



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL (LABIOMEX)

COMPARACIÓN DEL SISTEMA DE
OLIGONUCLEÓTIDOS MY09/11 Y NMPCR
PARA TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO EN CEPILLADOS EN
ÁREA GENITAL.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de
Los Andes como requisito parcial para optar al título de:
Licenciada en Biología.

Presentado por: **Br. Cristela Yosmary Moreno García**
Tutor: Dr. John Freddy Cruz

Mérida, 17 de noviembre de 2016

Agradecimientos

- A Dios Todopoderoso por permitirme materializar este sueño y darme fortaleza en los momentos donde no tenía.
- A la ilustre Universidad de Los Andes por ser el pilar fundamental de conocimientos.
- A mi Padre José R. Moreno L. por ser mi guía, por sus sabios consejos, por esas largas conversaciones y por aquella frase célebre que se hizo eco en mi vida “*En tiempos de paz, prepárate para la guerra.*” Te Amo Papi. A ti soy lo que soy.
- A mi Madre Carmen García Z. por enseñarme a ser fuerte, a no dejarme doblegar por las vicisitudes, a ser terca y no descansar hasta alcanzar mis metas. Te Amo Mami. A ti soy lo que soy.
- A Papá Manolo por estar ahí a pesar que físicamente no estás, siempre fuiste mi inspiración. No existe día en que no te recuerde y no vea tus ojos cuando cierro los míos. *ESTO ES POR TI. TE AMO.*
- A Mamá Mercedes por enseñarme humildad, entereza y sabiduría, por alcahuetearme y apoyarme en mis locuras. Te Amo.
- A mis Tíos. Carlos, Manuel, Freddy, David y Ernesto por no sólo ser mis tíos, sino hacer de mis hermanos y compañeros de juegos, por sus consejos, peleas y risas. Los Amo.
- A mi Madrina Inés Moncada por sus consejos, por su paciencia, por enseñarme la calma en momentos de angustia y por años de complicidad.

- A Magnolia Pérez “Minina” por ser mi amiga, hermana y madre al aconsejarme y enterderme. Gracias por tantos años de sincera y verdadera amistad.
- A Duchicela por acompañarme siempre y por aquel sabio consejo que me diste aquel día y gracias a ello, me quedé y perseguí mis sueños. ¡Vive mi Duchi!
- A Lea Raquel Tempo por haber sido mi mejor amiga y confidente. Gracias por estar ahí aunque físicamente te fuiste antes de tiempo.
- A mis primos Adrián, Carolay, Anyeiber, Clara Mercedes, Jesús David, Gleysi, Rolando, Juanita, Jackelin, Wolfgang, Josué, Joselvis, Joel, Zaydath, Lily, Rebeca, Lisbeth, Clara “Lala”, Dexilia, Mateo. Espero que esto sirva como motivación para ustedes.
- A todo el equipo de LABIOMEX: Dorita, Carlos, Juan, Lisbeth, Natasha, Lily, Carolina, Nereida, Reinaldo “Flaco”, Marisé, Nol, Balbino; por estar al pendiente y convertirse en amigos entrañables. Muchísimas Gracias.
- A mi Tutor, Dr John F. Cruz por sus consejos y conocimientos compartidos.
- A la Profesora Militza Quintero, al Profesor Marcos Bastidas, y al Profesor Willian Quintero por servirme de apoyo en el proceso de este trabajo., y a la Sra Sioly por ser tan abnegada y ser el hada Madrina de todos los biólogos
- Al Dr Juan Puig Pons por permitirme formar parte y hacer mi Trabajo Especial de Grado en LABIOMEX.
- A mi amiga y maestra Astrid Mora por halarme las orejas cuando era necesario y por ser incondicional.
- A Orlando Izarra por ser mi apoyo, por motivarme, por amarme con mi carácter, en mis altos y bajos, y por tantos bellos momentos vividos. Te Amo.
- A la Residencias Femenina “Mama Chela” por abrirme sus puertas y convertirse en mi segundo hogar.
- A la Sra Aurora Carrero por abrirme las puertas de su casa.

- A mis cuñados Orllys, Julio, Chuo, Agny por sus palabras de aliento.

www.bdigital.ula.ve

*“El sexo es un factor determinante en el
acervo génico de una población, ergo,
también de las enfermedades que
conllevar a su extinción”.*

Cristelántula.

Abreviaciones

- ADN Ácido Desoxirribonucleico
- ARN Ácido Ribonucleico
- gr Gramos
- mg Miligramos
- mL Mililitros
- μL Microlitros
- mM Milimolar
- μM Micromol
- pmol Picomol
- M Molar
- PCR Reacción de Cadena de Polimerasa
- NMPCR Nested Multiplex Reacción de Cadena Polimerasa (PCR Anidada Múltiple)
- dNTP's Desoxinucleótido fosfato
- c.s.p Cantidad suficiente para
- RFLP Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción
- vs Versus

- U Unidades de Enzima
- ORF's Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
- VPH Virus del Papiloma Humano
- LIEBG Lesión Intraepitelial de Bajo Grado
- LIEAG Lesión Intraepitelial de Alto Grado
- LABIOMEX Laboratorio de Biología y Medicina Experimental, adscrito a la Universidad de los Andes.
- NIC Neoplasia Intraepitelial
- PAP Papanicolau
- ASCUS Atipia de Significado Indeterminado
- EB Epitelio base
- ER Enzimas de restricción
- NCBI National Center for Biothecnology Information
- SSC Carcinoma de células escamosas
- Atipia/Ectopia
- mA Miliamperes
- kb Kilobases
- pb Pares de bases
- ng Nanogramo
- nmol nanomoles
- m.p.e. Megapura estéril
- LCR Región Larga de Control

- W Watts
- V Voltios
- °C Centígrados
- AT Adenina/Timina
- GC Guanina/Citocina
- E. coli *Escherichia coli*
- *HpyCH4V* Es una endonucleasa *E. coli* cepa que porta el gen clonado *HpyCH4V* de *Helicobacter pylori CH4*.
- ρ Correlación de Spearman (*rho*)
- κ Índice Kappa

www.bdigital.ula.ve

Resumen

El VPH como problema en el sector salud ha iniciado una brecha en la investigación en la tipificación del virus, debido a la necesidad de detectar múltiples tipos de VPH en una sola muestra por casos de reinfecciones, se hace imperante diseñar métodos de detección y tipificación para ofrecer a pacientes mayor rapidez y precisión en los resultados.

La técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) ha sido novedosa para la detección viral; sus variantes, como la restricción de longitud de fragmentos de polimorfismo (RFLP) en conjunto con la Nested Multiplex PCR (NMPCR) con el diseño de oligonucleótidos que amplifican los genes L y E del virus de Papiloma, permiten detectar en una muestra múltiples tipos virales. Existen métodos enfocados en detectar la carga viral cuando ya el virus esté integrado en el genoma, por ello es necesaria la combinación de dichos métodos, entre ellos, la RFLP mediante los oligonucleótidos MY09/11 en conjunto con el coctel de oligonucleótidos que amplifican simultáneamente los de bajo riesgo y de alto riesgo u oncogénicos.

Índice general

Agradecimientos	I
Abreviaciones	v
Resumen	viii
1. Introducción	15
2. Marco teórico	21
2.1. Virus de Papiloma Humano	21
2.1.1. Historia	23
2.2. Detección: Técnicas y Fundamentos	25
2.2.1. Prueba Papanicolau	29
2.2.2. Colposcopia	29
2.2.3. Southern blot	30
2.2.4. Hibridación in situ (HIS)	31
2.2.5. Captura de híbridos	32
2.2.6. PCR	33
2.2.7. Restricción de Longitud de Fragmentos de Polimorfismo (RFLP)	34
2.2.8. PCR Anidada	35
2.2.9. NMPCR (Nested Multiplex PCR)	35
2.2.10. Comparación entre RFLP-MY09/11 y la NMPCR.	36
2.3. Hipótesis	38
2.4. Objetivo General	38
2.5. Objetivos Específicos	38

2.6. Justificación del Proyecto y aplicabilidad de los resultados	38
3. Metodología	40
3.1. Selección de muestras Biológicas	40
3.2. Calidad de ADN	41
3.3. Sistema PCR-MY09/11	42
3.4. Digestión con la enzima de restricción <i>HpyCH4V</i>	43
3.5. NMPCR (Sotlar)	45
3.6. Métodos Estadísticos	48
4. Resultados	49
4.1. Calidad del ADN	49
4.2. Sistema PCR-MY09/11	59
4.3. RFLP	59
4.4. Sistema NMPCR (Sotlar)	67
4.5. Minihistoria Clínica de los pacientes.	77
4.6. Resultados Estadísticos	83
4.6.1. Calidad del ADN	84
4.6.2. Sistemas MY09/11-RFLP vs NMPCR (Sotlar)	84
4.6.3. Correlación de infección múltiple y lesiones.	85
5. Discusión	97
6. Conclusiones	104
Recomendaciones	106
Referencias	113

Índice de figuras

1.1. Esquema del genoma viral del VPH. Genes E (Early), Genes L (Late) y LCR (Long Control Region) (Lie y Kristensen, 2008)	19
1.2. Detección y Tipificación de VPH mediante GP-E6/E7 NMPCR. Diagrama de las posiciones de los amplicones del genoma de VPH-16. PCR-Nested tipo específica de oligonucleótidos organizados en 4 cocteles. (Sotlar <i>y col.</i> , 2004)	20
2.1. Árbol filogenético basado en la región L1 y las secuencias ORF's de 170 tipos de VPH, usando secuenciamiento metagenómico (De Villiers, 2013)	22
2.2. Resultados positivos para los tipos específicos de VPH con PGMY09/11 y MY09/11 (Gravitt <i>y col.</i> , 2000)	37
3.1. Patrones de digestión con la enzima de restricción <i>HpyCH4V</i> de New England BioLab de 17 tipos de VPH (Cruz <i>y col.</i> , 2015).	44
4.1. Electroforesis para una PCR β -Globina para 42 muestras (Pozo 1 escalera LWM, Pozos 2 al 13 muestras clínicas) para determinar calidad de ADN.	50
4.2. Amplificados con MY09/11. Primer pozo escalera λ y 12 muestras clínicas. Pozos 2 y 12 fueron negativas para MY, mientras pozos 3 a 11 y pozo 13 fueron positivas para PCR-MY.	59
4.3. Amplificados con los oligonucleótidos degenerados MY09/11. Primer pozo escalera LMW y 5 muestras clínicas positivas para PCR-MY.	60

4.4. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% para digestión con HpyCH4V de 15 muestras clínicas. Pozo 1 y 17 escalera de bajo peso molecular. Los tipos de VPH detectados en este caso fueron los tipos 33, 45, 66 y 11.	61
4.5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para digestión con HpyCH4V de 3 muestras clínicas.	61
4.6. Electroforesis en gel de acrilamida para coctel I por NMPCR (Sotlar).	68
4.7. Electroforesis en gel de acrilamida para coctel II por NMPCR (Sotlar).	69
4.8. Electroforesis en gel de acrilamida para coctel III por NMPCR (Sotlar).	70
4.9. Electroforesis en gel de acrilamida para coctel IV por NMPCR (Sotlar).	71
4.10. Frecuencia de Tipos de Infección según el sexo de los pacientes.	89
4.11. Frecuencia de Tipos de Infección según clases de edades de los pacientes.	89
4.12. Frecuencia de Tipos de Infección según área de toma de muestra de los pacientes.	90
4.13. Frecuencia de Tipos de VPH según la colposcopia de los pacientes.	91
4.14. Frecuencia de resultados positivos y negativos de los pacientes para ambos sistemas.	93
5.1. Dispersión de los tipos de VPH detectados por NMPCR (Sotlar) y MY09/11.	103

www.bdigital.ula.ve

Índice de tablas

1.1. Tipos de VPH asociados a una patología caracterizada (Zur Hausen, 1996).	18
2.1. Historia de avances en el estudio del VPH con modificaciones (Syrjänen y Syrjänen, 2008).	26
2.2. Fragmentos de VPH. Marcadores usados en Southern blot.	31
2.3. Ventajas y desventajas entre RFLP-MY09/11 y la NMPCR. (Fuente: Este trabajo).	36
3.1. Cortes con la enzima de restricción <i>HpyCH4V</i> de L1 para los distintos tipos virales obtenidos de la base de datos del NCBI para una digestión virtual usando <i>NEBCutter</i> (Cruz y col., 2015).	45
3.2. Cocteles de oligonucleótidos usados en el sistema Nested Multiplex PCR (Sotlar y col., 2004)	47
4.1. Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar). Fuente: LABIOMEX.	51
4.2. Muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de PCR-MY09/11.	62
4.3. Resultados de la NMPCR (Sotlar) para las muestras seleccionadas. Fuente: LABIOMEX.	72
4.4. Minihistoria clínica de las muestras seleccionadas.	78
4.5. Pruebas de κ, χ^2 y Correlaciones para Beta Globina para 139 muestras.	84
4.6. Porcentaje de positividad para prueba de Beta-Globina en 139 muestras.	84

4.7. Pruebas de χ^2 RFP-MY09/11 vs NMPCR	85
4.8. Correlaciones κ y ρ de RFLP-MY09/11 vs NMPCR.	85
4.9. Valores de χ^2 para la Clínica, edad, sexo y área de toma de muestra de los pacientes vs los tipos de infección detectados por NMPCR.	85
4.10. Tipo de Infección relacionados con la clínica (+/-) presentada por los pacientes en la minihistoria.	86
4.11. Tipos de Infección en las clases de edades (en años).	87
4.12. Frecuencia de pacientes positivos para VPH por NMPCR según el sexo de los pacientes	92
4.13. Tipos de Infección según el área de muestra clínica para 139 muestras procesadas con NMPCR.	94
4.14. Tipos de Infección según la citología de los pacientes para 139 muestras procesadas con NMPCR.	94
4.15. Tipos de Infección según la colposcopia de pacientes procesados con NMPCR.	95
4.16. Tipos de Infección y biopsias de 139 pacientes por NMPCR.	95

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 1

Introducción

A pesar de la gran diversidad de los tipos virales de papiloma humano, su organización genética está bastante conservada y ligeras variaciones en su secuencia nucleotídica determinan el tropismo y el potencial oncogénico de cada uno de los tipos virales. Todos los genes están ubicados en una sola hebra, la transcripción es unidireccional y usan un procesamiento diferencial de corte y empalme para la expresión individual de cada uno de sus genes (Bernard *y col.*, 1993). El rápido incremento del número de papilomavirus aislados obligó a establecer un sistema de clasificación taxonómica dentro de la familia *Papillomaviridae*. Este sistema de clasificación tiene como objetivos: Primero, establecer una relación entre los tipos virales, segundo, comparar el término tipo contra los términos taxonómicos género y especie, los cuales son usados para la sistemática de todos los organismos biológicos y son frecuentemente aplicados en virología, y tercero, investigar las relaciones entre la clasificación taxonómica y las propiedades biológicas y patológicas del virus (De Villiers *y col.*, 2004). El empleo de la secuencia nucleotídica para establecer relaciones entre Papilomavirus, surgió hace 20 años, cuando E. M de Villiers, del Centro de Referencia para Papilomavirus del Centro de Investigación Alemán del Cáncer en Heidelberg, Alemania, integró un sistema de clasificación y los nuevos tipos de Papilomavirus son registrados en este centro sólo si se confirma que el genoma ha sido completamente clonado a fin de corroborar que tiene la organización genética típica de los papilomavirus y la secuencia nucleotídica del gen L1 difiere en más de un 10% con respecto a otro tipo viral (Chan *y col.*, 1992). Actualmente, la taxonomía oficial

de los VPH está basada únicamente en la comparación de la secuencia nucleotídica del ORF L1, debido a que es el gen más conservado dentro del genoma viral y aun así, presenta ligeras diferencias nucleotídicas que han permitido establecer las diferencias. También se han empleado otros genes que han conduciendo a asociaciones taxonómicas similares pero no idénticas. Los estudios filogenéticos sugieren que estos virus, de origen monofilético, coevolucionaron con la especie humana, por lo que se especula un origen africano; mientras que la diversificación de las variantes de cada tipo viral estuvo enlazada con la evolución y la migración del humano moderno, hace más de 200 mil años. Esta hipótesis sugiere que todo el espectro de enfermedades asociadas a las infecciones con VPH tales como: cáncer anogenital, verrugas genitales y laringeas, han acompañado al humano a lo largo de su evolución (ver tabla 1.1). En los últimos años se ha podido establecer comparaciones entre secuencias de un mismo tipo viral junto con una secuencia referencial o prototipo y se ha determinado que un mismo tipo viral puede presentar diferentes genotipos que varían entre sí, en un 2% en la región L1. Estas variantes intratipo, han demostrado poseer una limitada diversidad genómica, lo cual sugiere una baja tasa evolutiva. Incluso, la aparente ausencia de recombinación inter e intratipo, aunado a que la replicación de estos virus depende estrechamente de la maquinaria celular hospedera con la que está en sincronía, pueden colaborar con la limitada diversidad genómica de las variantes virales (Nazzari *et al.*, 2008).

El VPH es una de las infecciones de transmisión sexual más común a nivel mundial relacionado con factores de riesgo predisponentes a la malignización de las lesiones propias del VPH (Rebolledo *et al.*, 2016), en especial en nuestro país que es la causa de cáncer cérvicouterino, cuyos pacientes afectados en su mayoría mujeres; presentan lesiones intraepiteliales que son detectadas con técnicas de biología molecular que son de alta sensibilidad. Actualmente se conocen aproximadamente alrededor de 300 tipos de VPH, empero existen tipos de VPH más agresivos como VPH 16 y VPH 18 (López-Bueno *et al.*, 2016). El Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX, adscrito a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, desarrolla mediante técnicas de biología molecular; detección, tipificación e identificación de múltiples tipos de VPH. Frecuentemente acuden voluntariamente a este laboratorio, personas para realizarse un examen de tipificación de VPH, provenientes de consultas médicas

públicas y privadas ya que cada vez aumentan más las cifras de infectados por VPH, por lo que es imperioso el estudio de las poblaciones infectadas, así como los tipos más comunes, siendo esto un factor de anclaje para el secuenciamiento y clonamiento para posterior expresión que permita el desarrollo de vacunas y desarrollo de métodos más sensibles y precisos que permitan identificar en el menor porcentaje de error el tipo de VPH y caracterización de controles de calidad; así como el mejoramiento e innovación de kits que permitan estar a la vanguardia de las técnicas moleculares (Howard, 2010). La figura 1.1 muestra la estructura genómica del Virus del Papiloma, que consta de 7200-8000 pb de ADN circular cerrado doble cadena que contiene 10 ORF's. La estructura del genoma viral, revela similitudes entre los distintos tipos viral: generalmente una cadena es transcripcionalmente activa, y la localización de los ORF's indica un grado de correspondencia. La región LCR abarca el 10% del genoma y contiene elementos *cis* activo que regulan la transcripción de los genes E6 y E7 que llevan a cabo funciones reguladoras de inmortalización del genoma viral en los tipos de células malignas del genotipo de VPH en cáncer cervical, la región L codifica para proteínas estructurales (L1 proteína mayor de la cápside y L2 proteína menor de la cápside), la región E mantiene funciones de regulación que comprometen la persistencia del genoma viral en el genoma de hospedador, replicación y el ciclo lítico (Zur Hausen, 1996).

Tabla 1.1: Tipos de VPH asociados a una patología caracterizada (Zur Hausen, 1996).

TIPOS DE VPH	CARACTERISTICAS COMUNES
1	Verrugas de plantas.
2,4,27,29	Verrugas comunes.
3,10,28	Verrugas planas.
5,8	Lesiones EV Benignas/Malignas
6,11	Verrugas genitales, Papilomatosis laríngea
7	Verrugas sangrantes, Papilomas oral de pacientes con VIH
9,12,14,15,17,19,20,21,22,23,24,25,46,47,50	EV Lesiones.
13,32	Oral focal, Oral Papilomas, Hiperplasia Epitelial.
16,18 ,31,33,34,35,39,40,42,43,44,51,52,53,54,55,56, 58 ,59,61,62,64,67,68,69,74.	Neoplasias Intraepitelial Anogenital y Cáncer.
26	Verrugas comunes bajo inmunosupresión.
49	Verrugas planas bajo inmunosupresión.
30	Carcinoma Laríngeo.
36	Keratosi Actínica.
37	Keratoacantinoma.
38	Melanoma.
48	Células escamosas cutáneas, carcinoma
57	Oral Papilomas, Maxilar sinus papilomas.
60	Epidermoquiste.
63	Verrugas Myrmecia.
65	Verrugas pigmentadas.
66	Carcinoma Cervical.
70	Papiloma Vulvar.
72,73	Oral Papilomas en pacientes con VIH.
75,76,77	Verrugas comunes en órgano receptor de injerto.

