Y., WRIGHT D. K., et al: *Use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital human papillomaviruses*. *Cancer Cells*, ; 7:209-214.

134. SHIBATA D. K., ARNHEIM N., MARTIN W. J.: *Detection of human papillomavirus in parafin - embedded - tissue using the polymerase chain reaction.* J Exp Med, 1988 ; 167:225-230.
135. RESNICK R. M., CORNELISSEN M. T. E., WRIGHT D. K., et al: *Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers.* J Natl Cancer Inst, 1990 ; 82:1477-1484.
136. FUJINAGA Y., SHIMADA M., OKAZAWA K., et al: *Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction.* J Gen Virol, 1991 ; 72:1039-1044.
137. YOSHIKAWA H., KAWANA T., KITAGAWA K., et al: *Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers.* Jpn Cancer Res, 1991 ; 82:524-531.
138. VAN DEN BRULE A. J. C., MEIJER C. J. L. M., BAKELS V., et al: *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.

139. McCANCE D. J., GARDNER S. D.: *Papovaviruses: papillomaviruses and polyomaviruses*. En: Principles and practice of Clinical Virology. Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Pattison J. R. eds., 1987
140. SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 ; pp. 1.74 - 1.84.
141. SCHMITZ G.G., WALTER T., SEIBL R., et al : *Non-radioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase*. Anal Biochem , 1991 ; 192: 222-231.
142. KAHL-MARTIN-COLIMON : *Fundamentos de Epidemiología*. Eol Díaz de Santos. 1990 .
143. CLAAS E.C.J., MELCHERS W.J.G., NIESTERS H.G.M., et al : *Infection of the cervix uteri with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis*. J Med Virol, 1992 ; 37: 54-57 .
144. EVANDER M., EDLUND K., BODEN E., 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: 987-992.

145. MELCHERS W.J.G., BRULE A.C.J., WALBOOMERS J.M.M., et al : *Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction as compared with modified fish and southern blot analysis.* J Med Virol, 1989 ; 27 : 329-335 .
146. GJOEN K., SIEBKE J.C., FLIKKE M., et al : *Genital human papilloma virus infection in Oslo studied by dot blot DNA hybridization and the polymerase chain reaction.* J Med Microbiol , 1991 ; 34: 159-164 .
147. HALLAM N., GREEN J., GIBSON P., et al : *Prevalence of HPV cervical infection in a family planning clinic determined by polymerase chain reaction and dot blot hybridization.* J Med Virol, 1991 ; 34: 154-158 .
148. SAN JOSE S., SANTAMARIA M., ALONSO DE RUIZ P., et al : *HPV types in women with normal cytology.* En : *Epidemiology of cervical cancer.* Muñoz N., Bosch F.X., Shah K.V., Meheus A., eds. IARC, 1992 ; pp. 75-84 .
149. SNIDJERS P.J.F., VAN DEN BRULE A.J.C., SCHRIJNEMAKERS H.F.J., et al : *The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papilloma genotypes.* J Gen Virol, 1990 ; 71: 173-181 .

150. VAN DOORNUM G.J.J., HOOYKAAS C., JUFFERMANS L.H.J., et al : *Prevalence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners.* J Med Virol, 1992 ; 37: 13-21 .
151. VANDENVELDE C., SCHEEN R., VAN PACHTERBEKE C., et al . *Prevalence of high risk genital papillomaviruses in the Belgian female population determines by fast multiplex polymerase chain reaction.* J Med Virol, 1992 ; 36: 279-282
152. SCHNEIDER A., KOUSTSKY L. : *Natural history and epidemiological features of genital HPV infection.* En : *Epidemiology of cervical cancer.* Muñoz N., Bosch F.X., Shah K.V., Meheus A. eds. IARC, 1992 ; pp. 23-52 .
153. LACEY C.J.N. : *Assessment of exposure to sexually transmitted diseases other than human papillomavirus.* En . *Epidemiology of cervical cancer.* Muñoz N., Bosch F.X., Shah K.V., Meheus A. eds. IARC , 1992 ; pp. 93-105 .
154. PETERS R.K., THOMAS D., HAGAN D.G., et al : *Risk factors for invasive cervical cancer among Latinas and non-Latinas in Los Angeles County.* J Natl Cancer Inst, 1986 ; 77: 1063-1077 .
155. CUZICK J., SINGER A., DE STAVOLA B.L., et al : *Case-control study of risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in young women.* Eur J Cancer, 1990 ; 26: 684-690.

156. ALLERDING T.J., JORDAN S.W., BOARDMAN R.E. : *Association of human papillomavirus and Chlamydia infections with incidence cervical neoplasia*. *Acta Cytologica*, 1985 ; **29**: 653-660 .