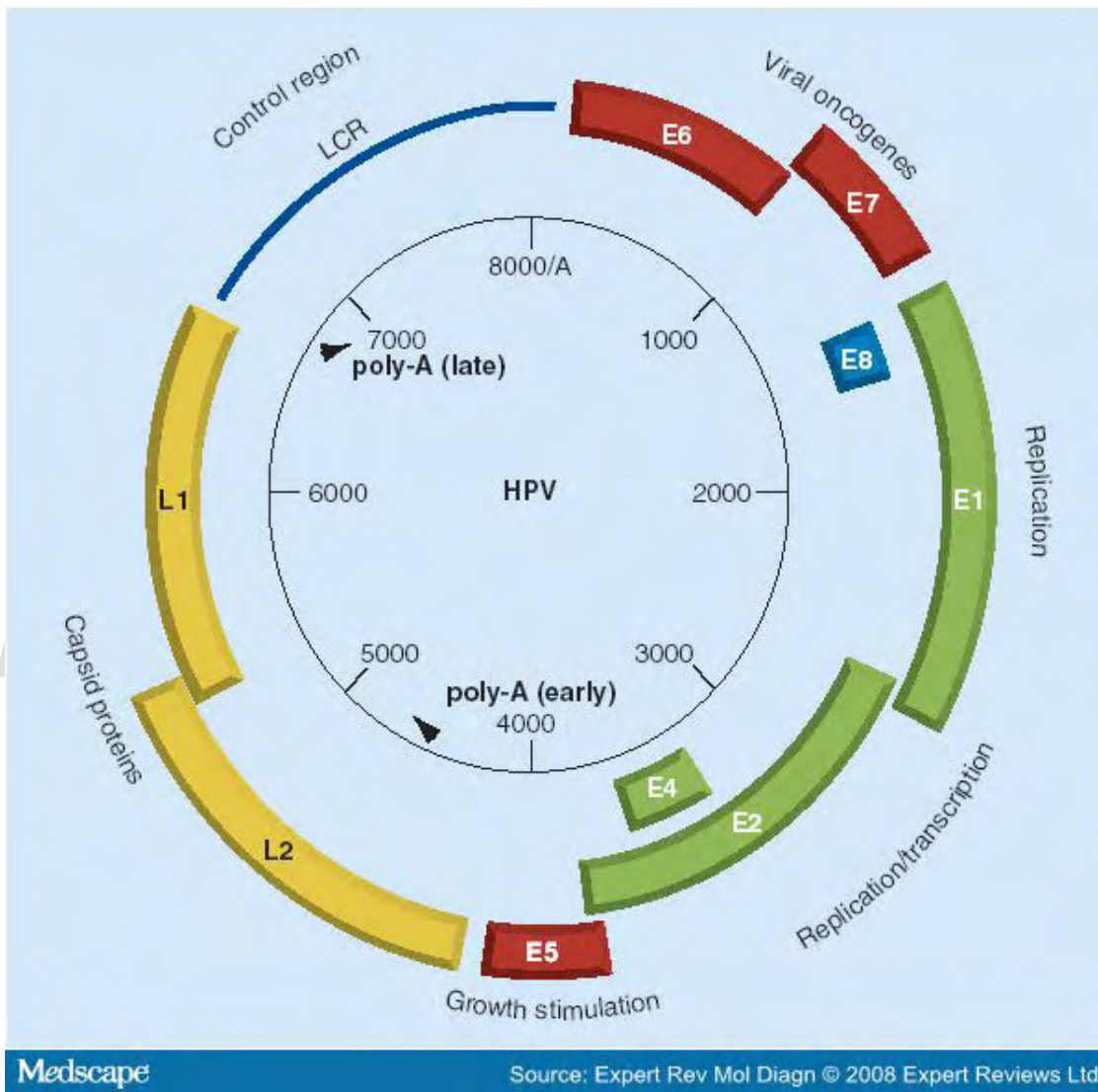


Figura 1.1: Esquema del genoma viral del VPH. Genes E (Early), Genes L (Late) y LCR (Long Control Region) (Lie y Kristensen, 2008)

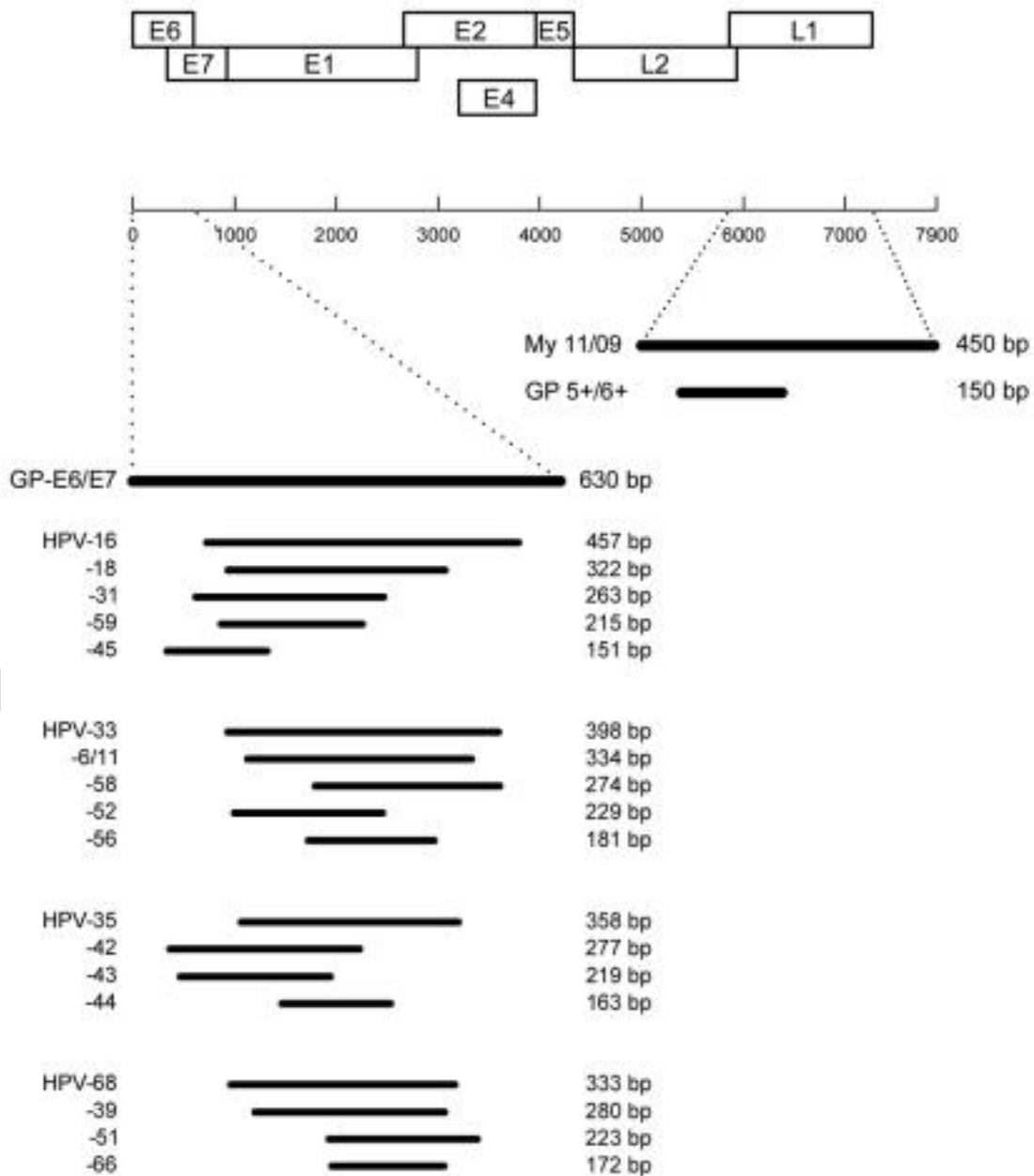


Figura 1.2: Detección y Tipificación de VPH mediante GP-E6/E7 NMPCR. Diagrama de las posiciones de los amplicones del genoma de VPH-16. PCR-Nested tipo específica de oligonucleótidos organizados en 4 cocteles. (Sotlar y col., 2004)

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Virus de Papiloma Humano

El virus del Papiloma Humano está conformado por un ADN viral de doble cadena circular covalentemente cerrada que se encuentra a su vez en un grupo mayor denominado comúnmente papilomavirus, y que se ubica taxonómicamente en la familia *Papillomaviridae*. Los papilomavirus son virus pequeños, no envueltos con genoma de ADN de doble cadena y que tienen afinidad por el tejido epitelial. Muchos de ellos están asociados con infección en humanos; producen lesiones en piel (verrugas) y en mucosas (condilomas), pero también están asociados con algunos procesos malignos en epitelio, como cáncer cervicouterino y otros tumores del tracto anogenital. La familia *Papillomaviridae* contiene 16 géneros, los cuales son nombrados con una letra griega como prefijo y con la terminación papilomavirus; por ejemplo: Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, etcétera (Ver figura 2.1). Desde el punto de vista clínico, los papilomavirus humanos que infectan la mucosa del tracto genital (los cuales están ubicados en el género *Alphapapillomavirus*) han sido divididos en dos grupos: los de bajo riesgo, que se asocian principalmente con verrugas genitales benignas, y los de alto riesgo, que presentan un alto potencial oncogénico y son los agentes etiológicos del cáncer cervicouterino. En este trabajo revisamos algunos aspectos sobresalientes de la estructura, el ciclo replicativo y la clasificación de los virus de papiloma humano, pero con un enfoque en las técnicas de detección como lo es la PCR-RFPL usando los oligonucleótidos MY09/11 y NMPCR propuesto por Sotlar (De Villiers, 2013; Ferenczy,

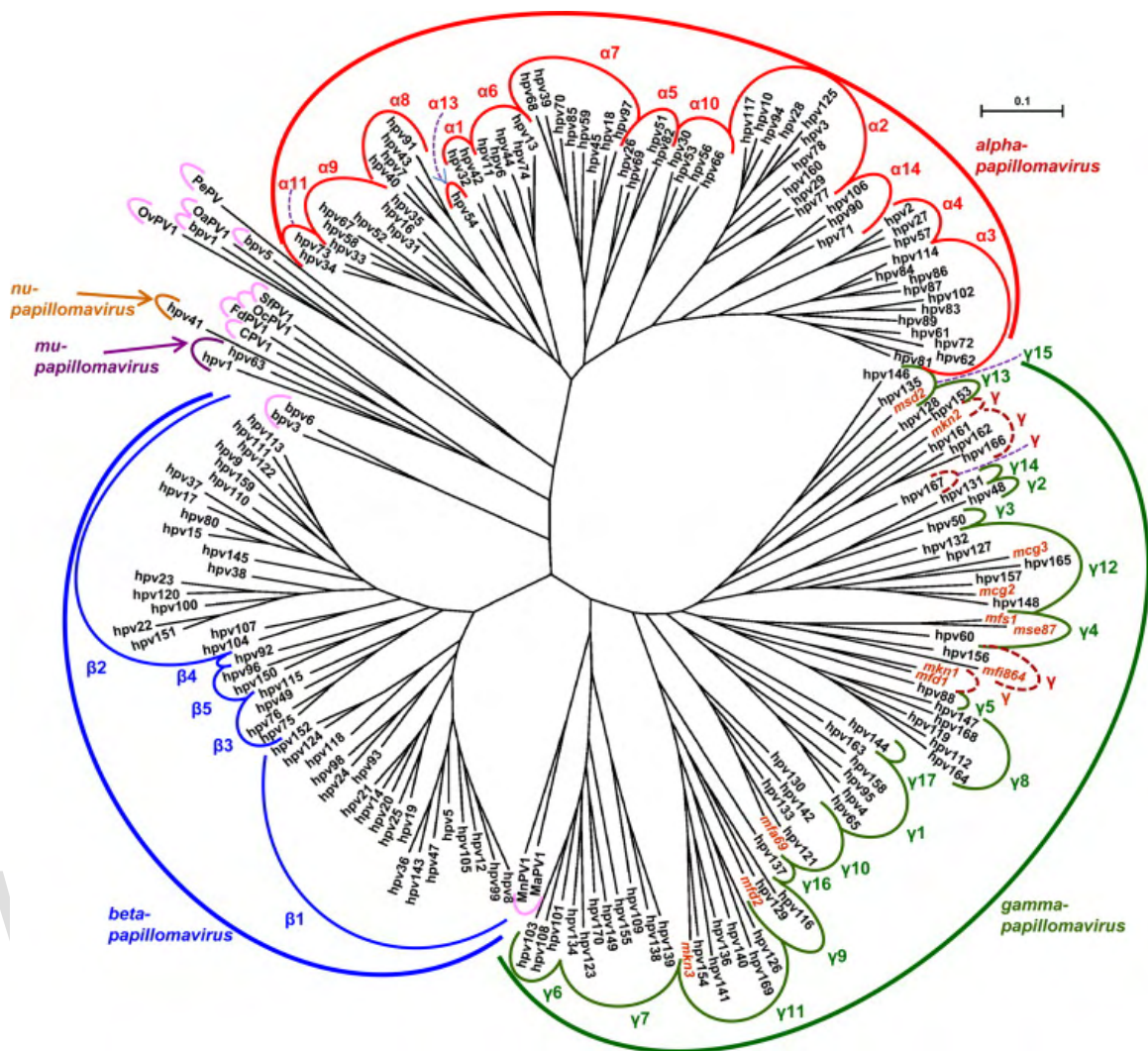


Figura 2.1: Árbol filogenético basado en la región L1 y las secuencias ORF's de 170 tipos de VPH, usando secuenciamiento metagenómico (De Villiers, 2013)

1997; Sotlar *y col.*, 2004).

Las partículas del VPH son icosaédricas no presentan envoltura y miden entre 52 y 55 nm de diámetro. La cápside está constituida por 72 capsómeros pentaméricos de la proteína más abundante (L1) en un arreglo con número de triangulación (T) de 7. Otra proteína de la cápside denominada L2 se asocia internamente a un subgrupo de capsómeros formados por L1 (Richards *y col.*, 2006). Los viriones son resistentes al éter, ácidos y calor (50 °C por una hora). En los viriones no se han encontrado componentes de naturaleza lipídica ni glicosídica. Dentro de la cápside se ubica el genoma viral, que está constituido por ADN de doble cadena covalentemente cerrado. El genoma de los

papilomavirus mide entre 6800 y 8400 pb y se encuentra asociado con proteínas del hospedero, las histonas H2a, H2b, H3 y H4, en una estructura del tipo de la cromatina del hospedero (Howley y Lowy, 2007).

El genoma ha sido dividido en tres regiones principales: una región reguladora no codificante de aproximadamente 1 kb, la cual se denomina región larga de control (LCR); una región que incluye genes de expresión temprana, que dan origen a proteínas no estructurales y una región que contiene los genes de expresión tardía, que dan origen a dos proteínas estructurales. En total se encuentran 9 o 10 ORF's y en todos los papilomavirus están localizados en una sola de las hebras del ADN genómico. La región LCR contiene elementos de respuesta para factores de transcripción celulares, tales como AP1, SP1, Oct1, etcétera, así como para las proteínas virales E1 y E2, que controlan la replicación y la expresión del genoma viral (Conway y Meyers, 2009). Particularmente, se ha determinado que el VPH 16 posee elementos conocidos como PE (o p97) y PL (o p670), que son promotores que regulan la expresión de genes tempranos y tardíos, respectivamente, así como la presencia de ARNm con modificaciones de corte y empalme (splicing) durante la diferenciación de las células epiteliales. Los marcos de lectura se agrupan en dos conjuntos denominados genes de expresión temprana (E, early) y genes de expresión tardía (L, late). En el primer grupo se encuentran E1, E2, E4, E5, E6 y E7, mientras que en el segundo se encuentran L1 y L2 respectivamente.

2.1.1. Historia

Los primeros trabajos sobre verrugas humanas y virus datan desde principios del siglo XX, cuando el italiano G. Ciuffo reportó que a partir de un filtrado libre de células se podía reproducir la presentación de verrugas (Ciuffo, 1907). Lewandowsky y Lutz (1922) reportaron una rara verrucigosis en humanos con carcinoma de piel desarrollado en sitios expuestos al sol, ellos lo llamaron *Síndrome Epidermodisplasia Verruciforme* (Lewandowsky y Lutz, 1922). En la década de 1930, Rous y col. realizaron experimentos con conejos domésticos para estudios de interacciones carcinogénicas. (Rous y Beard, 1935a,b; Rous y Kidd, 1938), en esa misma década, R. Shope y E.W. Hurst demostraron que los papilomavirus pueden causar carcinoma de piel en conejos (Shope y Hurst, 1933). En 1949 se visualizó por primera vez las partículas del

Papilomavirus provenientes de verrugas, la presencia del virus pudo ser comprobada visualmente mediante microscopía electrónica con los trabajos de M.J. Strauss. (Strauss *y col.*, 1949). Olson *y col.* en 1959 reportaron la inducción de tumores en tejidos urinarios de ganado que presentaba papiloma bovino y fibropapilomas hallados en Hamsters (Olson *y col.*, 1959). En 1963, Crawford y Crawford dilucidaron la estructura del genoma viral (Crawford y Crawford, 1963). En 1970 Zur Hausen da a conocer la etiología del cáncer de cérvix y propuso que un virus podría ser el agente etiológico del cáncer cervical en humanos (Zur Hausen, 1976; Zur Hausen *y col.*, 1974). En 1972 Jablonska *y col.* realizaron la inducción autoinoculando papilomas en extracto de tejidos intracutáneos y proponen que sirve como modelo de estudio del Papilomavirus en oncogénesis (Jablonska *y col.*, 1972). Meisels y Fortin en la misma década, dan a conocer que los tipos virales 6 y 11 (bajo riesgo) y los tipos 16 y 18 (alto riesgo), donde los coilocitos dan origen a las lesiones por papilomavirus (Meisels y Fortin, 1977). En la década de 1980, Zur Hausen continuando con su trabajo, demostró con un análisis de Southern blot la presencia de ADN de dos tipos de virus de papiloma en biopsias de cáncer cervical, nuevos por aquel entonces: los virus de tipo 16 y los de tipo 18 (Brassard *y col.*, 2012; Thappa *y col.*, 2016; Zur Hausen, 1996). La tabla 2.1 muestra un resumen de la historia en la búsqueda, detección de VPH y su asociación con patologías.

Las oncoproteínas E6 intervienen en la apoptosis, regulación de la transcripción, estabilidad cromosómica, diferenciación y organización epitelial, adherencia célula-célula, polaridad y control de la proliferación de células infectadas (Melo *y col.*, 2003). Durante la progresión a cáncer, se generan cambios importantes en la expresión de los genes virales, estos cambios son diferentes y dependen del tipo viral (Bernard *y col.*, 1993). Normalmente, durante la infección con VPH el genoma viral se mantiene en bajo número de copias como episoma y durante la diferenciación del epitelio se incrementa la expresión de las proteínas E1, E2, E4 y E5 así como L1 y L2 produciendo el ensamblaje y la liberación de los viriones (Chan *y col.*, 1992). En la progresión a cáncer cervical, la producción de viriones se restringe a pequeñas áreas en la superficie del epitelio y la integración del genoma del virus en el genoma de la células va acompañado de la pérdida de la regulación de la expresión de E6 y E7, así como la pérdida de los genes E2, E1 y L1 (Aires *y col.*, 2006). Debido a la interrupción del ORF de E1 y

E2 se genera sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 que favorece la transformación maligna (Aguilar y Campos, 2007) E6/E7 estimula la proliferación de oncoproteínas estimulando la actividad de las ciclinas E y A, interfiriendo con la proteína del retinoblastoma (pRB) y la proteína p53. Las interacciones tardías responsables de tales mutaciones, cumplen un rol en la progresión de lesiones y de elementos carcinogénicos de los tipos de VPH de alto riesgo (Zur Hausen, 1996).

Actualmente con la ayuda de la bioingeniería, cada vez mejorada está diseñada en estudiar la capacidad para el transporte predecible y visualización de antigénica, módulos de inmunoestimulantes para el diseño de vacunas, estudios incluyendo biomoléculas y ácidos nucleicos, traducción de productos incluyen a corto o mediano plazo, vanguardia de métodos para tipificar VPH cada vez más preciso, a un costo razonable que superen las limitaciones actuales relacionadas con los costos y la calidad (Lua *y col.*, 2014).

2.2. Detección: Técnicas y Fundamentos

Los condilomas y la evolución o progresión de Cáncer Cervical, son factores decisivos para la escogencia de un método de detección adecuado para la detección viral de VPH en las muestras clínicas (Westra *y col.*, 2013). Por tanto es menester tomar en cuenta el origen de las muestras clínicas a analizar debido a que pueden ser de procedencia en pacientes con historial clínico de NIC I, II, III, lesiones de bajo grado, de alto grado que dependiendo del sistema de diagnóstico, en una técnica señala el tipo de lesiones, en otras detecta la carga viral. Hay pacientes que no muestran lesiones pero si tienen el virus, por ello existen varias técnicas moleculares suficientemente sensibles y confiables para la detección del VPH, tales como la *Hibridación in situ*, que implica el empleo de sondas para detectar secuencias específicas de ADN, además la visualización de los núcleos teñidos infectados por el VPH, bajo visión microscópica (Guzmán *y col.*, 2010). Desafortunadamente, este último método es relativamente inexacto y ha sido superado por métodos tales como el Southern Blot, la captura de híbridos, PCR y otras variantes como RFLP, SSCP, RT-PCR, PCR anidada y la NMPCR (Cruz *y col.*, 2015; Quintero *y col.*, 2008; Sotlar *y col.*, 2004).

Tabla 2.1: Historia de avances en el estudio del VPH con modificaciones (Syrjänen y Syrjänen, 2008).

Año	Autor	Descubrimiento
460-377 B.C.	Hipócrates	El nombre condilomas en verrugas genitales
25 A.D.	Celsus	Tres tipos de verrugas de piel: acrochordon, thymion, myrmecia
1842	Rigoni-Stern	“Venereal” nature of cervical cancer: rare in virgins and nuns
1891	Payne	Naturaleza infecciosa de las verrugas
1901	Heidingsfield	Condilomas Orales: Signo de sexo ilícito
1907	Ciuffo	Demostración de la naturaleza viral de las verrugas de piel
1923	Ullman	Demostración de la naturaleza viral de los papilomas laríngeos
1933	Shope y Hurst	Aislamiento y caracterización del Papilomavirus en conejos (CRPV)
1935	Rous y Beard	Desarrollo de carcinomas de piel en conejos en acciones duales de sinergia entre (CRPV) de carcinógenos químicos
1938	Kidd y Rous	Historia Natural de los carcinomas en conejos
1944	Friedewald y Rous	
1949	Parson y Kidd	
1949	Ayre y Ayre	Células Halo en carcinogenesis cervical
1949	Strauss y col.	Partículas de VPH en verrugas de piel sobre EM
1950	Syverton y col.	Secuencia de Papiloma a carcinoma en conejos
1951	Olson y col.	Sarcoides equinos causados por un agente de papiloma bovino
1954	Barrett y Silbar	Verrugas genitales mostraron ser un STD
1956	Koss y Durfee	El concepto de coilocitosis en PAP y biopsias cervicales
1957	Jablonska y col.	Epidermodisplasia verruciformis como una enfermedad viral
1961	Ito y Evans	Inducción de papilomas en conejos domésticos por CRPV
1965	Crawford; Klug y Finch	Caracterización molecular y estructural del ADN del Papilomavirus extraído de verrugas de piel
1962	Melnick	Grupo Papova Virus Humano
1967	Rowson y Mahy	Demostración en ME de partículas virales en verrugas genitales
1968	Dunn y Ogilvie	Estudios preliminares en anticuerpos responsables de verrugas cutáneas y genitales

Historia de avances en el estudio del VPH con modificaciones (Syrjänen y Syrjänen, 2008).

Año	Autor	Descubrimiento
1972-75	Pyrhönen y col.	Tipos de VPH difieren en verrugas de plantas y genitales
1974	zur Hausen	Hipótesis presentada como el VPH como agente potencial causante del cáncer cervical
1975-76	zur Hausen	Diversidad de tipos de Papilomavirus
1976	Gissmann y zur Hausen; Meisels y col.	Descripción de atipia coilocitótica como un signo de VPH en lesiones planas del cuello uterino y cervix
1977	Gissmann et al; Orth y col.	
1977	Purola y Savia	Anticuerpos de virus detectados en perros, cerdos y vacas
1978	Pyrhönen y col.	
1978	Della Torre y col.	Demostración de partículas de VPH en lesiones displásicas de cérvix en ME
1979	Hills y Laverty	Tipos de VPH específicos derivados en carcinoma de piel
1978	Orth y col.	
1978-80	Quick y col.	Trabajos clásicos sobre papilomas laríngueos, atipia y asociación con VPH
1979	Syrjänen, K.	Células coilocíticas en cáncer cervical invasivo y Cambios sugestivos en células escamosas en cáncer bronqueal
1979	Law y col.	Clonamiento e hibridización dl gen bajo condiciones no restringentes en búsqueda de VPH
1979	zur Hausen y Coggin	Sistema de clasificación de VPH
1980	Gissmann y zur Hausen	Caracterización del VPH-6 de un condiloma acuminado con lesión
1981	de Villiers	Clonamiento de VPH-6 en vectores bacteriales
1982	Gissmann y col.	Clonamiento y caracterización del VPH-11 de un papiloma laríngueo
1981	Syrjänen y col.	Primera prospectiva seguida de un estudio de infecciones cervicales iniciadas con VPH
1982	Syrjänen y col.	Envolvimiento del VPH en células escamosas y cáncer de esófago
1982	Jenson y col.	VPH en células escamosas y lesiones (malignas y benignas)
1983	Syrjänen y col.	VPH en papilomas nasales y senos/cavidades paranasales
1983	Dürst y col.	Caracterización del VPH-16 en biopsias de cáncer cervical

Historia de avances en el estudio del VPH con modificaciones (Syrjänen y Syrjänen, 2008).

Año	Autor	Descubrimiento
1983	Syrjänen, S. y col.	
1984	Boshart y col.	Caracterización del VPH-18 en biopsias de cáncer cervical
1985	Kreider	Condilomas inducidos por VPH-11 en ratones
1985	Beckman et al y Gupta y col.	Hibridización in situ en biopsias
1986	Lörincz y col.	Caracterización del VPH-31
1986	Beaudenon y col.	Caracterización del VPH-33
1986	Yasumoto y col.	Transformación maligna de células NIH3T3 por VPH-16
1987	Pirisi et al y Dürst y col.	Inmortalización de keratinocitos por VPH-16
1988	Laimins y col.	Medio organotípico raft como modelo in vitro de búsqueda en VPH
1989	Dyson y col.	VPH relación de E7 con proteína Rb
1990	Werness y col.	VPH relación de E6 con proteína p53
1992	Kirnbauer y col.	Producción de partículas similares a virus por autoensamblaje de L1 y L2
2006	Merck; GSK	FDA aprobó la vacuna de VPH tetravalente
2016	P. Van Damme y col.	Uso de vacunas nonavalentes en individuos previamente vacunados con vacunas bivalentes y tetravalentes (Van Damme <i>y col.</i> , 2016)

Sin embargo, la prueba de Papanicolaou es el método convencional usado para detectar lesiones, neoplasias y para el cribado precursor de estas lesiones y sigue siendo usado para exploración de anomalías en el cuello uterino, así como la colposcopia (Papanicolaou y Traut, 1941).

Estudios de Park y col. analizaron la eficacia y nitidez de la PCR usando los oligonucleótidos degenerados MY09/11 reportaron una tasa de detección significativamente alta con los oligonucleótidos para E6 de 54 % en comparación con un 26 % con los oligonucleótidos para L1, no obstante, a pesar de los resultados obtenidos, apoyan el uso de los oligonucleótidos consenso L1 por su capacidad para detectar simultáneamente varios tipos de VPH (Park y col., 1993; Phillips y col., 2016).

2.2.1. Prueba Papanicolaou

La prueba de Pap fue desarrollada por el Dr George Papanicolaou (Papanicolaou y Traut, 1941), un anatomista Americano de ascendencia griega quien estaba comprometido con la investigación del efecto de las hormonas ováricas en el epitelio del tracto genital femenino. En 1926 reportó que las células tumorales podían ser vistas en las secreciones vaginales de las mujeres con cáncer de cuello uterino. La prueba consiste en una exploración para la prevención del cáncer cervico-uterino, consistiendo en la remoción de células epiteliales mediante una espátula para colocarlas en una lámina de vidrio para luego ser teñidas y analizadas. Es ventajosa en sentido preventivo, a su vez en la exploración de pacientes que presentan anomalías en la cervix. Este método indica presencia/ausencia de verrugas, cuello o células anormales pero no determina qué tipo de VPH presenta el paciente, así como es inefectivo en el caso de pacientes con infección pero que no presentan lesión alguna (Zamudio y col., 2001).

2.2.2. Colposcopia

Es un método exploratorio donde se analiza el cuello uterino mediante un microscopio de baja potencia para visualizar mejor el área. El cuello uterino y la vagina se frota suavemente con una solución de vinagre o yodo, esto remueve el moco que recubre la superficie y resalta áreas anormales; el médico coloca el colposcopio en

la abertura de la vagina. Si algunas áreas lucen anormales, se extraerá una muestra pequeña de tejido usando pequeñas herramientas para biopsia. Se pueden tomar muchas muestras. Algunas veces, se retira una muestra de tejido del interior del cuello uterino, lo cual se denomina legrado endocervical (LEC). Es un método idóneo para analizar lesiones cervicales y cáncer cervical, se practica cuando se presenta irritación el el cuello uterino (cervicitis), anormalidad en células o verrugas. Para la realización de este examen el paciente debe considerar no practicar relaciones sexuales 24 horas antes de realizarse el examen, no hacerse duchas vaginales y abstenerse a usar productos como óvulo vaginales, cremas (Zamudio *y col.*, 2001).

2.2.3. Southern blot

Es un método de sonda directa que permite la detección de una secuencia de ADN mediante un gel de agarosa donde se separan las moléculas por su peso y luego, se transfiere a una membrana soporte de celulosa o de nylon en la cual se hibridiza con una sonda, se inmoviliza los fragmentos de ADN mediante autorradiografía. Las moléculas son transferidas del gel a una membrana porosa por acción capilar usando papel absorbente o solución reveladora del gel hacia la membrana. Una de las desventajas es la laboriosidad y tiempo para obtener resultados (alrededor de 5 días)(Southern, 2006). La técnica con Southern blot está perfilada en la migración de las moléculas por su peso de los VPH tipos 6, 11, 16, 18,33 y 35; cuyas medidas está dada por marcadores de fragmentos. Las pruebas son seleccionadas cuando los fragmentos hacen match con las secuencias a analizar. La biotinización es visualizada con Estreptavidina y fosfatasa alcalina, seguida de reacciones sucesivas usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y azul nitro tetrazolium (ver tabla 2.2) (Lindh *y col.*, 1992).

Tabla 2.2: Fragmentos de VPH. Marcadores usados en Southern blot.

Tipos de VPH	Peso de los fragmentos(Kb)
6	0,7
11	1,4
16	1,8
18	1
31	2,8
33	2
35	0,5

2.2.4. Hibridación in situ (HIS)

La *Hibridación in situ* es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados, puede realizarse en extensiones citológicas o cortes tisulares. La técnica fue desarrollada en 1969 por Gall y Pardue (Gall y Pardue, 1969) e independientemente por John y col. en el mismo año (John y col., 1969). Gall y col. describieron una técnica que formaba híbridos moleculares entre ARN y ADN. La técnica se llevó a cabo en unidades ribosomales 26S de ovocitos de *Xenopus laevis*, hibridando ARNr con ADNr extracromosomal. La hibridización involucra el apareamiento de hebras complementarias de ácidos nucleicos (ADN o ARN). Esta reacción es reversible y las hebras híbridas pueden ser separadas mediante tratamientos con calor o sustancias alcalinas para romper los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases nitrogenadas complementarias. Esta es una de las herramientas más importantes en el análisis molecular; si se adiciona un marcador a una de las hebras de ácido nucleico, puede ser utilizada como sonda para el análisis de HIS, que permite la visualización de las señales hibridizadas por medio de métodos isotrópicos o colorimétricos (Cañadas y col., 2006; Franco, 2013). Basándose en la complementaridad que puede ser ADN, ARN o ADN-ARN, donde el apareamiento de las bases mediante los puentes de hidrógeno da lugar a una doble cadena y una de ellas es leída en el sentido 5'-3'. La técnica se basa en la escogencia según el

investigador y de su estudio en las sondas a utilizar si es ADN simple cadena o doble cadena, o si es ARN. En el caso de usar como sonda ARN hay que recordar usar la reversa complementaria ya que la secuencia complementaria en la dirección 5'-3'. La hibridación utiliza sondas largas > 100 nucleótidos y con alto contenido GC para dar mayor estabilidad por los enlaces triples. Para el marcaje de la sonda se utiliza isotopos radiactivos (isotópica) como el Titrio, Hidronio, Fósforo 35 y 33, Azufre 35. En las sondas no radiactivas (no isotópicas) se usan haptenos, digoxigenina, biotina, fosfatasa alcalina particularmente. Una de las ventajas es la alta eficiencia en el marcaje pero la desventaja es alta radiactividad; en el método no isotópico puede haber buena retención del color, reproducibilidad y larga vida de la sonda, pero tiene dificultad en la detección de sondas que poseen secuencias repetitivas lo que le confiere un error en el marcaje y ruido de fondo si el tejido fue teñido excesivamente u obtener resultados falsos negativos debido a la toma de muestra en donde el virus está de manera episomal o integrado al genoma. (Collado *y col.*, 2007).

2.2.5. Captura de híbridos

Es un método en el que se utilizan sondas ARN específicas que son dirigidas hacia secuencias individuales del ADN viral, que comprenden los genotipos de VPH a ser detectados. Se emplea un anticuerpo que es dirigido contra híbridos ADN-ARN (captura), y para la posterior detección, marcado con una molécula informante y visualizado por un sistema quimioluminiscente. Los genotipos de VPH pueden ser agrupados como tipos de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44), y de riesgo intermedio/alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). En esta técnica se utilizan sondas de ARN capaces de detectar varios tipos de VPH. Cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido ARN-ADN que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA por quimioluminiscencia y que proporciona incluso información sobre la cantidad de ADN viral presente en la muestra, que parece tener relación con la presencia de lesiones de alto grado. La Captura de Híbridos proporciona una cuantificación de VPH, generalmente existe un incremento progresivo de carga viral evaluada en unidades lumínicas relativas (RLU), paralelo a la gravedad de la lesión. Es sensible pero puede revelar resultados equivocados

por reacción cruzada de los VPH de alto riesgo con los de bajo riesgo. (Collado *y col.*, 2007).

2.2.6. PCR

La Reacción de Cadena de la Polimerasa es un método novedoso desarrollado por Kary Mullis en 1980. Está basada en la habilidad de la ADN polimerasa para sintetizar una nueva cadena de ADN complementario a partir de un ADN blanco. El ADN polimerasa agrega un nucleótido sólo en un extremo preexistente del grupo 3'-OH, ahí necesita un par de oligonucleótidos para agregar el primer nucleótido. Este requerimiento hace posible amplificar la secuencia que se requiere, obteniendo al final de la PCR millones de copias (amplicones) (Rodríguez y Barrios, 2011). Los componentes de una PCR son:

ADN blanco:

Es la muestra de ADN que contiene la secuencia a amplificar. Al inicio de la reacción, se aplica una alta temperatura para separar las hebras del ADN ($T = 97-98^{\circ}\text{C}$).

ADN polimerasa

Es un tipo de enzima que sintetiza nuevas cadenas del ADN complementario a partir de la secuencia blanco. La enzima comúnmente usada es la Taq ADN Polimerasa (de *Thermus aquaticus*); Pfu ADN Polimerasa (de *Pyrococcus furiosus*) es usada por su alta fidelidad al replicar. Sus ventajas para el uso en la PCR es su: 1) su capacidad de generar nuevas cadenas a partir de una muestra de ADN y oligonucleótidos, y 2) resistencia a altas temperaturas (Rodríguez y Barrios, 2011).

Oligonucleótidos

Son cortas secuencias de ADN que sirven como iniciadores de la replicación. Se recomiendan que no sean > 20 nucleótidos (Rodríguez y Barrios, 2011).

Nucleotidos (dNTP's o Deoxinucleotido trifosfatos)

Son unidades de las bases nitrogenadas A, T, G, y C, son esencialmente "bloques constructores" de la nueva cadena de ADN (Rodríguez y Barrios, 2011).

La PCR es un método rápido, fácil, efectivo y económico en comparación a otros métodos que, cuidando que las muestras no se contaminen, una óptima calidad del ADN, o que haya algún inhibidor de la reacción; puede ser un método de diagnóstico poderoso. Gravitt y colaboradores realizaron una reacción PCR con PGMY09/11 y MY09/11 obteniendo resultados positivos para los tipos de VPH (Ver figura 2.2) En el VPH existe los oligonucleótidos FAP, CUT, PGMY, MY09/11, GP5/6 para amplificar la secuencias del gen L1 obteniendo un amplio espectro o rango de tipos de VPH (Quintero *y col.*, 2008).

2.2.7. Restricción de Longitud de Fragmentos de Polimorfismo (RFLP)

Es un método para diferenciar secuencias de ADN homólogas que pueden ser detectadas por la presencia de fragmentos de diferente longitud después de la digestión del ADN en cuestión con endonucleasas de restricción específicas. La RFLP, como un marcador molecular, es específica para un simple clon/restricción de una combinación enzima.

Muchos marcadores de RFLP son codominantes (ambos alelos heterocigotos en una muestra será detectada) y altamente específica para un locus.

Una prueba con RFLP coontiene la secuencia de ADN que hibridiza con uno o más fragmentos de la muestra de ADN digerida después es separada en un gel de electroforesis, revelando un único patrón específico característico de un locus o genotipo. Las pruebas con RFLP son frecuentemente usadas en mapeo de genoma y análisis de variación (genotipificación, pruebas forenses, test de paternidad, diagnóstico de enfermedades hereditarias, etc) (Cruz *y col.*, 2015; Quintero *y col.*, 2008).

2.2.8. PCR Anidada

En esta variante de PCR, el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR es altamente específica. En tipificación para VPH se amplifica primero con los oligonucleótidos MY09/11, lo obtenido en ese primer amplificado se usa como ADN blanco para reamplificar con los oligonucleótidos GP5/6. Las variantes PCR asimétrica, PCR anclada y PCR anidada sirven para aumentar la sensibilidad y especificidad de la reacción y se utilizan cuando partimos de cantidades muy bajas de ADN problema. Se han diseñado protocolos de consenso específicos para la detección de un amplio espectro de Virus de papiloma humano (VPH) cutáneos no genitales o asociados a epidermodisplasia verruciforme (Cruz *y col.*, 2015; Quintero *y col.*, 2008).

2.2.9. NMPCR (Nested Multiplex PCR)

Es una PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Emplea dos o más pares (hasta ocho) de oligonucleótidos en un único tubo de reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. Consiste en combinar en una única reacción todos los pares de oligonucleótidos (coctel de oligonucleótidos) de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes (Ver figura 1.2). La ventaja de esta PCR es que se obtiene la información de varios loci (p.e. L1, E5, E6, E7) en una sola reacción, utilizando menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos, pudiéndose obtener simultáneamente varios tipos de VPH en una muestra debido a que hay pacientes que tienen hasta 8 tipos virales de VPH (Sotlar *y col.*, 2004).

2.2.10. Comparación entre RFLP-MY09/11 y la NMPCR.

Tabla 2.3: Ventajas y desventajas entre RFLP-MY09/11 y la NMPCR. (Fuente: Este trabajo).

Técnica	Ventajas	Desventajas
RFLP-MY09/11	Diferencia entre los tipos virales 6 y 11	No detecta si el genoma viral está integrado
	Puede detectar y tipificar VPH exóticos	Amplifica sólo la región L1 y es preferente en amplificar el tipo viral más prevalente frente a otro en poca proporción en la muestra
	Detecta 100 tipos de VPH	Puede dar falsos negativos en muestras con lesiones como NIC
	Es una sola reacción, un par de oligonucleótidos	Requiere uso de ER para tipificar
NMPCR	Detecta 17 tipos de VPH simultáneamente en una muestra	No diferencia entre los tipos 6 y 11
	Requiere de una reacción general y otras específicas	Son múltiples reacciones
	Es buen método para detectar tipos virales que esten integrados y Amplifica la región E	No es recomendable si se está buscando nuevos VPH exóticos.
	No requiere ER para tipificar	Uso de coctel de oligonucleótidos

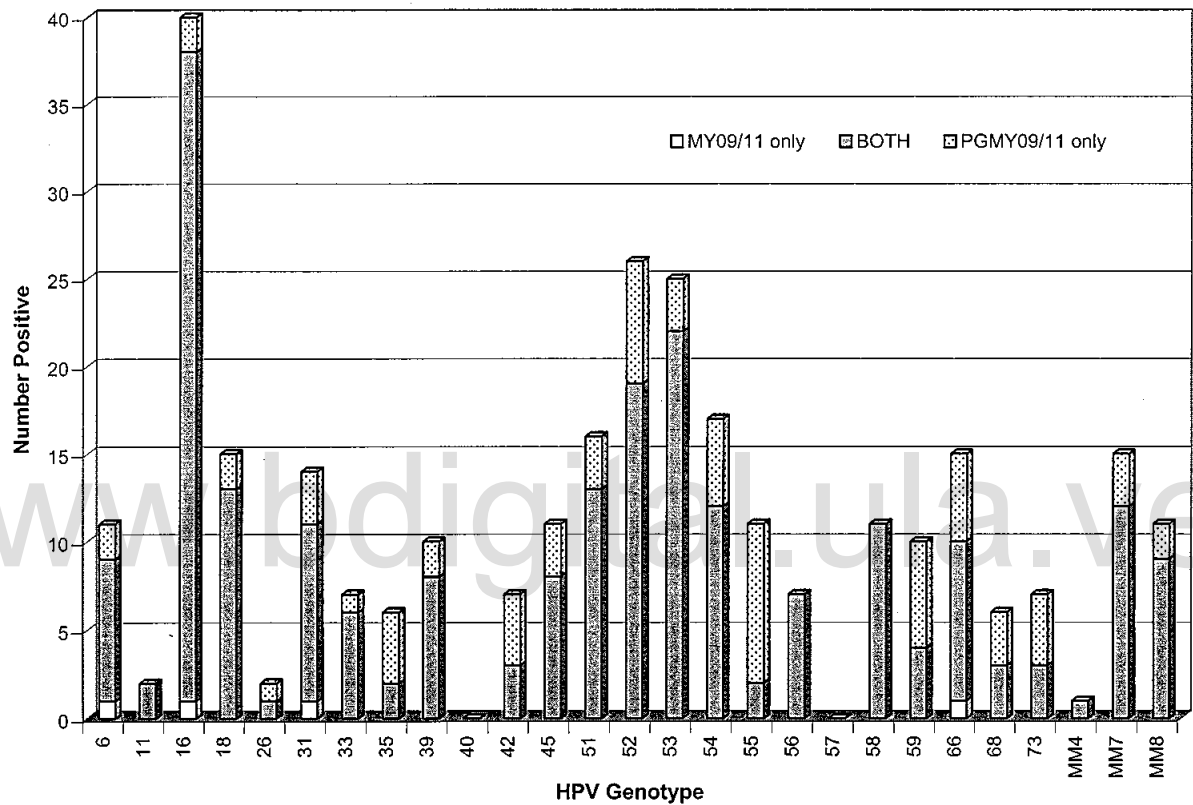


Figura 2.2: Resultados positivos para los tipos específicos de VPH con PGMY09/11 y MY09/11 (Gravitt y col., 2000)

2.3. Hipótesis

La NMPCR debería ser más sensible que la RFLP-MY09/11 para muestras con infección múltiple.

2.4. Objetivo General

Comparar dos sistemas de PCR MY09/11 con la NMPCR propuesto por Sotlar en el 2004 para detección y tipificación de múltiples tipos de VPH en las muestras clínicas.

2.5. Objetivos Específicos

- Detectar y tipificar de los tipos virales utilizando los oligonucleótidos MY09/11 mediante PCR-RFLP.
- Comparar distintos patrones de bandas en los tipos virales con los reportados.
- Detectar y tipificar los tipos virales mediante una NMPCR.
 - Mediante una PCR Nested Multiplex en conjunto con RFLP (Restriccion Fragments Long Polymorphism), observar los patrones de los tipos virales.
- Analizar estadísticamente la sensibilidad del NMPCR comparando con la RFLP-MY09/11 mediante la prueba Chi cuadrado (X^2) usando la herramienta SPSS.
- Observar los tipos virales mas prevalentes en las muestras clínicas.

2.6. Justificación del Proyecto y aplicabilidad de los resultados

En este trabajo se desea comparar los métodos PCR-RFLP y PCR Nested Multiplex, debido a que esto permitirá decidir si la implementación del mismo sistema Multiplex es más ventajoso que en el sistema RFLP con MY09/11; considerando que el sistema PCR Nested Multiplex tiene la ventaja de detección de infecciones múltiples de

VPH en una muestra clínica, que en el sistema PCR-RFLP por MY09/11 no detecta infecciones múltiples. Se podría pensar mencionando lo anterior que, que el sistema PCR Nested Multiplex es mejor ya que permite al médico decidir un mejor diagnóstico y tratamiento para el paciente. Debido a la naturaleza patológica del VPH, la evolución de la infección abarca de 10 a 20 años por lo que es esencial el seguimiento de los pacientes no solo para un mejor diagnóstico en su historia clínica; sino detectar lesiones malignas que puedan ser precursoras de un *cáncer in situ* a tiempo.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 3

Metodología

3.1. Selección de muestras Biológicas

Las muestras fueron seleccionadas de la colección que posee LABIOMEX, provenientes de pacientes que acuden a consultas públicas y privadas, quienes de manera voluntaria acuden para el análisis de detección y tipificación de VPH. LABIOMEX utiliza el protocolo de NMPCR descrito por Sotlar (Sotlar *y col.*, 2004), para detectar y tipificar varios tipos de VPH que previamente fueron aplicados a las 139 muestras clínicas seleccionadas. Cada muestra tiene sus minihistoria donde describe la clínica del paciente esto incluye el uso de anticonceptivos, colposcopia, biopsia y citología para posteriormente ser analizado como variables. Si el paciente presentaba alguna de las tres condiciones, se tomaba como clínica positiva para el análisis estadístico posterior. Para seleccionar las muestras se usaron los siguientes criterios:

- Se tomaron muestras clínicas del último año de haber sido procesadas, la más antigua data del 23/03/2015 (Ver tabla 4.1).
- Deben tener más de dos tipos de VPH para el sistema NMPCR, ya que este sistema puede detectar múltiples tipos de VPH en una muestra mientras que, la PCR por RFLP-MY09/11 detecta a los sumo 2 tipos de VPH; para así llevar a cabo la comparación entre estos métodos de detección y tipificación.

3.2. Calidad de ADN

Al momento del procesamiento de las muestras clínicas, se realiza una PCR Beta-Globina para conocer la calidad de ADN de las mismas para posteriormente detectar y tipificar por NMPCR. La sección anterior señala que las muestras seleccionadas ya fueron procesadas por LABIOMEX, tomando en cuenta la fecha en el que se realizó la PCR Beta-Globina, se describió como fecha de PCR Beta-Glob previo y al momento de realizar la PCR usando MY09/11 para una posterior RFLP con HpyCH4V, se realizó de nuevo la PCR Beta-Globina y se tomó este dato como fecha actual para establecer si hubo degradación del ADN.

La reacción de Beta-Globina (Saiki *y col.*, 1986), se utilizan los oligonucleótidos HMBB01 (5'-GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT-3'), PC04 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') y GH20 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') para una amplificación simultánea del producto de 248 pb del gen de Beta-Globina (Sotlar *y col.*, 2004). La reacción consta de:

- Buffer de reacción 1X 63 μ L.
- $MgCl_2$ 5 mM 19 μ L.
- 25 pmol de oligonucleótidos 10-12 μ L.
- 10 mmol de dNTP's 10 μ L.
- 5U Taq ADN polimerasa (producida por LABIOMEX) 9 μ L.
- 1- 1,5 μ L ADN muestra.
- 450 μ L de H_2O estéril c.s.p

Los ciclos de la PCR consta de 40 ciclos de 1 minuto para el paso de desnaturalización del ADN a 94 °C, 1 minuto para alineamiento a 55 °C, y 1 minuto para elongación a 72 °C. El último ciclo fué seguido por el paso final de extensión de 7 minutos a 72 °C.

3.3. Sistema PCR-MY09/11

Las muestras obtenidas para análisis se obtuvieron a partir de hisopados, raspados del canal endocervical y de la exocerviz, de la región vulvar por cepillados, dependiendo del lugar donde el médico especialista pudiera apreciar una lesión clínica o subclínica, se procesaron para extraer el ADN mediante Chelex al 5% (Maniatis *y col.*, 1982; Quintero *y col.*, 2008).

La reacción consiste en una amplificación de una región de aproximadamente 450 pb y posterior digestión por enzimas de restricción en las que se generarán patrones de migración. Consta de los siguientes reactivos:

- Buffer de reacción 1X 63 μ L.
- 5m M de $MgCl_2$ 19 μ L.
- 50 pmol de oligonucleótidos MY09/11 12 μ L.
- 160-200 μ M de dNTP's 10 μ L.
- 5U Taq platinum ADN polimerasa Invitrogen.
- 1,5-4 μ L ADN muestra
- 450 μ L de H₂O estéril c.s.p

La programación de PCR consta de 35 ciclos que contienen 3 ciclos, que difieren en temperatura para amplificar sobre la cadena molde de ADN:

- **Ciclo I:** Desnaturalización del ADN molde a 94 °C por 3 minutos.
- **Ciclo II:** Alineamiento de los oligonucleótidos con sus secuencias consenso a 55°C por 1 minuto.
- **Ciclo III:** Replicación del ADN blanco a 72 °C por 1 minuto.

Una vez culminado cada ciclo, se reiniciará nuevamente (35 ciclos) hasta lograr el número de amplificado para el análisis (Bernard *y col.*, 1994).

3.4. Digestión con la enzima de restricción

HpyCH4V

Del amplificado se tomaron 8 μL de ADN y se añadieron 1 μL de Buffer 4 para un 100 % de actividad y 1 μL de la enzima de restricción *HpyCH4V*, con el programa del termociclador 120 minutos a 37 °C y 20 minutos a 64 °C para la inactivación de la enzima. Se observaron los patrones en geles de agarosa al 2 %. El Buffer para la enzima *HpyCH4V* consta de: 50 mM Acetato de Potasio 20 mM Tris-acetato 10 mM Acetato de Magnesio 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA (Albúmina de Suero Bovino) a pH 7.9

La enzima realiza un corte romo en la posición 5'...TG'CA...3' y 3'...AC'GT...5' (BioLabs, 2016)

Para efectos de verificar el número de cortes hechos por la enzima de restricción, se hizo una digestión virtual como muestra la tabla 3.1, para posteriormente al realizar la electroforesis en geles de agarosa al 2 %, se tipificara con los patrones de digestión propuestos por Cruz (Ver figura 3.1) (Cruz *y col.*, 2015).

www.bdigital.ula.ve

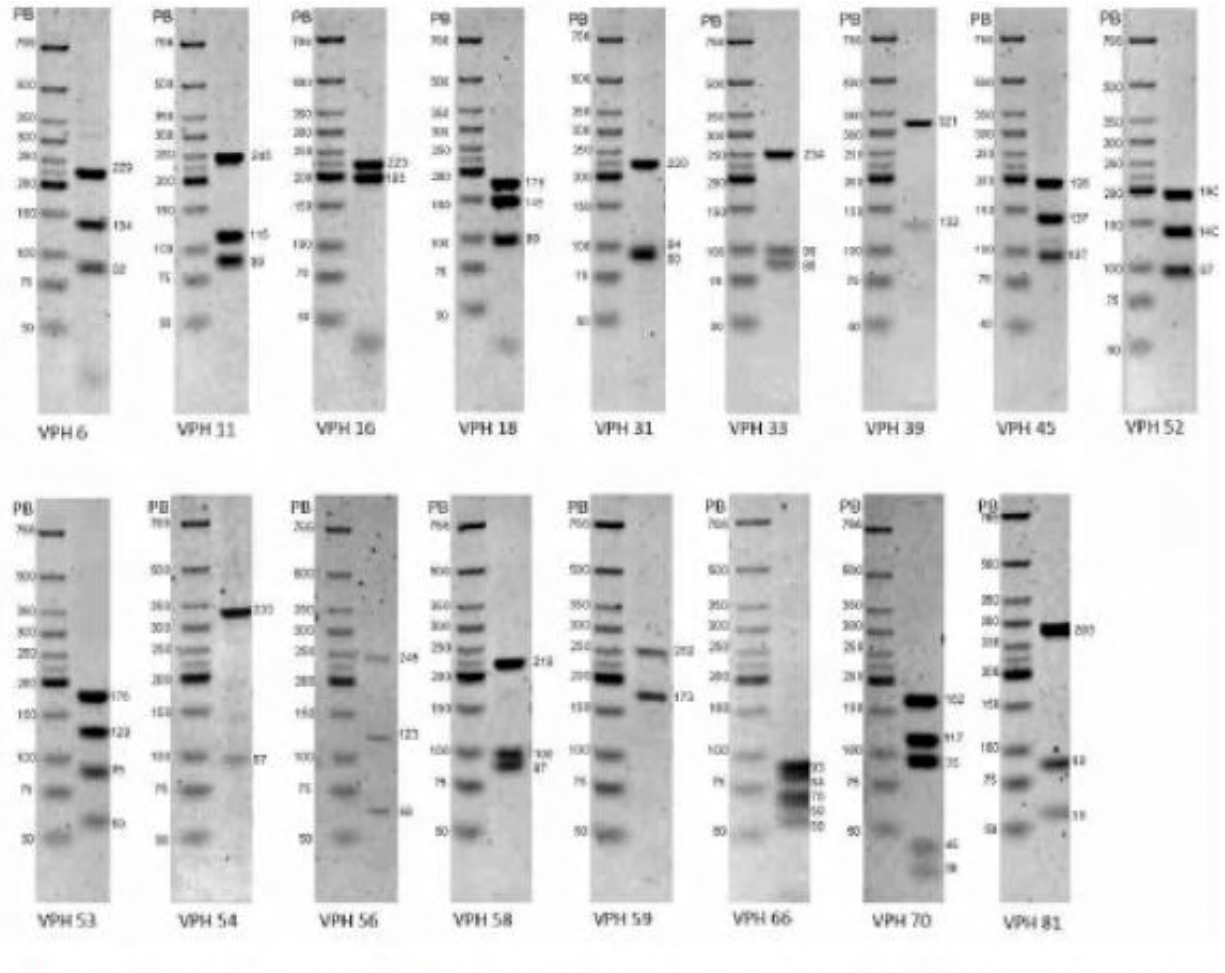


Figura 3.1: Patrones de digestión con la enzima de restricción *HpyCH4V* de New England BioLab de 17 tipos de VPH (Cruz y col., 2015).

Tabla 3.1: Cortes con la enzima de restricción *HpyCH4V* de L1 para los distintos tipos virales obtenidos de la base de datos del NCBI para una digestión virtual usando *NEBCutter* (Cruz y col., 2015).

Nº ACCESO	TIPO DE VPH	Nº FRAGMENTOS	LONGITUD (pb)
S73503.1	6	3	229,134,92
M14119	11	3	245,115,99
S71514.1	16	2	225,195
X05015	18	3	175, 145, 99
J04353	31	3	220, 94, 90
M12732	33	3	254,98,84
M62849	39	2	196,137,127
DQ080002.1	45	3	190,140,97
X74481	52	3	190,140,97
X74482	53	4	176,129,75,50
U37488	54	2	333,97
X74483	56	3	245,127,59
AY101598	58	3	216,108,97
X77858	59	2	252,172
U31794	66	5	93,84,72,59,58
U21941	70	5	162,117,75,45,36
GQ288793	81	3	263,92,56

3.5. NMPCR (Sotlar)

Para un volumen final de 50 μL la mix de reacción contiene 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 200 μM concentración de cada dNTP's, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 U de ADN polimerasa termoestable (Invitrogen), y 15 pmol de cada oligonucleótido. La Nested Multiplex (NMPCR) fué diseñada bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, y 72°C por 45 s. El primer ciclo fué precedido por el paso de

desnaturalización a 4 minutos y el último ciclo fué seguido por 4 minutos en el paso de elongación (Sotlar *y col.*, 2004).

En esta técnica se usa una dilución de oligonucleótidos 1/40 (25 pmol), para una reacción previa con PCR para Beta Globina, corroborando siempre la calidad de ADN en las muestras a tratar; seguido de una reacción general:

- 5 μ L de Mix y 1,5 μ L de ADN,
- Para las específicas (cocteles I, II, III, IV) se diluyen a partir de la general con 12,5 μ L de agua megapura, usando 5 μ L para cada eppendorf y 1,02 μ L de ADN diluido (Fuente: LABIOMEX).
- Oligonucleótidos GP-E6-3F 5'-GGG WGK KAC TGA AAT CGG T-3'
- Oligonucleótidos GP-E6-5B 5'-CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA-3'
- Oligonucleótidos GP-E6-6B 5'-TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC-3'

En la tabla 3.2 se muestra el coctel de los oligonucleótidos utilizados en la NMPCR en las reacciones específicas para detección y tipificación de VPH (Sotlar *y col.*, 2004).

Tabla 3.2: Cocteles de oligonucleótidos usados en el sistema Nested Multiplex PCR
(Sotlar y col., 2004)

Coctel de oligonucleótidos	Genotipo VPH	Amplicon (bp)	Secuencia (5'-3')	Posición (bp)
I	16	457	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	141-161
			CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	597-573
	18	322	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	170-190
			GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	491-470
	31	263	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	137-158
			CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	399-378
	59	215	CAA AGG GGA ACT GCA AGA AAG	159-179
			TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	373-354
	45	151	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG	82-101
			ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	232-213
II	33	398	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	172-192
			GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	569-549
	6/11	334	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	201-220
			TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	534-515
	58	274	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC	297-317
			GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	570-550
	52	229	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG	178-197
			CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	406-383
	56	181	GTG TGC AGA GTA TGT TTA TTG	294-314
			TTT CTG TCA CAA TGC AAT TGC	475-455
III	35	358	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C	157-178
			CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	514-493
	42	277	CCC AAA GTA GTG GTC CCA GTT A	85-106
			43	219
	44	163	CAT GAA ACT GTA GAC AGG CCA AG	320-298
			TAA ACA GTT ATA TGT AGT GTA CCG	248-271
	44	163	TAT CAG CAC GTC CAG AAT TGA C	410-389
IV	68	333	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG	4049-4068
			GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	4381-4362
	39	280	GAC GAC CAC TAC AGC AAA CC	213-232
			TTA TGA AAT CTT CGT TTG CT	492-473
	51	223	GAG TAT AGA CGT TAT AGC AGG	319-339
			TTT CGT TAC GTT GTC GTG TAC G	541-520
	66	172	TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT	353-372
			AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	520-501

3.6. Métodos Estadísticos

Para este estudio se analizaron 139 muestras clínicas a las que se les aplicó los estadísticos χ^2 , κ , correlación de ρ y R de Pearson mediante el programa SPSS v.21. Las variables a comparar fueron PCR-RFLP vs NMPCR para conocer la diferencia significativa entre estos dos métodos, infección múltiple y simple vs clínica del paciente, frecuencias según sexo, clases de edad de los pacientes de acuerdo al tipo de infección que presentara.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 4

Resultados

4.1. Calidad del ADN

Para comprobar la calidad del ADN se aplicó el sistema PCR para Beta Globina (Saiki *y col.*, 1986), como se describe en la metodología para determinar si los ADN de las muestras seleccionadas aún preservaban su calidad, y si no habían sufrido degradación del material genético purificado debido al tiempo variable desde que fueron extraídos como se muestra en la tabla 4.1, las muestras corresponden a fechas recientes para mayor certeza que el ADN está conservado al momento de amplificar. De acuerdo a estos datos, se exploró el porcentaje de positividad para conocer la correspondencia entre la positividad previa y actual de Beta Globina de las 139 muestras correspondientes (Ver figura 4.1).

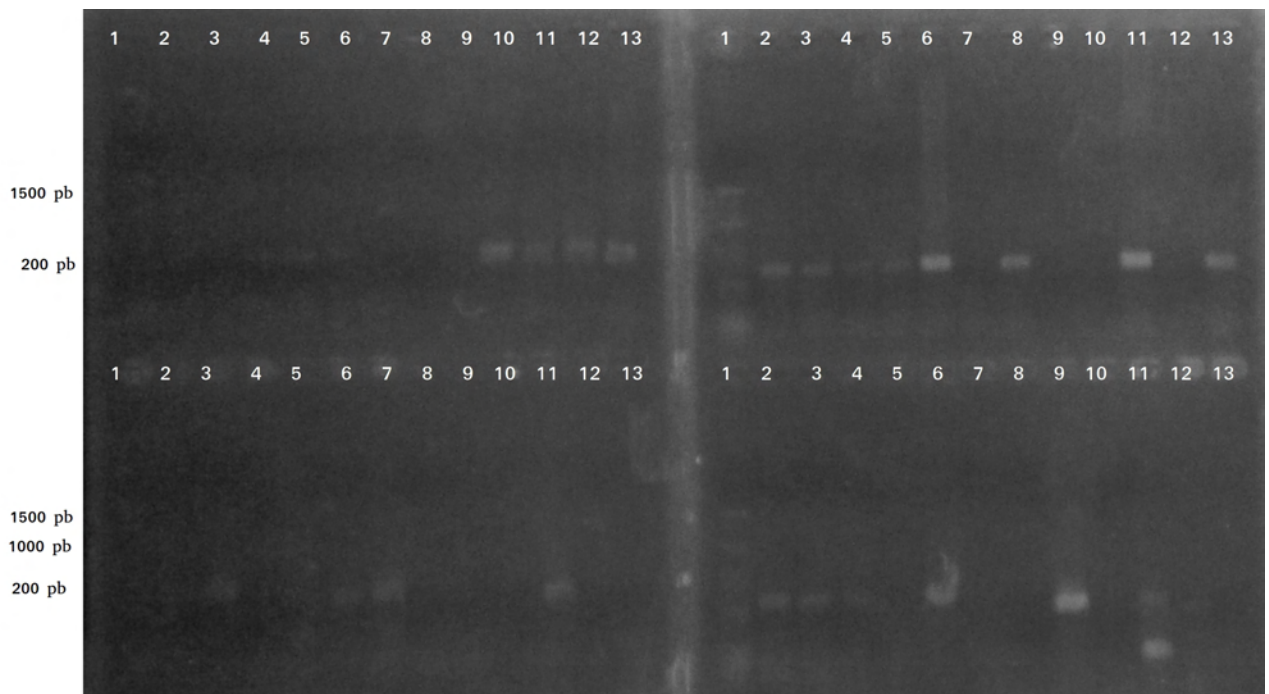


Figura 4.1: Electroforesis para una PCR β -Globina para 42 muestras (Pozo 1 escalera LWM, Pozos 2 al 13 muestras clínicas) para determinar calidad de ADN.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4.1: Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).

Fuente: LABIOMEX.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
12067-4	POS	NEG	POS	18/04/2016
12129	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	18/04/2016
12134	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	18/04/2016
12119	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	18/04/2016
080416-6	POS	POS	POS	8/4/2016
050416-5	POS	POS	POS	5/4/2016
050416-4	POS	POS	POS	5/4/2016
050416-3	POS	POS	POS	5/4/2016
050416-1	POS	POS	POS	5/4/2016
12114	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	12/04/2016
12106	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	12/04/2016
12095	POS	NEG	POS	12/04/2016
280316-10	POS	NEG	POS	28/03/2016
280316-5	POS	POS	POS	28/03/2016
12105	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	12/04/2016
12091	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	11/04/2016
12088	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	11/04/2016

Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).
Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
12085-4	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	04/04/2016
12065	NEG	NEG	POS	04/04/2016
12061	POS	NEG	POS	23/03/2015
12036-3	NEG	NEG	POS	23/03/2015
12044	POS	NEG	POS	23/03/2015
12053	POS	POS	POS	23/03/2015
12028	NEG	NEG	POS	23/03/2015
06-1839	NEG	NEG	POS	23/03/2015
06-1840	POS	POS	POS	23/03/2015
12021	POS	NEG	POS	23/03/2015
12017	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	23/03/2015
12016	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	23/03/2015
12012	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
12009	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
12008	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
12003	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
090316-7	NEG	NEG	POS	09/03/2016
090316-5	POS	NEG	POS	09/03/2016
090316-4	POS	NEG	POS	09/03/2016

Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).
Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
070316-7	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	07/03/2016
070316-6	NEG	NEG	POS	07/03/2016
070316-2	POS	NEG	POS	07/03/2016
11989	POS	NEG	POS	16/03/2016
11985	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
11970-9	POS	POS	POS	16/03/2016
11970-6	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
0-61838	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
11964	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
11969	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	16/03/2016
11774	POS	POS	POS	22/02/2016
11972	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	22/02/2016
11890	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	15/02/2016
290116-4	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	29/01/2016
290116-3	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	29/01/2016
260116-2	NEG	NEG	POS	29/01/2016

Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).
Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
11884	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	10/02/2016
11882-2	NEG	NEG	POS	10/02/2016
11881-1	POS	POS	POS	10/02/2016
11877-2	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	10/02/2016
11871-1	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	05/02/2016
11863	POS	POS	POS	05/02/2016
11861	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	05/02/2016
11860	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	24/02/2016
11959	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	28/02/2016
11946	POS	NEG	POS	29/06/2016
11085	NEG	NEG	POS	09/05/2016
11766	POS	POS	POS	09/05/2016
10600	NEG	NEG	POS	09/05/2016
10832	NEG	NEG	POS	06/05/2016
10829-2	POS	POS	POS	24/04/2016
290416-2	NEG	NEG	POS	24/04/2016
12213	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	24/04/2016

Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).
Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
12215	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	24/04/2016
12233	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	04/04/2016
060516-3	POS	POS	POS	12/04/2016
12151	POS	POS	POS	24/04/2016
12153	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	24/04/2016
12154	POS	POS	POS	24/04/2016
12155	POS	POS	POS	20/04/2016
12067-3	NEG	NEG	POS	21/04/2016
12094	NEG	NEG	POS	24/04/2016
12144	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	24/04/2016
12142	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	02/05/2016
12150-2	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	02/05/2016
200416-1	POS	POS	POS	02/05/2016
210416-2	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	02/05/2016
210416-3	POS	POS	POS	02/05/2016
12164	NEG	NEG	POS	21/04/2016
12166	POS	POS	POS	21/04/2016

Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).
Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
12167-2	POS	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	02/05/2016
12174	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	02/05/2016
12176-1	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	02/05/2016
12178	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	02/05/2016
12184	NEG	NEG	POS	02/05/2016
210416-7	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	21/04/2016
210416-6	POS	POS	POS	21/04/2016
12124	NEG	NEG	POS	18/04/2016
12186-1	NEG	NEG	POS	02/05/2016
12227	POS	POS	POS	09/05/2016
12229-2	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	09/05/2016
12217-5	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	09/05/2016
11972	NEG	NEG	INFECCIÓN MÚLTIPLE	24/02/2016
11971	POS	POS	POS	24/02/2016
290416-2	NEG	NEG	POS	29/04/2016
12296-2	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	28/05/2016

Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).
Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
12293	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	30/05/2016
12292	POS	POS	POS	30/05/2016
12313	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	01/06/2016
12283	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	30/05/2016
12288	POS	POS	POS	30/05/2016
12322	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	09/05/2016
12246	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	09/05/2016
12317-2	POS	POS	POS	07/06/2016
12338	POS	POS	POS	07/06/2016
12451-1	POS	POS	POS	07/07/2016
12451-4	POS	POS	POS	07/07/2016
12434	POS	POS	POS	07/07/2016
12439	POS	POS	POS	07/07/2016
12358-2	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	10/06/2016
12358-1	POS	POS	POS	10/06/2016
12360	POS	POS	INFECCIÓN MÚLTIPLE	10/06/2016
12354	POS	POS	POS	10/06/2016

Base de datos de las muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de Beta-Globina previos y actuales para calidad de ADN y resultados de la NMPCR (Sotlar).
Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	B-GLOB PREVIO	B-GLOB ACTUAL (05/10/2016)	RESULTADO NMPCR	FECHA DE LA PCR B-GLOB (DD/MM/AAAA)
12398	POS	POS	NEG	21/06/16
12629	POS	POS	NEG	28/08/16
12565	POS	POS	NEG	14/08/16
12581-4	POS	POS	NEG	14/08/16
12564	POS	POS	NEG	19/08/16
12558	POS	POS	NEG	20/08/16
12585	POS	POS	NEG	14/08/16
12582	POS	POS	NEG	15/08/16
12594	POS	POS	NEG	16/08/16
12581-2	POS	POS	NEG	17/08/16
12548	POS	POS	NEG	18/08/16
12654	POS	POS	NEG	10/09/16
12547-1	POS	POS	NEG	14/08/16
12547-2	POS	POS	NEG	15/08/16
12551B	POS	POS	NEG	16/08/16
12552	POS	POS	NEG	17/08/16
12576	POS	POS	NEG	18/08/16
12570-1	POS	POS	NEG	19/08/16
12590	POS	POS	NEG	20/08/16
12566	POS	POS	NEG	21/08/16

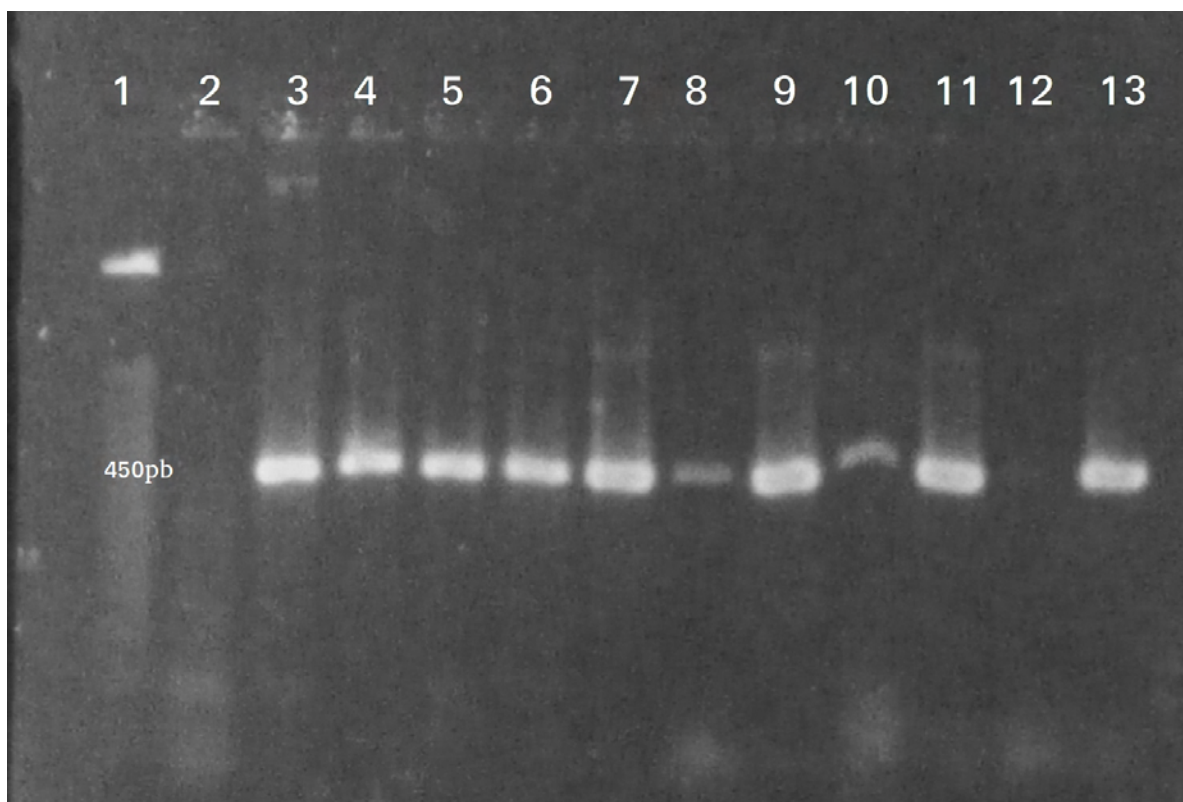


Figura 4.2: Amplificados con MY09/11. Primer pozo escalera λ y 12 muestras clínicas. Pozos 2 y 12 fueron negativas para MY, mientras pozos 3 a 11 y pozo 13 fueron positivas para PCR-MY.

4.2. Sistema PCR-MY09/11

En las figuras 4.2 y 4.3 se muestran los geles de agarosa 1.8% para la reacción MY09/11, resultados obtenidos de la PCR-MY09/11 como se describió en la metodología.

4.3. RFLP

En las figuras 4.4 y 4.5 muestran las digestiones de los amplificadores MY09/11 mediante la enzima de restricción HpyCH4V en electroforesis en geles de agarosa al 2%. Así mismo, en la tabla 4.2 muestra los resultados obtenidos en este estudio.

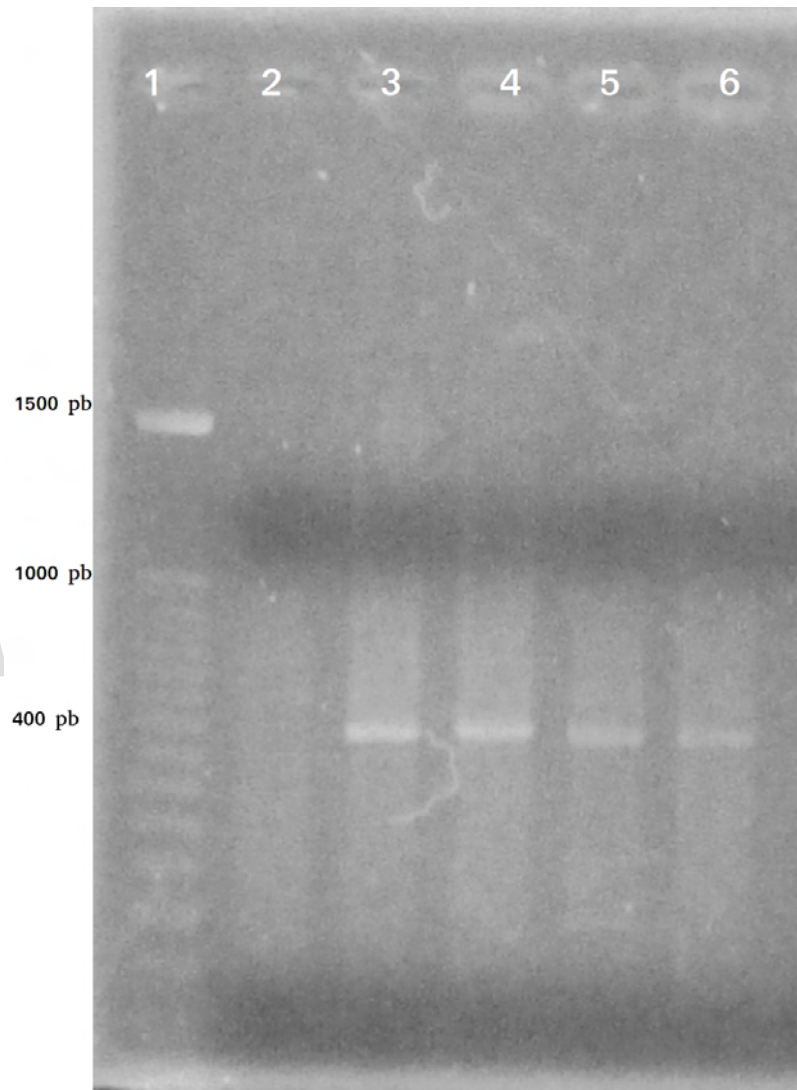


Figura 4.3: Amplificados con los oligonucleótidos degenerados MY09/11. Primer pozo escalera LMW y 5 muestras clínicas positivas para PCR-MY.

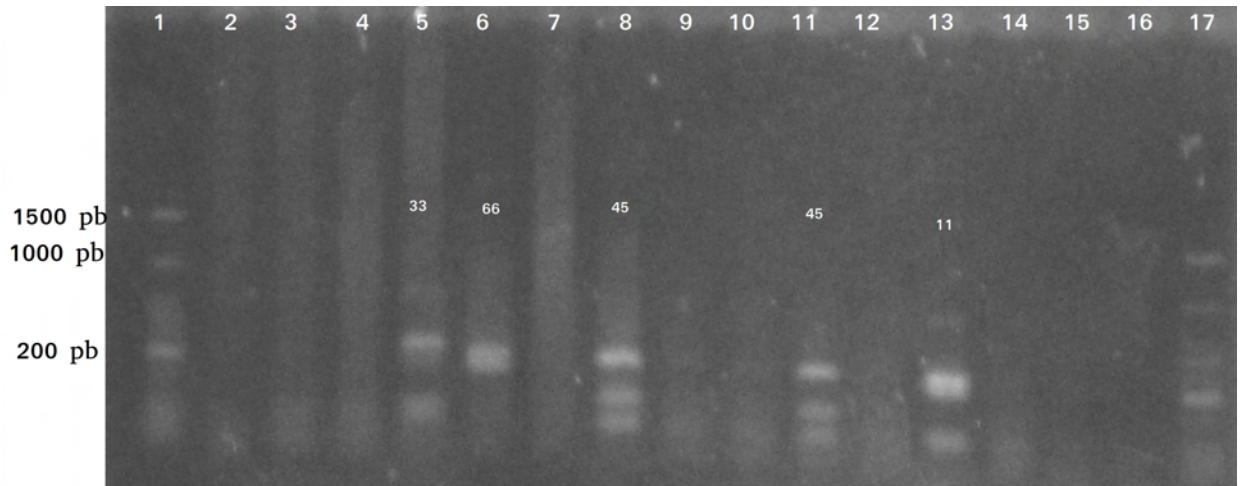


Figura 4.4: Electroforesis en gel de Agarosa al 2% para digestión con HpyCH4V de 15 muestras clínicas. Pozo 1 y 17 escalera de bajo peso molecular. Los tipos de VPH detectados en este caso fueron los tipos 33, 45, 66 y 11.

www.bdigital.ula.ve

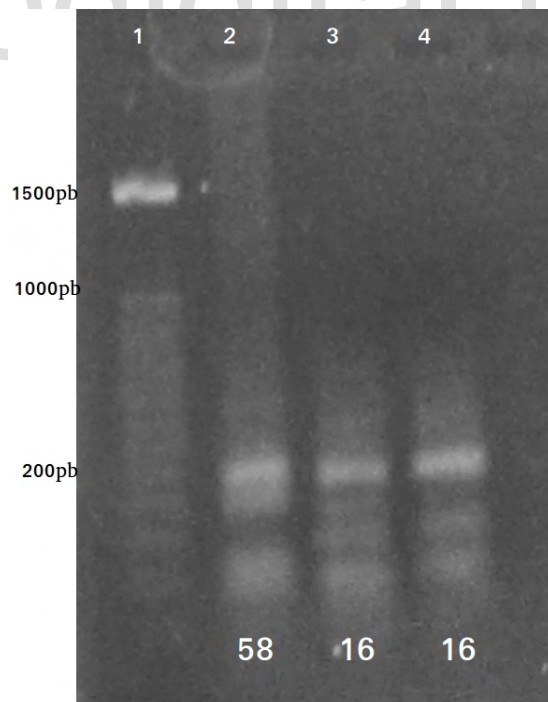


Figura 4.5: Electroforesis en gel de agarosa al 2% para digestión con HpyCH4V de 3 muestras clínicas.

Tabla 4.2: Muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de PCR-MY09/11.

Nº MUESTRA	MY09/11	TIPO DE VPH
12067-4	NEG	NEG
12129	NEG	NEG
12144	NEG	NEG
12119	NEG	NEG
080416-6	POS	58
050416-5	NEG	NEG
050416-4	NEG	NEG
050416-3	POS	16
050416-1	POS	16
12114	NEG	NEG
12106	NEG	NEG
12095	NEG	NEG
280316-10	NEG	NEG
280316-5	NEG	NEG
12105	NEG	NEG
12091	NEG	NEG
12088	NEG	NEG
12085-4	nd	nd
12065	NEG	NEG
12061	NEG	NEG
12036-3	NEG	NEG
12044	NEG	NEG
12053	POS	56
12028	nd	nd
06-1839	NEG	NEG
06-1840	nd	nd
12021	nd	nd
12017	nd	nd

Muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de PCR-MY09/11. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	MY09/11	TIPO DE VPH
12016	nd	nd
12012	nd	nd
12009	NEG	NEG
12008	nd	nd
12003	NEG	NEG
090316-7	NEG	NEG
090316-5	nd	nd
090316-4	NEG	NEG
070316-7	NEG	NEG
070316-6	NEG	NEG
070316-2	NEG	NEG
11989	NEG	NEG
11985	NEG	NEG
11970-9	POS	31
11970-6	nd	nd
0-61838	nd	nd
11964	POS	35
11969	POS	33
11774	POS	11
11972	NEG	NEG
11890	NEG	NEG
290116-4	NEG	NEG
290116-2	NEG	NEG
260116-1	NEG	NEG
11884	POS	52
11882-2	nd	nd
11881-1	nd	nd
11877-2	POS	33

Muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de PCR-MY09/11. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	MY09/11	TIPO DE VPH
11871-1	nd	nd
11863	NEG	NEG
11861	NEG	NEG
11860	NEG	NEG
11959	NEG	NEG
11946	NEG	NEG
11085	NEG	NEG
11766	NEG	NEG
10600	NEG	NEG
10832	NEG	NEG
10829-2	NEG	NEG
290416-2	NEG	NEG
12213	NEG	NEG
12215	NEG	NEG
12233	nd	nd
060516-3	nd	nd
12151	NEG	NEG
12153	NEG	NEG
12154	NEG	NEG
12155	NEG	NEG
12067-3	NEG	NEG
12094	NEG	NEG
12144	NEG	NEG
12142	NEG	NEG
12150-2	NEG	NEG
200416-1	NEG	NEG
210416-2	NEG	NEG
210416-3	NEG	NEG

Muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de PCR-MY09/11. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	MY09/11	TIPO DE VPH
12227	NEG	NEG
12229-2	NEG	NEG
12217-5	NEG	NEG
11972	NEG	NEG
11971	nd	nd
290416-2	NEG	NEG
12296-2	POS	33
12293	POS	66
12164	NEG	NEG
12166	NEG	NEG
12167-2	NEG	NEG
12174	NEG	NEG
12176-1	NEG	NEG
12178	nd	nd
12184	nd	nd
210416-7	NEG	NEG
210416-6	NEG	NEG
12124	NEG	NEG
12186-1	NEG	NEG
12292	NEG	NEG
12313	NEG	NEG
12283	NEG	NEG
12288	NEG	NEG
12322	66	66
12246	45	45
12317-2	6	6
12338	11	11
12451-1	45	45

Muestras seleccionadas en este estudio con los resultados de PCR-MY09/11. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	MY09/11	TIPO DE VPH
12451-4	6	6
12434	11	11
12439	52	52
12358-2	6	6
12358-1	NEG	NEG
12360	NEG	NEG
12354	nd	nd
12398	NEG	NEG
12629	NEG	NEG
12565	NEG	NEG
12581-4	NEG	NEG
12564	NEG	NEG
12558	NEG	NEG
12585	NEG	NEG
12582	NEG	NEG
12594	NEG	NEG
12581-2	NEG	NEG
12548	NEG	NEG
12654	NEG	NEG
12547-1	NEG	NEG
12547-2	NEG	NEG
12551B	NEG	NEG
12552	NEG	NEG
12576	NEG	NEG
12570-1	NEG	NEG
12590	NEG	NEG
12556	NEG	NEG

4.4. Sistema NMPCR (Sotlar)

En la tabla 4.3 muestra los resultados de la tipificación de VPH mediante el sistema NMPCR (Sotlar) en cuatro cocteles de oligonucleótidos, donde el coctel I detecta los tipos virales 16/18/31/59/45; coctel II detecta los tipos virales 33/6,11/58/52/56; el coctel III detecta los tipos virales 35/42/43/44; el coctel IV detecta los tipos virales 68/39/51/66. Se siguió la metodología descrita para la amplificación de NMPCR para una reacción general y a partir de esta, reacciones específicas.

En las figuras 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9 muestran electroforesis en gel de acrilamida para los cocteles I, II, III y IV ; cada coctel detectan un grupo de VPH de acuerdo a su tamaño como propone Sotlar (Sotlar *y col.*, 2004).

www.bdigital.ula.ve

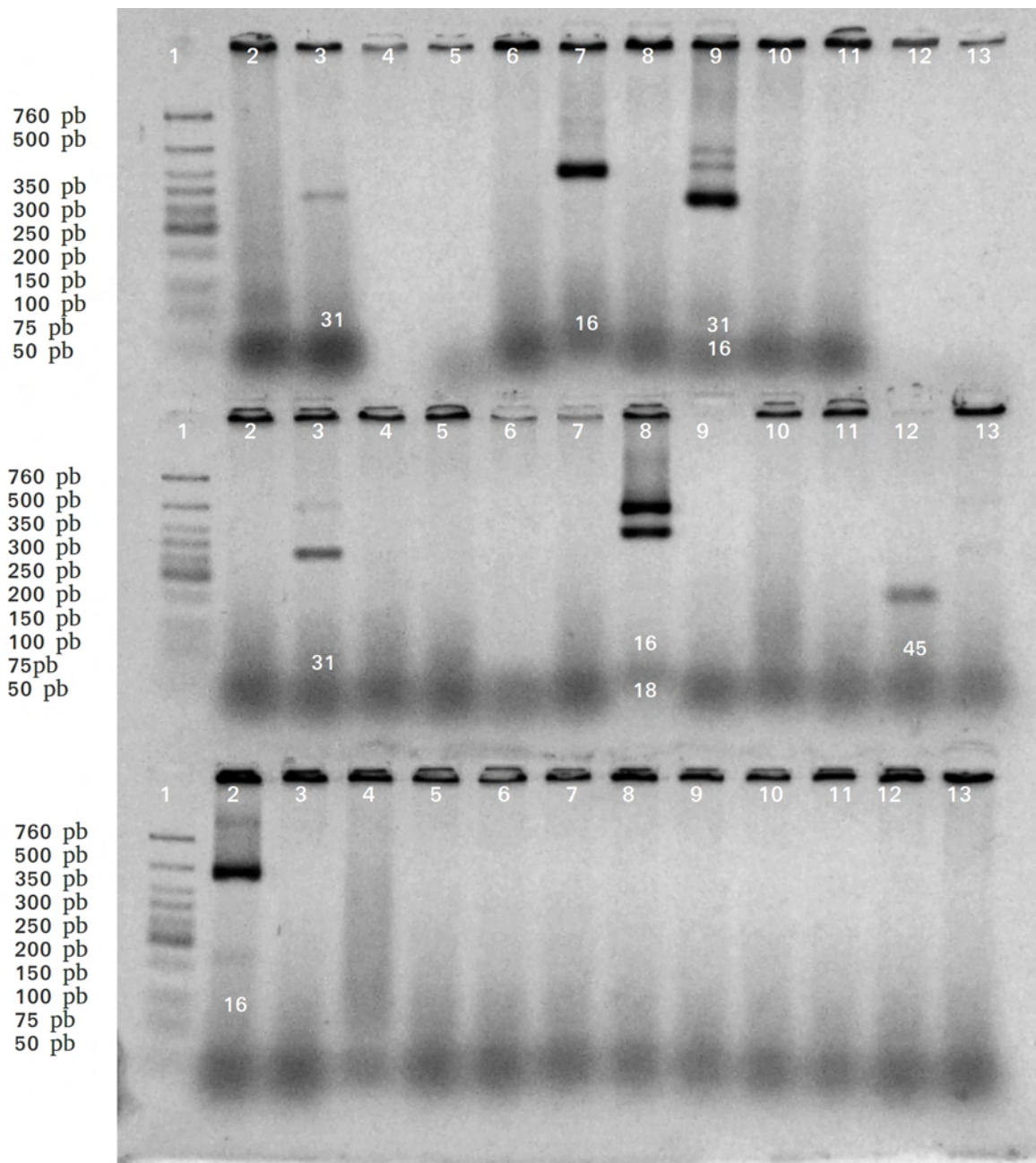


Figura 4.6: Electroforesis en gel de acrilamida para coctel I por NMPCR (Sotlar).

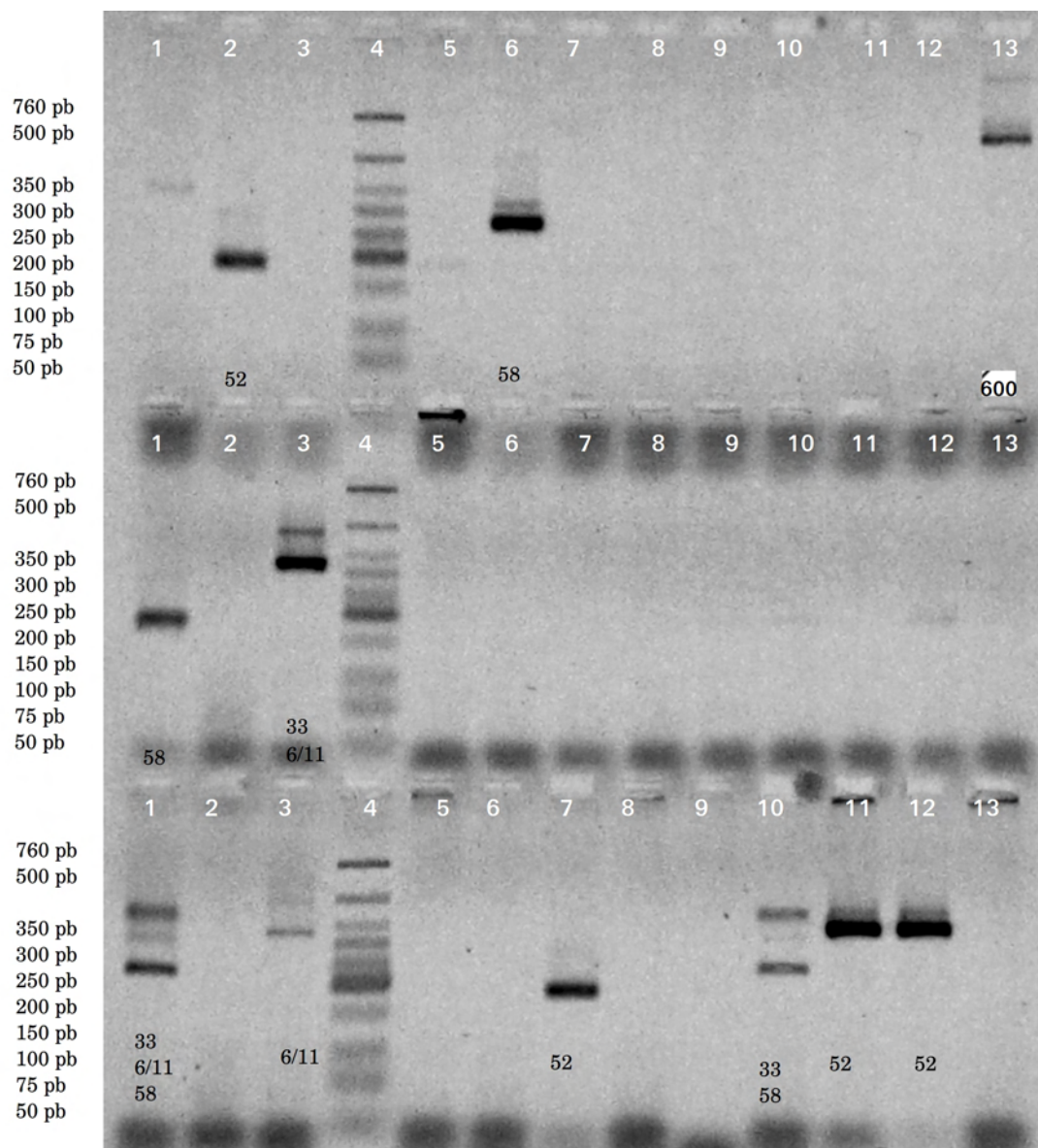


Figura 4.7: Electroforesis en gel de acrilamida para coctel II por NMPCR (Sotlar).

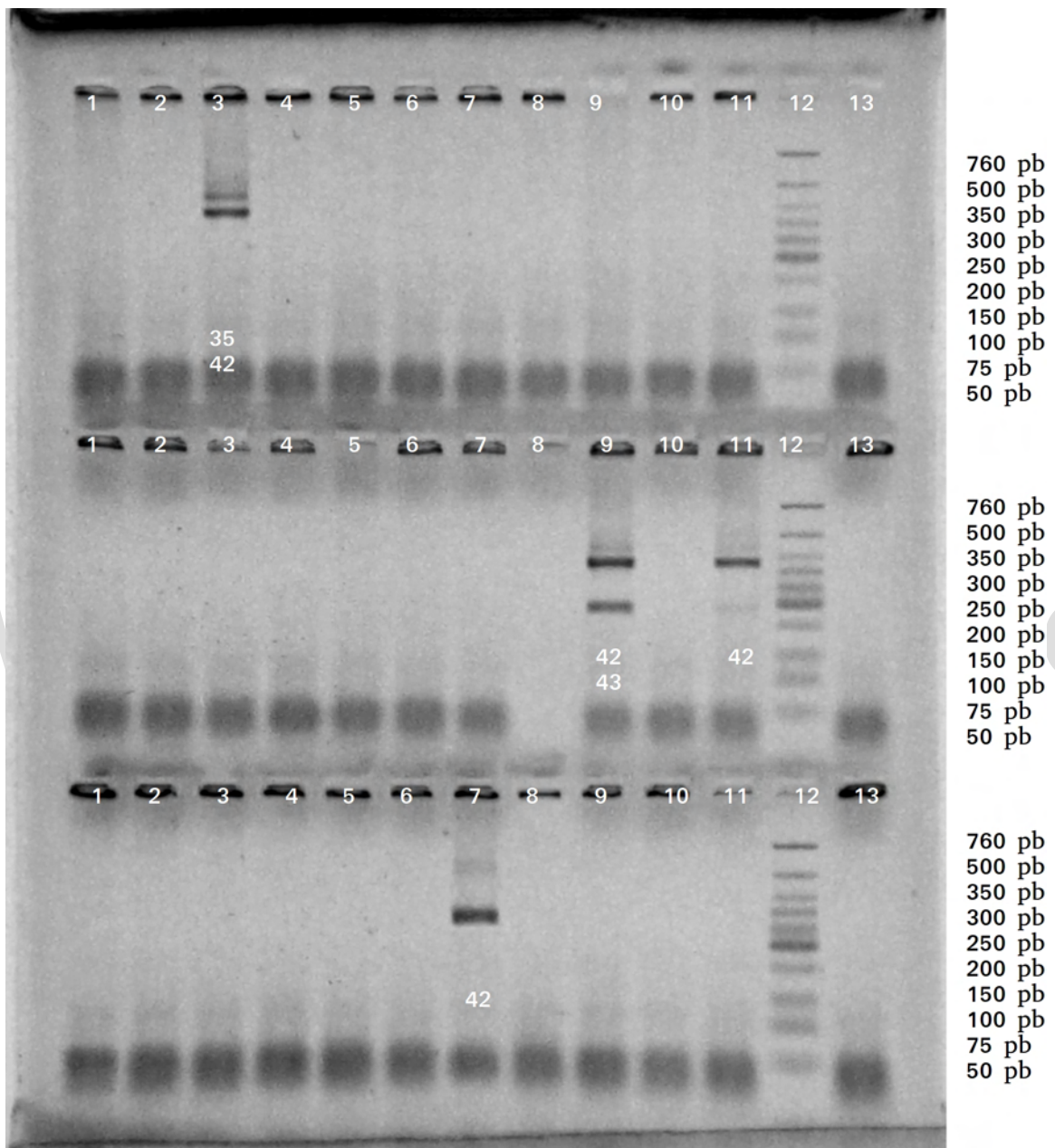


Figura 4.8: Electroforesis en gel de acrilamida para coctel III por NMPCR (Sotlar).

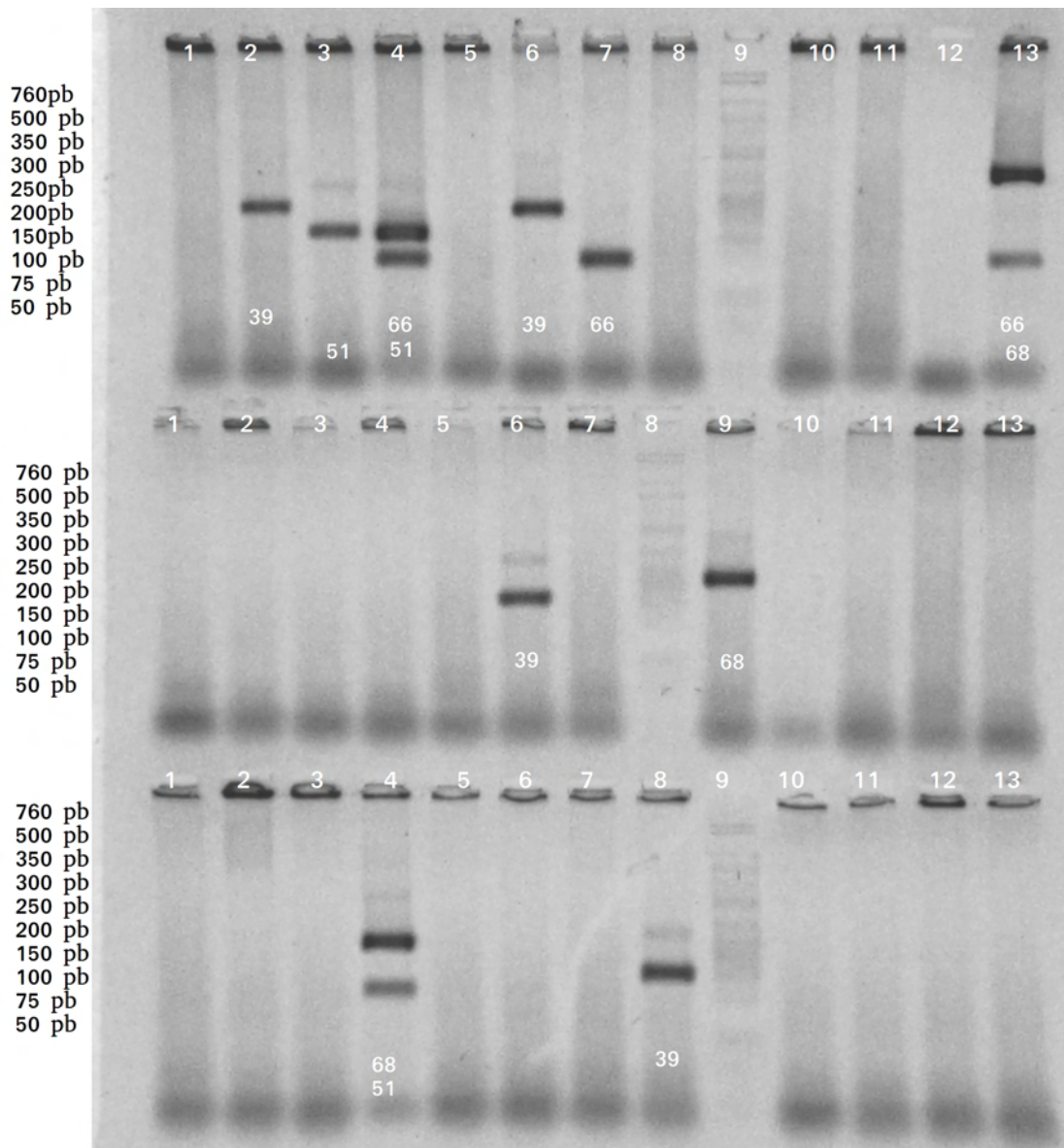


Figura 4.9: Electroforesis en gel de acrilamida para coctel IV por NMPCR (Sotlar).

Tabla 4.3: Resultados de la NMPCR (Sotlar) para las muestras seleccionadas. Fuente: LABIOMEX.

Nº MUESTRA	Coctel I	Coctel II	Coctel III	Coctel IV	Tipos de VPH
12067-4	18	NEG	NEG	66	18,66
12129	45	6,11	35	68	45,6,11,35,68
12134	NEG	33, 58, 52	43	NEG	33, 58, 56,11
12119	18	NEG	NEG	51,68	18,51,68
080416-6	NEG	58	43	NEG	58,43
050416-5	NEG	52,58	NEG	NEG	52,58
050416-4	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
050416-3	16	NEG	43	NEG	16,43
050416-1	16	33,52	43	NEG	16,43
12114	NEG	33,52	43	NEG	33,52,43
12106	NEG	6,11, 58	42,35	66,68	6,11, 58,42,35, 66,68,43
12095	NEG	NEG	43	51,68	51,68
280316-10	NEG	NEG	35,43	NEG	35,43
280316-5	NEG	NEG	42,43	NEG	42,43
12105	NEG	6,11, 33, 52	42	NEG	6, 11, 33, 52,42
12091	NEG	6,11, 33	42	NEG	6, 11, 33,42
12088	NEG	NEG	35, 42, 43	NEG	35, 42, 43
12085-4	NEG	NEG	43	39, 68	43,39,68
12065	NEG	NEG	35,42	NEG	35,42
12061	45	NEG	44	NEG	45,44
12036-3	31	NEG	35	NEG	31,35

Resultados de la NMPCR (Sotlar) para las muestras seleccionadas. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	Coctel I	Coctel II	Coctel III	Coctel IV	Tipos de VPH
12044	18	NEG	35	NEG	18,35
12053	45	56	NEG	NEG	45,56
12028	16N	NEG	NEG	68	16,68
06-1839	NEG	58	43	NEG	58,43
06-1840	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
12021	18	52	NEG	NEG	18,52
12017	NEG	56	44	68	56,44,68
12016	NEG	6,11	44	NEG	6,11,44
12012	16	NEG	35	51	16,35,51
12009	NEG	NEG	42,43	39,51	42,43,39,51
12008	NEG	NEG	42,43	39,51	42,43,39,51
12003	16	6, 11, 33	43,35	51,39	16,6, 11, 33,43,35,51,39
090316-7	6,11	NEG	NEG	NEG	6,11
090316-5	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
090316-4	NEG	NEG	NEG	51,39	51,39
070316-7	NEG	52	NEG	66,51	66,51,52
070316-6	31	52	NEG	NEG	31,52
070316-2	NEG	NEG	42,43	NEG	42,43
11989	45	NEG	35	NEG	45,35
11985	45	6,11	NEG	NEG	45,6,11
11970-9	31	NEG	35	NEG	31,35
11970-6	NEG	6, 11, 33	NEG	NEG	6, 11, 33
0-61838	45	33	43	NEG	45,33,43
11964	18	NEG	35,44	NEG	18,35,44
11969	NEG	33	35	39,51	33,35,39,51
11774	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
11972	NEG	NEG	42,35	66	42,35,66

Resultados de la NMPCR (Sotlar) para las muestras seleccionadas. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	Coctel I	Coctel II	Coctel III	Coctel IV	Tipos de VPH
11890	NEG	33, 58, 56	NEG	NEG	33, 58, 56
290116-4	NEG	6,11	43,35	51	6,11,43,35,51
290116-3	16	NEG	NEG	39,66	16,39,66
260116-2	NEG	6, 11D	NEG	NEG	6, 11D
11884	45	52	44	51	45,44,52,51
11882-2	NEG	33D	NEG	66	66,33D
11881-1	NEG	33	NEG	51	33,51
11877-2	NEG	33	43,35	NEG	33,43,35
11871-1	NEG	6, 11, 33	NEG	NEG	6, 11, 33
11863	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
11861	16,45	NEG	NEG	51,68	16,45,51,68
11860	NEG	6, 11D	43	51	6, 11D,43,51
11959	16N	NEG	NEG	39,68	16N,39,68
11946	16	NEG	NEG	66	16,66
11085	16N	NEG	NEG	51	16N,51
11766	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
10600	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
10832	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
10829-2	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
290416-2	NEG	NEG	35,42	NEG	35,42
12213	31,18	33,52	NEG	NEG	31,18,33,52
12215	18D	6,11	35	NEG	18D,6,11,35
12233	NEG	52,33	42	NEG	52,33,42
060516-3	NEG	52	42	NEG	42,52
12151	NEG	NEG	35,42	NEG	35,42
12153	18D	33,58	NEG	NEG	18D,33,58
12154	NEG	NEG	35,42	NEG	35,42
12155	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11

Resultados de la NMPCR (Sotlar) para las muestras seleccionadas. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	Coctel I	Coctel II	Coctel III	Coctel IV	Tipos de VPH
12067-3	45,18	NEG	NEG	NEG	45,18
12094	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
12144	NEG	33, 58,6,11	NEG	NEG	33, 58,6,11
12142	45	NEG	43	39	45,43,39
12150-2	NEG	6,11	42,35	NEG	6,11,42,35
200416-1	NEG	33,58	NEG	NEG	33,58
210416-2	NEG	NEG	35,42	51,66	35,42,51,66
210416-3	NEG	NEG	42,35	NEG	42,35
12164	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
12166	NEG	NEG	43,35	NEG	43,35
12167-2	NEG	NEG	43,35	51,68	43,35,51,68
12174	NEG	NEG	43,35	66,39	43,35,66,39
12176-1	NEG	NEG	43,42,35	66,39	43,42,35,66,39
12178	NEG	6,11	NEG	68	6,11,68
12184	NEG	58,33	NEG	NEG	58,33
210416-7	NEG	33,6,11	NEG	68,39	6,11,33,39,68
210416-6	NEG	58,56	NEG	NEG	58,56
12124	NEG	NEG	43	51	43,51
12186-1	NEG	6,11	NEG	NEG	6,11
12227	NEG	NEG	42	51	42,51
12229-2	NEG	33	42	66,39	66,39,33,42
12217-5	31D	52	NEG	66	31D,52,66
11972	NEG	NEG	42,35	66	42,35,66
11971	NEG	NEG	42	68	42,68
290416-2	NEG	NEG	35,42	NEG	35,42

Resultados de la NMPCR (Sotlar) para las muestras seleccionadas. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	Coctel I	Coctel II	Coctel III	Coctel IV	Tipos de VPH
12296-2	NEG	33, 6/11	42	66, 68	6,11,33,42,66,68
12293	NEG	NEG	NEG	66, 51, 68	66,51,68
12292	NEG	33	44	NEG	33,44
12313	31	NEG	42, 43	NEG	31,42,43
12283	NEG	6/11, 58	NEG	NEG	6,11,58
12288	NEG	33	43	NEG	33,43
12322	NEG	33	NEG	66, 39	33,66,39
12246	45	NEG	42 ,43	NEG	43,42,45
12317-2	NEG	6/11	NEG	NEG	6,11
12338	NEG	6/11	NEG	NEG	6,11
12451-1	45	33	NEG	NEG	33,45
12451-4	NEG	6/11	NEG	NEG	6,11
12434	NEG	6/11	NEG	NEG	6,11
12439	NEG	33, 52	NEG	NEG	33,52
12358-2	NEG	6/11	35, 42	39	6,11,35,39,42
12358-1	NEG	6/11	NEG	NEG	6,11
12360	NEG	33	NEG	51, 68	33,51,68
12354	NEG	NEG	NEG	51, 68	51,68
12398	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12629	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12565	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12581-4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12564	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12558	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12585	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12582	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12594	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Resultados de la NMPCR (Sotlar) para las muestras seleccionadas. Fuente: LABIOMEX. Continuación.

Nº MUESTRA	Coctel I	Coctel II	Coctel III	Coctel IV	Tipos de VPH
12581-2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12548	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12654	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12547-1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12547-2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12551B	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12552	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12576	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12570-1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12590	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12556	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

4.5. Minihistoria Clínica de los pacientes.

A las muestras clínicas seleccionadas en este estudio, fueron traídas por pacientes/participantes de manera voluntaria con su respectivo consentimiento, quienes acudieron al Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX) y solicitaron un estudio de tipificación y detección de VPH (descrito en la metodología) para su posterior análisis. Los datos fueron obtenidos de la minihistoria que vienen adscritas a la muestra suministrados por su médico. En la tabla 4.4 muestra los datos obtenidos. La mayoría de las muestras seleccionadas no poseen la minihistoria clínica completa debido a que los datos no fueron suministrados por los pacientes/Médico tratante. Alguno de los datos faltantes fueron colposcopia, biopsia, uso de anticonceptivos y observaciones adicionales. Por ejemplo, para la data de citología, 96 están sin data, solo 43 proporcionaron datos, si presentaron coilocitos o una lesión de bajo o alto grado, 28 proporcionaron data para colposcopia (Ver tablas 4.14 y 4.15).

Tabla 4.4: Minihistoria clínica de las muestras seleccionadas.

Nº MUESTRA	EDAD	SEXO	ÁREA	CITOLOGIA	COLPOSCOPIA
12067-4	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
12129	22	M	S.E	S. E	S.E
12144	S.E	F	S.E	S. E	S.E
12119	19	M	PENE/CEP	S. E	S.E
080416-6	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
050416-5	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
050416-4	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
050416-3	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
050416-1	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
12114	23	F	CUELLO/CEP	ASCUS	NORMAL
12106	18	F	CUELLO/CEP	S. E	EB
12095	52	M	PENE/CEP	S. E	S.E
280316-10	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
280316-5	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
12105	24	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12091	24	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12088	S.E	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12085-4	22	F	CUELLO/CEP	ASCUS	NORMAL
12065	37	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12061	31	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12036-3	23	F	CEPILLADO	S. E	S.E
12044	18	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12053	32	F	CUELLO/CEP	LIEAG	ECTOPIA
12028	25	F	CUELLO/CEP	LIEBG	EB
06-1839	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
06-1840	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E

Minihistoria clínica de las muestras seleccionadas. Continuación.

Nº MUESTRA	EDAD	SEXO	ÁREA	CITOLOGIA	COLPOSCOPIA
12021	35	F	CUELLO/CEP	LIEBG	ATIPIA/ECTOPIA
12017	16	F	CUELLO/CEP	COILOCITOS	S.E
12016	32	F	S.E	S. E	S.E
12012 (NIC II)	22	F	CUELLO/CEP	LIEAG	ECTOPIA
12009	51	M	PENE/CEP	LIEAG	S.E
070316-6	21	M	S.E	S.E	S.E
070316-2	28	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11989	33	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11985	25	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11970-9	23	M	MUC BUC/CEP	S. E	S.E
11970-6	33	F	CUELLO/CEP	S. E	ATIPIA
0-61838	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
11964	20	F	CUELLO/CEP	LIEBG	EB
11969	27	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11774	35	F	CUELLO/CEP	S.E	S.E
11972	19	F	CUELLO/CEP	ASCUS	EB
11890	19	M	PENE/CEP	S. E	S.E
290116-4	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
290116-2	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
260116-1	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
11884	34	F	CUELLO/CEP	S.E	S.E
11882-2	26	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11881-1	S.E	F	S.E	S. E	S.E
12008	17	F	S.E	S. E	S.E

Minihistoria clínica de las muestras seleccionadas. Continuación.

Nº MUESTRA	EDAD	SEXO	ÁREA	CITOLOGIA	COLPOSCOPIA
12003	38	F	CUELLO/CEP	LIEBG	NORMAL
090316-7	21	M	PENE/CEP	S.E	S.E
090316-5	49	F	CEPILLADO	LIEBG	EB
090316-4	29	M	PENE/CEP/GLA	S. E	S.E
070316-7	29	M	S.E	S.E	S.E
11877-2	20	F	CUELLO/CEP	LIEBG	EB
11871-1 (NIC I)	19	F	CUELLO/CEP	S. E	ATIPIA
11863	23	F	CUELLO/CEP	LIEBG	S.E
11861	19	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11860	40	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11959 (NIC I)	19	M	CUELLO/CEP	LIEBG	S.E
11946	19	F	CUELLO/CEP	LIEBG	ECTOPIA
11085	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
11766	33	M	PENE/CEP	LIEBG	EB
10600	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
10832	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
10829-2	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
290416-2	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
12213	23	F	CUELLO/CEP	NORMAL	EB
12215	47	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12233	43	F	CUELLO/CEP	NORMAL	S.E
060516-3	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
12151	21	F	CEP/INTRITO/ LABIOS ME- NORES	HISOPADO	NORMAL

Minihistoria clínica de las muestras seleccionadas. Continuación.

Nº MUESTRA	EDAD	SEXO	ÁREA	CITOLOGIA	COLPOSCOPIA
12153	28	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12154	59	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12155	19	M	S.E	S.E	S.E
12067-3	21	M	BIOPSIA ZONA INGLINAL	S. E	S.E
12094	27	M	S.E	S. E	S.E
12144	19	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12142	21	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12150-2	41	M	PENE/CEP	S. E	S.E
200416-1	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
210416-2	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
210416-3	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
12164	19	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12166	24	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12167-2	24	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12174	17	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12176-1	29	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12178	25	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12184 (NIC I)	20	F	CEPILLADO	LIE/PAP	EB
210416-7	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
210416-6	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E
12124	27	M	PENE/CEP	LIEBG	S.E
12186-1	17	M	PENE/CEP	S. E	S.E
12227	20	M	PENE/CEP	S. E	S.E

Minihistoria clínica de las muestras seleccionadas. Continuación.

Nº MUESTRA	EDAD	SEXO	ÁREA	CITOLOGIA	COLPOSCOPIA
12229-2	40	S.E	S.E	COILOCITOS	S.E
12217-5	27	M	PENE/CEP	S. E	S.E
11972	31	F	CUELLO/CEP	LIEBG	S.E
11971	50	M	PENE/CEP	S.E	S.E
290416-2	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E E
12296-2	22	F	CUELLO/CEP	S.E	S.E
12293	22	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12292	22	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12313	19	F	CUELLO/CEP	S.E	S.E
12283	18	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12288	22	F	CUELLO/CEP	ASCUS	EB/MOSAICO
12322	55	F	CEPILLADO	LIEBG	S.E
12246	22	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12317-2	26	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12338	22	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12451-1	44	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12451-4	22	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12434	25	M	S.E	S.E	S.E
12439	16	F	CUELLO/CEP	LIEBG	ECTOPIA
12358-2	21	M	S.E	S.E	S.E
12358-1	27	M	S.E	S.E	S.E
12360	36	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12354	27	F	CUELLO/CEP	S.E	S.E
12398	50	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12629	41	F	CUELLO/CEP	S.E	NORMAL
12565	31	F	CUELLO/CEP	ASCUS	EB/ATIPIA

Minihistoria clínica de las muestras seleccionadas. Continuación.

N.º MUESTRA	EDAD	SEXO	ÁREA	CITOLOGÍA	COLPOSCOPIA
12581-4	33	F	CEP/VAGINA	S.E	S.E
12564	33	F	S.E	LIEBG	NORMAL
12558	20	F	S.E	LIEBG	NORMAL
12585	S.E	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12582	31	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12594	26	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12581-2	40	M	CEPILLADO	S.E	S.E
12548	40	F	PENE/CEP	S.E	S.E
12654	33	F	CEPILLADO	S.E	S.E
12547-1	27	F	CUELLO/CEP	LIEBG	NORMAL
12547-2	31	F	CUELLO/CEP	ASCUS	NORMAL
12551B	31	M	S.E	S.E	S.E
12552	24	M	S.E	S.E	S.E
12576	45	M	PENE/CEP	S.E	S.E
12570-1	41	F	S.E	LIEBG	ATIPIA
12590	39	M	PENE/CEP	LIEAG	S.E
12556	24	F	CUELLO/CEP	VPH	EB

4.6. Resultados Estadísticos

La data suministrada se le dió el tratamiento estadístico mediante el programa SPSS v.21. Los estadísticos utilizados en este estudio fueron índice κ , Prueba de χ^2 , Correlación de Pearson y ρ .

4.6.1. Calidad del ADN

Para ello se utilizaron los porcentajes de positividad obtenidos para cada muestra mediante PCR-Beta Globina, para efectos de correspondencia, se recurrió a las pruebas κ y χ^2 . Los resultados se muestran en las tablas 4.5 y 4.6 respectivamente.

Tabla 4.5: Pruebas de κ, χ^2 y Correlaciones para Beta Globina para 139 muestras.

	Valor	gl	Sig (asintótica) bilateral
χ^2 Beta-Globina	79,57	1	0
Razón de verosimilitudes	101,30	1	0
	Valor	error atípico	T aproximado
Correlación de ρ	0,76	0,05	13,54
Índice κ	0,73	0,08	8,92

Tabla 4.6: Porcentaje de positividad para prueba de Beta-Globina en 139 muestras.

	Beta-Glob previo -	Beta-Glob previo +	Total
Beta-Glob actual -	32 (23,02 %)	0	32 (23,02 %)
Beta-Glob actual +	19 (13,66 %)	88 (63,30 %)	107 (76,97 %)
Total	N=51 (36,69 %)	N= 88 (63,30 %)	N=139 (100 %)

Para la calidad de ADN (Ver tabla 4.5), la prueba de χ^2 resultó ser alta (79,57) lo que implica una dependencia entre el tiempo transcurrido desde que se realizó la reacción PCR para Beta-Globina previa y actual y que el ADN en la mayoría de las muestras se conservó, esto es sustentado por la correlación ρ de 0,76 y el índice κ de 0,73 que da un excelente acuerdo.

4.6.2. Sistemas MY09/11-RFLP vs NMPCR (Sotlar)

Se aplicó las pruebas estadísticas mediante el programa SPSS v.21 a los resultados obtenidos. Se aplicó χ^2 , κ y correlaciones como muestran las tablas 4.7 y 4.8.

Tabla 4.7: Pruebas de χ^2 RFP-MY09/11 vs NMPCR

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
χ^2 de Pearson	9,774	1	0,002
Razón de verosimilitudes	15,345	1	0,000
Nº de casos válidos	139		-

Tabla 4.8: Correlaciones κ y ρ de RFLP-MY09/11 vs NMPCR.

	Valor	error atípico	T aproximado
Índice κ	0,131	0,032	3,126
Correlación de ρ	0,27	0,00	0

Tabla 4.9: Valores de χ^2 para la Clínica, edad, sexo y área de toma de muestra de los pacientes vs los tipos de infección detectados por NMPCR.

Variable	Valor χ^2	gl	Sig. asintótica bilateral
Presencia de lesión (Clínica) vs Tipo de Infección	6,72	2	0,035
Edad vs Tipos de Infección	8,46	2	0,015
Sexo vs Tipos de Infección	9,12	2	0,010
Área de toma de muestra vs Tipos de Infección	6,75	2	0,034

4.6.3. Correlación de infección múltiple y lesiones.

En la tabla 4.10 se observan los porcentajes de positividad en la clínica de los pacientes relacionadas con infecciones múltiples (> 3 tipos virales de VPH) e Infecciones simples (1 y 2 tipos virales de VPH). La clínica resume la colposcopia, biopsia y citologías presentadas en las historias médicas, si algún paciente presentaba al menos una de las tres, se catalogaba como clínica positiva, si presentaba un diagnóstico normal

se catalogaba como clínica negativa . De las 139 muestras en total, se consideró solo 46 debido a que éstas tenían la data completa, 93 muestras no presentaron data para su clínica (Ver tabla 4.10).

Tabla 4.10: Tipo de Infección relacionados con la clínica (+/-) presentada por los pacientes en la minihistoria.

NMPCR	Sin Data	Clínica (-)	Clínica (+)
Infección Múltiple de VPH	34 (24,46 %)	5 (3,59 %)	16 (11,51 %)
Infección Simple de VPH	52 (37,41 %)	1 (0,71 %)	11 (7,91 %)
Negativos	7 (5,03 %)	4(2,87 %)	9 (6,47 %)
Total	93 (66,90 %)	10 (7,20 %)	36 (25,90 %)

Se escogió un valor menor a 0,05 para el nivel de significancia para la Prueba χ^2 para las 139 muestras clínicas procesadas mediante el software SPSS el cual según la tabla 4.7, el valor 9,74 y 0,002 la significancia asintótica bilateral para la comparación entre ambos métodos de detección y tipificación, es menor que 0,05 (El valor de 0,05 es un valor establecido de acuerdo al nivel de confianza del 95 %), por lo que se puede aducir que, en los dos métodos tanto la NMPCR y la PCR con los oligonucleótidos MY09/11 hay dependencia, ergo hay relación entre los dos métodos usados para la detección y tipificación de VPH. A pesar de esto, el índice κ es de 0,131, lo que significa que hay una correlación pobre. Esto es congruente con lo referenciado en la bibliografía (Qu *y col.*, 1997) (Sotlar *y col.*, 2004) donde se muestran que la PCR con los oligonucleótidos MY es más sensible para el VPH35 y cada método GP vs MY según Weimin Qu *y col.*, sugieren que hay diferencias en la sensibilidad o habilidad para amplificar otros tipos de VPH, Sotlar *y col.* reportan que la Nested Multiplex PCR es mucho más sensible que la reacción con los oligonucleótidos MY09/11. Los oligonucleótidos degenerados que hibridan a regiones de consenso cortas dentro de los oncogenes E6 y E7 se diseñaron para amplificar el ADN viral de alto riesgo y algunos de los genotipos de VPH de bajo riesgo más prevalentes, esto es que el sistema MY09/11 se enfoca en la amplificación de la región L1 mientras que, NMPCR propuesto por Sotlar *y col.* (2004), amplifica la región E. Además, los alineamientos de secuencias

con las correspondientes regiones E6/E7 es de amplio espectro con respecto a L1 (bajo riesgo) genotipos de VPH de la mucosa indica que los cebadores consenso E6 / E7 también serían capaces de amplificar el ADN de estos tipos con eficiencia comparable para VPH ya integrado. Un enfoque similar se ha descrito recientemente por Sasagawa y colegas. Cabe destacar que los oligonucleótidos MY son más sensibles para detectar los VPH 6 y 11 (VPH-bajo riesgo) mientras la NMPCR no distingue entre estos y se tipifica como 6/11. La PCR por MY09/11 a pesar que es un método infalible para detectar VPH nuevos o exóticos, la PCR en este sistema está diseñada para amplificar el VPH que esté en mayor proporción en la muestra, por ejemplo, si en una muestra están presentes los tipos virales 16, 18, 43; en el sistema MY09/11 amplificará el tipo viral más prevalente, hipotéticamente si está el VPH-16 en mayor proporción que los demás tipos, MY09/11 amplificará el VPH-16 preferentemente que el 18 o 43; en cambio en la NMPCR como es un tipo de PCR anidada donde hay una reacción general amplificará los tipos virales 16, 18 y 43; esto es por como está diseñada la misma PCR.

Tabla 4.11: Tipos de Infección en las clases de edades (en años).

TIPOS DE VPH	Menores de 25	Mayores de 25	TOTAL
INFECCIÓN MÚLTIPLE	23	23	46
INFECCIÓN SIMPLE	19	22	41
NEGATIVO	3	16	19
TOTAL	45	61	106

Del 100 % de las muestras, 76,25 % (N=106) poseen data completa para la edad; las historias clínicas que registran sexo, edad, biopsia, colposcopia y tipo de muestras clínicas (cepillado de pene, cuello, vagina, escroto, glante) no todas presentan datos completos debido a que la historia del paciente está incompleta, por ende, a conveniencia del investigador y para evitar el sesgo de datos, se realizó prueba estadística sólo para MY09/11 y NMPCR que se tomaron como variables. Para los valores si data, se tomaron en cuenta las frecuencias. Del 76,25 % que presentan la data, 16,74 % (N=23) presentan infección múltiple de VPH (más de 3 tipos de VPH) en edades comprendidas menores de 25 años; 15,82 % (N=22) en edades comprendidas

mayores de los 25 años que fueron los de mayor incidencia presentan infección simple (hasta 2 tipos de VPH); esto puede ser corroborado en la figura 4.11 . En la figura 4.10 muestra según el sexo de los pacientes, 34,53% de pacientes que presentan infección múltiple de VPH mientras que el 30,21% presentaron infección simple de VPH y 14,38% resultaron negativos; de los cuales 20,14% (N=28) son mujeres, presentaron infección múltiple de VPH y 17,26% presentaron infección simple. Los hombres presentaron una proporción más baja, con 14,38% para infecciones múltiples; 12,94% para infecciones simples y 7,91% resultaron negativos. En síntesis las edades comprendidas en la clase mayores a 25 años 45 presentan infección por VPH (23 infección múltiple y 22 infección simple) lo que es una mayor incidencia la infección por VPH en pacientes mayores de los 25 años, lo que concuerda con los resultados arrojados por Quintero (Quintero *y col.*, 2008), donde la mayor incidencia está en pacientes con edades comprendidas entre los 20 y 26 años y entre los 27 y 35 años.

www.bdigital.ula.ve

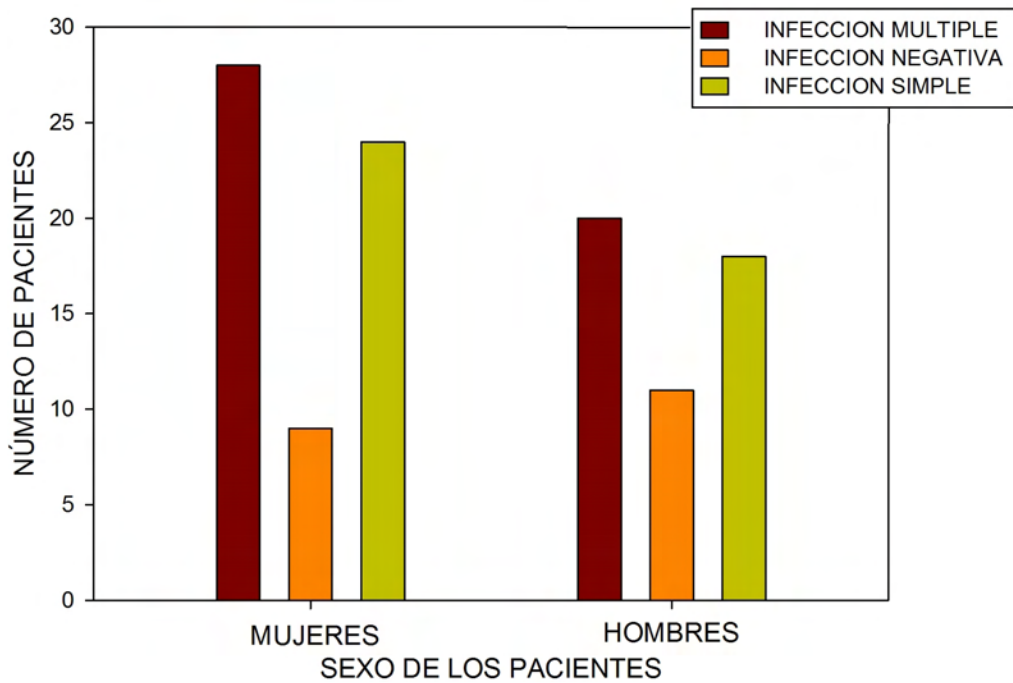


Figura 4.10: Frecuencia de Tipos de Infección según el sexo de los pacientes.

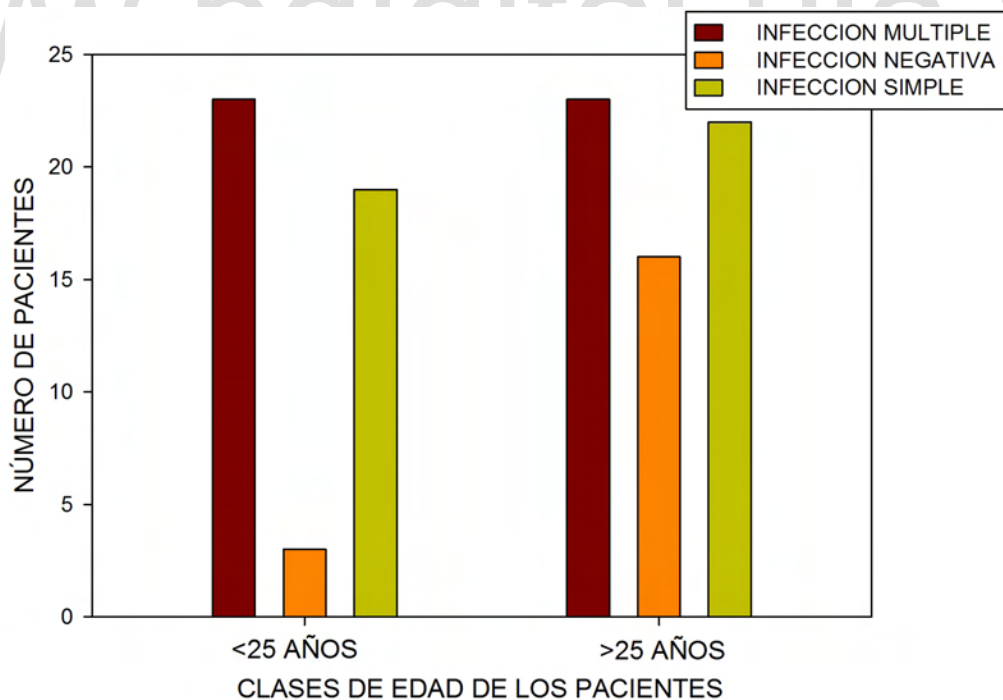


Figura 4.11: Frecuencia de Tipos de Infección según clases de edades de los pacientes.

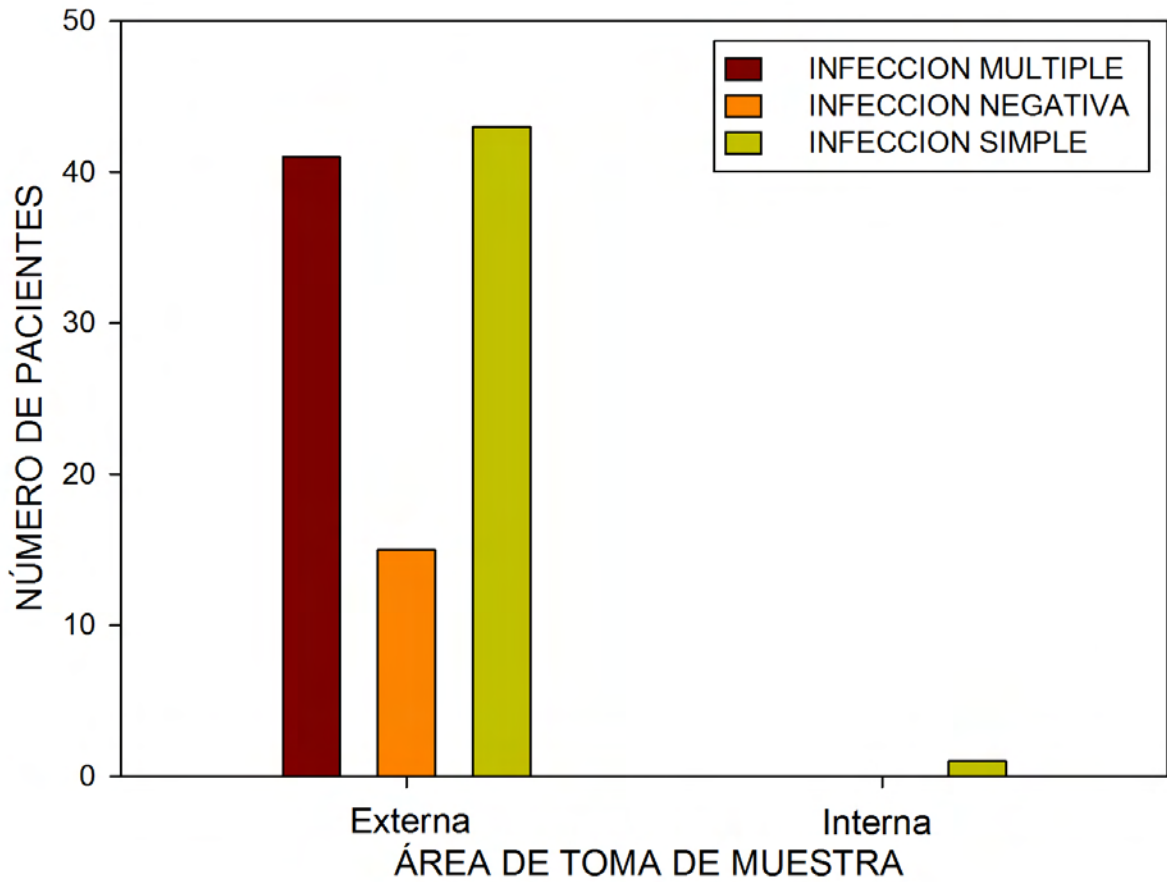


Figura 4.12: Frecuencia de Tipos de Infección según área de toma de muestra de los pacientes.

La figura 4.12 y la tabla 4.13 señalan que mayormente la toma de muestras por cepillado de pene y cepillado de cuello son las áreas donde preferentemente se toma el mayor número de muestras clínicas, estas se catalogaron como área de muestra externa.

Para la colposcopia de los pacientes se obtuvieron muchos valores sin data, es decir; un 82,35% (N= 98) al ver la figura 4.13 muestra que los pacientes no suministraron datos suficientes que sin duda, hubiese ayudado a robustecer los tratamientos estadísticos que en la discusión se referenciará la relación entre los tipos de VPH y asociación con respecto al tipo de colposcopia. En la figura citada se aprecia que sólo el 17,65% (N=21) presentaron data completa para la colposcopia,

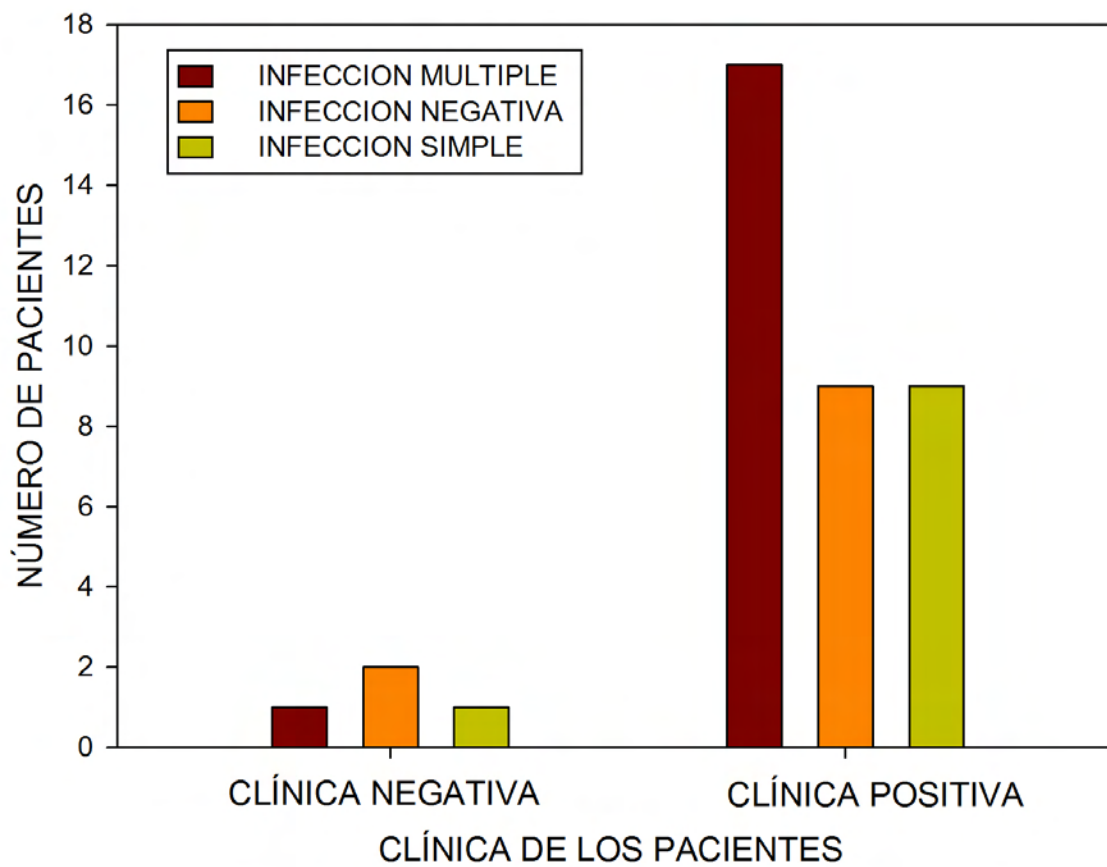


Figura 4.13: Frecuencia de Tipos de VPH según la colposcopia de los pacientes.

de los que 2 presentaron atipia y se les tipificó ambos tipos de VPH (6,11 y 33), para el dato que presentó atipia/ectopia presentó VPH de alto riesgo (18 y 52). Para EB/COMPLEJO/MO (Epitelio blanco y complejo con mosaico grueso) se presentó 1 para ambos tipos de VPH (33 y 43) ver tabla 4.15. Las lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) se encontró para VPH de alto riesgo (N=1) con VPH 45 y 56 y ambos tipos de VPH (N=2) con VPH tipos 16, 35, 39, 42, 43 y 51. Las lesiones de bajo grado (LIEBG) pueden presentarse para VPH de bajo y de alto riesgo o pacientes que posean ambos tipos (ver tabla 4.14., donde los tipos que tienen en común y los más prevalentes son 6/11, 16, 33, 35, 39 y 51). Es importante señalar que el uso de tabaco y anticonceptivos orales está asociado a VPH (Quintero *y col.*, 2008; Zur Hausen, 1996). En este caso a consideración, la data no fue suministrada por los pacientes en sus historias clínicas (89,07%), así mismo con la data suministrada (10,92%), el 5,88% usan anticonceptivos orales de los cuales 2 presentaron VPH de alto riesgo, 2 presentaron VPH de bajo riesgo y 3 presentaron ambos tipos de VPH, mientras el 2,52% aseveraron usar condón y presentaron ambos tipos de VPH (ver figura 5.1)

Tabla 4.12: Frecuencia de pacientes positivos para VPH por NMPCR según el sexo de los pacientes

SEXO	Frecuencia	Porcentaje
SIN DATA	09	7,5630
HOMBRES	49	41,1764
MUJERES	61	51,2605
Total	119	100

W

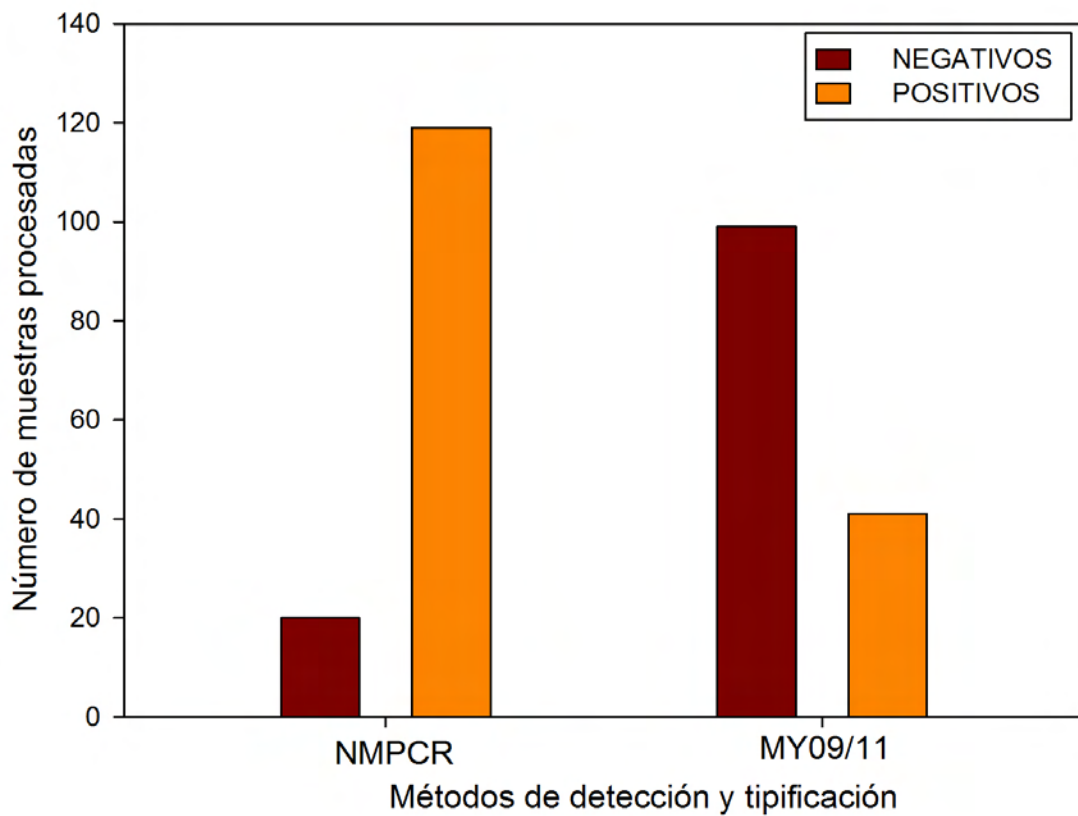


Figura 4.14: Frecuencia de resultados positivos y negativos de los pacientes para ambos sistemas.

Tabla 4.13: Tipos de Infección según el área de muestra clínica para 139 muestras procesadas con NMPCR.

INFECCIÓN	CLÍNICA POSITIVA	CLÍNICA NEGATIVA	SIN DATA
MÚLTIPLE	15	5	34
SIMPLE	11	1	53
NEGATIVA	9	4	7
TOTAL	35	10	94

Tabla 4.14: Tipos de Infección según la citología de los pacientes para 139 muestras procesadas con NMPCR.

CITOLOGÍA/TIPOS DE VPH	MÚLTI- PLE	SIMPLE	NEGATIVO	TOTAL
SIN DATA	36	55	10	96
COILOCITOS	2	0	0	2
ASCUS	3	1	3	7
LIEAG	2	1	1	4
LIEBG	7	8	3	18
NORMAL	3	1	4	8
TOTAL	53	65	21	139

Tabla 4.15: Tipos de Infección según la colposcopia de pacientes procesados con NMPCR.

COLPOSCOPIA /TIPOS DE VPH	MÚLTI- PLE	SIMPLE	NEGATIVO	TOTAL
SIN DATA	78	19	14	111
ATIPIA	0	1	1	2
ATIPIA / ECTOPIA	2	1	2	5
EB	3	5	3	11
ECTOPIA	1	3	1	5
NORMAL	3	1	1	5
TOTAL	87	30	20	139

Tabla 4.16: Tipos de Infección y biopsias de 139 pacientes por NMPCR.

BIOPSIAS /TIPOS DE VPH	MÚLTIPLE	SIMPLE	NEGATIVO	TOTAL
SIN DATA	51	59	19	129
NIC I	2	1	0	3
NIC II	1	0	0	1
NO	1	2	0	3
VPH-ATIPIC	0	2	1	3
TOTAL	55	64	20	119

El VPH 33 y 58 se hallan asociados a neoplasias intracervicales de grado I (NIC I), para las neoplasias de grado II se le halló asociación al VPH 16 para consideraciones de esta data. Según la tabla 4.16 se muestran 2 pacientes con NIC I para VPH de alto riesgo, 1 paciente para VPH que presento ambos tipos y 1 paciente con NIC II que se le tipificó ambos tipos de VPH.

Para efectos de la tipificación de VPH mediante las dos técnicas, el 17 % (N=21) dió positivo para PCR-MY09/11; 16,80 % (N=20) resultó indeterminado (nd), estas muestras dieron positivas para MY pero al momento de realizar la RFLP, no podia tipificarse pero se tomaron como positivas para este sistema (N= 41); 70,50 % (N=98)

dió negativo para MY09/11 De muestras ensayadas con el sistema MY09/11 dieron positivas 119 muestras para NMPCR y 20 negativas (Ver figura 5.1).

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 5

Discusión

El método de PCR general más preferente es el que amplifica el gen L1 utilizando los oligonucleótidos MY09/11, GP5+/ GP6+, la desventaja de este sistema de PCR es que el ORF del gen que se usa como blanco puede perderse cuando el virus se integra en el genoma de la célula hospedera (lo que sucede con frecuencia en los tipos oncogénicos), por lo que se desarrollaron sistemas de PCR tipo específica; que utilizan oligonucleótidos para los genes E6 y E7, los cuales se mantienen intactos durante la integración viral (Hernández *y col.*, 2012) lo que dificulta la tipificación en VPH oncogénico de alto riesgo y en muestras que tienen lesiones neoplásicas; por tal razón se explica que en el 65,54 % dieran negativas en MY09/11 aún cuando son positivas en la NMPCR. Una de las ventajas del sistema MY es que se puede tipificar a los VPH tipos 6 y 11 mientras que con la NMPCR se tipifica como 6/11 ya que se hace difícil distinguir entre estos dos tipos virales debido a que su homología es mayor al 90 % Sotlar propuso colocar a 6/11 junto con 33, 52, 56 y 58 por su homología para diseño de los oligonucleótidos (Sotlar *y col.*, 2004).

A consideración de este estudio, sólo se le aplicó tratamiento estadístico a las variables MY09/11 y NMPCR debido a que las historias clínicas al ser incompletas, se obtuvo un gran porcentaje sin data, lo cual no es convincente para hacer algún tipo de asociación a una lesión NIC, LIEBG, LIEAG o coilocitos con un tipo de VPH en específico. La literatura citada muestra sin embargo; que las LIEBG y LIEAG se hallan asociadas a VPH 16, 18 y 58 (Zur Hausen, 1996). En cuanto a los métodos de detección de VPH, el más usado es la PCR y con el paso de los años ha habido

un mejoramiento en dichas técnicas. Sasagawa y Sotlar mejoraron la PCR usando oligonucleótidos mediante secuencias consenso para poder amplificar mejor las regiones L1, L2, E5, E6 y E7 principalmente para una mejor tipificación y detección de tipos virales (Sasagawa *y col.*, 2000) (Sotlar *y col.*, 2004). Ahora bien, para los casos con LIEBG, 53,1 % resultaron positivos por PCR, de los cuales sólo el 18,1 % presentan subtipo de alto riesgo. En los casos de LIEAG el 69,5 % resultaron positivos por PCR, con 43,5 % de los casos presentando infección por un subtipo de alto riesgo, se observa que un 30,4 % de estos casos fueron negativos por PCR (Quintero *y col.*, 2008), lo que concuerda con lo hallado en estos resultados (ver tabla 4.14) donde las LIEAG se hallaron asociadas a VPH de alto riesgo y en pacientes que tienen reinfecciones, es decir; múltiples tipos de VPH. Se asoció LIEBG con los tipos de VPH 6, 11, 16, 18, 33, 43, 51, 66; las LIEAG se asoció con VPH 51 que tenían las muestras en común. Sin embargo, para las citologías (LIEBG, LIEAG) y las colposcopia (ver tabla 4.9) los valores de Chi cuadrado son mayores para la prueba de dos colas, por lo que no se encontró relación entre el tipo de VPH con el tipo de citología o colposcopia que presente el paciente; esto se explica porque la gran mayoría de la data utilizada en este estudio, las historias clínicas estaban incompletas para los datos colposcópicos y citológicos, así como las biopsias. Para determinar la calidad de ADN mediante la prueba de Beta Globina, un 72,41 % (N= 63) dió positiva tanto para la CR Nested Multiplex y la RFLP-MY09/11; mientras que el 27,59 % (N= 24) resultó positivo para la Nested Multiplex PCR y negativa para la RFLP-MY09/11. Esto quiere decir que el ADN de muestras se degradó, ya sea por acción de congelamiento-descongelamiento o degradación por factores como nucleasas o inhibidores como sangre en las muestras procesadas.

Quintero y col. (Quintero *y col.*, 2008) hallaron una asociación del 18,1 % de LIEBG que presentaron VPH de alto riesgo, en los casos de LIEAG el 43,5 % de los casos presentaron infección por VPH de alto riesgo que, para efectos comparativos con los presentes resultados, se halló asociación en LIEBG con VPH de tipo alto riesgo (N=5); ambos tipos (riesgo alto y bajo N= 3) y bajo riesgo (N= 5) (ver tabla 4.14); es decir, las lesiones de bajo grado pueden aparecer indistintamente qué tipo de VPH presenten los pacientes; estos van a la consulta, se les practica una citología y exámenes exploratorios

como el PAP (Prueba Papanicolau), el médico tratante observa alguna anomalía solicita al paciente una PCR-VPH para tipificación, y mayormente los resultados de la PCR que son mucho más sensibles que la citología revela que el paciente en cuestión da positivo para VPH. Las lesiones de alto grado se hallan asociadas a VPH de alto riesgo o de ambos tipos, cuando el paciente presenta reinfección con VPH de bajo riesgo (mayormente 6 y 11 en conjunto con un tipo de alto riesgo).

Quintero y col. han sugerido que la infección prolífica origina numerosas partículas virales fácilmente detectables por la PCR, esto ocurre en lesiones de bajo grado (LIEBG), si el virus está en estado de latencia, no se replica activamente sino que está presente en una copia; así las células infectadas permanecen en estado episomal o integrada a un cromosoma del genoma celular, esto puede ocurrir en lesiones de alto grado (LIEAG). El estado de latencia afecta la sensibilidad de la PCR, por lo que hay que cuidar y tomar en consideración en qué lugar la muestra fue tomada, o si fue extraída de una zona donde las células portadoras son escasas o están ausentes. Es por ello que en algunas reacciones PCR para tipificación da indeterminado (catalogado nd, ver figura 5.1), en cuanto a la PCR-RFLP para MY09/11 (N= 20) dieron indeterminados cuando se les realizó la digestión enzimática con la enzima de restricción HpyCH4V, que genera un tipo de corte de tipo como 5'- TG'CA-3' y 5'- AC'GT-3'. Ahora bien, de 139 muestras clínicas analizadas en este estudio en total (119 positivas para la NMPCR), para el sistema MY09/11 N= 99 dieron negativo y N= 41 dieron positivas (se incluyen las nd) para PCR-RFLP con el sistema MY09/11; es decir, el sistema PCR-RFLP con MY tiene un 29,49% de positividad y la NMPCR un 85,61% de positividad.

Una ventaja del sistema PCR-RFLP con MY09/11, es que puede discernir entre los tipos de VPH de bajo riesgo 6 y 11 debido a que los oligonucleótidos están diseñados para amplificar 450 bp de la secuencia conservada del gen L1, amplificando un amplio espectro de tipos virales de VPH, pero no para los tipos oncogénicos. (Depuydt *y col.*, 2007; Qu *y col.*, 1997) por lo que se explica los falsos negativos en algunos casos y el alto número de negativos para muestras que, en la NMPCR dieron positivas (Sotlar *y col.*, 2004). Sin embargo, hubo dificultad para tipificar con el sistema MY09/11 debido a bandas o barridos indeterminados, se infiere que fue causado por el origen clínico

de las muestras que podían contener restos de sangre que es inhibidora de la PCR, de una NIC que en el sistema NMPCR puede ser detectable por el amplio espectro de amplificación de oligonucleótidos para los distintos tipo virales pero en el sistema MY09/11 no es detectable debido a la integración en el genoma y la entrada al estado de latencia del virus.

Otro factor a considerar es el tipo y resolución de los geles usados en la electroforesis; en este caso se usó geles de agarosa al 2% para tener una óptima resolución para revelado del gel, en vez de geles de acrilamida donde las bandas pequeñas digeridas en la RFLP para tipificación, son mejor visualizadas ergo puede haber una mejor tipificación.

Estadísticamente se puede aducir que hay relación entre los métodos RFLP mediante MY09/11 y una NMPCR aunque el 17% dió positivo para VPH mientras que el 100% que correspondían a las muestras seleccionadas dieron positivo para la NMPCR, a parte del objetivo comparativo, la NMPCR detectó infecciones múltiples; 64 pacientes con 2 tipos virales, 30 pacientes con 3 tipos virales, 16 pacientes con 4 tipos virales, 6 pacientes con 5 tipos virales, 1 paciente con 6 tipos virales y 8 tipos virales de Papiloma en 2 pacientes. Se aprecia el amplio espectro de tipificación y detección de VPH al contrario de la RFLP que a lo sumo detecta 2 tipos virales en una muestra, pero para efectos de distinguir entre los tipos virales 6 y 11, la RFLP los puede dilucidar por separado mientras que, la NMPCR no puede, en los análisis se describe como 6/11 pudiendo tener la uno de estos o ambos. Sin embargo en la RFLP se utilizan enzimas de restricción que dependiendo de la naturaleza de la muestra, pueden usarse varias enzimas para poder tipificar, lo cual esto implicaría gastos en los costos, mientras que en la NMPCR no requiere digestión alguna sino reacciones específicas con los cocteles de oligonucleótidos.

Para la estadística de este estudio, se utilizó la prueba χ^2 , Prueba κ y correlación de Pearson y correlación ρ (Trudy Watt, 2007). Un valor κ 0,74 para Beta Globina es una buena concordancia, esto es que, los valores previos y actuales no se desviaron en demasía, en otras palabras, se conservó el ADN en las muestras de acuerdo al porcentaje de positividad. Para χ^2 se observa que la significancia asintótica bilateral (ver tabla 4.5) es cero, esto es menor que el valor de significancia 0,05 esto quiere decir que el

error es menor y hay relación entre la positividad previa y actual de las muestras, con respecto a Beta Globina no hubo mayor degradación del ADN en la mayor parte de las muestras. El valor χ^2 para contrastar entre la RFLP del sistema MY09/11 vs NMPCR es 9,774 con una significancia asintótica bilateral de 0,002 que es menor al nivel de significancia 0,05 por lo que se deduce que el resultado es significativo y hay asociación entre ambos métodos, el riesgo relativo es de 1,22 que es mayor a 1 por lo que hay una asociación entre ambos métodos, se puede decir también que la probabilidad que un resultado sea positivo en NMPCR (Sotlar) es 15 veces mayor que en el sistema MY09/11 (Ver tabla 4.7 y 4.8). El valor de Spearman ρ asocia dos variables, tomando los valores $-1 \leq \rho \leq +1$, un valor 0 significa no correlación entre las dos variables pero no significa que sean independientes; en este caso el valor de κ es 0,131 es decir, hay poca correlación entre estos dos métodos. El valor de correlación de ρ es de 0,27; lo que significa que entre ambos métodos hay poca correlación debido a que NMPCR es más sensible para detección de múltiples infecciones que MY09/11. Esto quiere decir que asociación no implica correlación, el hecho de que ambos métodos estén asociados entre sí, no significa que estén correlacionados; esto es, por el hecho que la NMPCR detecta múltiples tipos de VPH en una muestra mientras que MY09/11 detecta a lo sumo 2 tipos. Para la clínica de los pacientes en contraste con el NMPCR, el valor χ^2 , fué de 6,72 con una significancia asintótica bilateral de 0,035 valor que, es menor que el nivel de significancia 0,05 por lo que se deduce que el resultado es significativo y se halló asociación entre la clínica del paciente y la infección múltiple o simple que presente detectado mediante la NMPCR. (Ver tabla 4.9). Para las edades y los tipos de infección el valor de χ^2 fué de 8,46 con una significancia asintótica bilateral de 0,015 que es menor a 0,05 por lo que hay relación con las edades de los pacientes y la presencia de infección detectada por NMPCR, según (Quintero y col., 2008) las edades cruciales donde se detecta VPH positivo es en las edades de 25 y 35 años. El valor de χ^2 fué de 9,12 para el sexo de los pacientes, por lo que se estima una significancia asintótica bilateral de 0,010 por lo que es significativo y se puede decir que hay relación entre el sexo de los pacientes y la infección de VPH que pudieran presentar, en cuyo caso es más probable que sea del sexo femenino. El área para la toma de muestra obtuvo un valor χ^2 de 6,75 con una significancia asintótica bilateral de 0,034; menor que el nivel

de significancia de 0,005 con lo que se deduce que ha relación entre la detección de algún tipo de VPH con el área de la toma de muestra.

www.bdigital.ula.ve

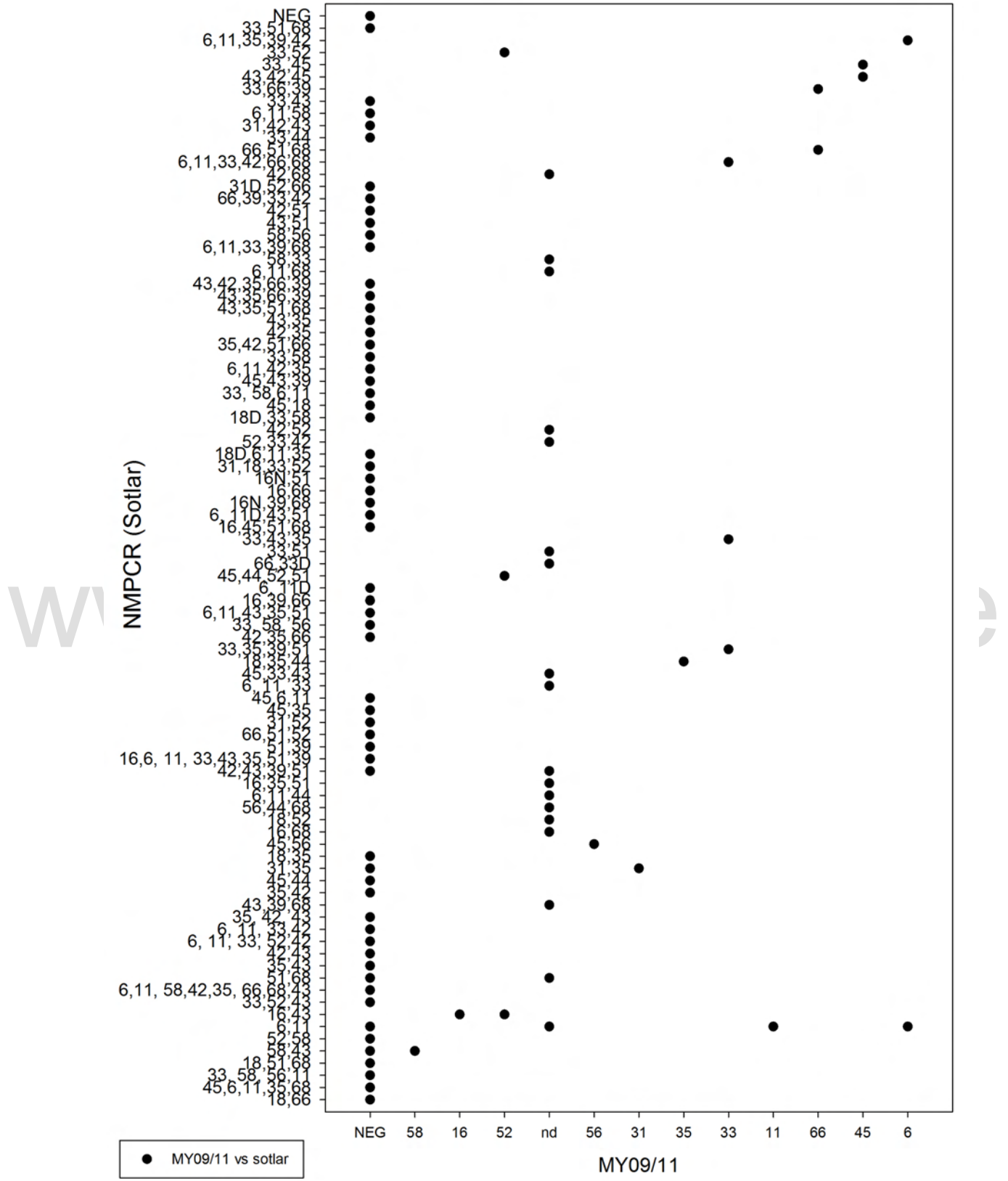


Figura 5.1: Dispersión de los tipos de VPH detectados por NMPCR (Sotlar) y MY09/11.

Capítulo 6

Conclusiones

El virus del Papiloma humano representa un problema de salud pública que, es imperativa la prevención y más aún la información al respecto al público. Una de las preocupaciones es lograr métodos eficaces para la tipificación correcta y precisa en la detección del ADN viral en las muestras clínicas de los pacientes, donde los métodos aplicados sean rápidos, seguros, no invasivos, económicos con respecto a otros métodos y reproducible en los casos donde hayan lesiones neoplásicas de mayor gradoe incluso, la detección pueda ser medio de despistaje para detectar tempranamente un cáncer in situ debido a que el VPH es un agente causal etiológico. En los análisis moleculares debe ir en pos de mejoramiento que permitan afinar la búsqueda y relación de tipos virales con las lesiones que el paciente pueda presentar y basándose en la vanguardia de la Ingeniería Genética, diseño de algoritmos, detección simultánea de múltiples tipos virales en vias a tratamientos efectivos en el futuro que fungan en el mejoramiento de la caidad de vida de los pacientes que acuden a consultas o deseen conocer su estatus de salud.

En este estudio se halló asociación entre la detección por NMPCR (Sotlar) y RFLP-MY09/11, siendo la NMPCR más sensible que la RFLP-MY09/11 debido a que es 15 veces más probable que de un diagnóstico real positivo en NMPCR que en la RFLP-MY09/11, por lo que el valor κ fué bajo debido a la poca correlación entre ambos métodos, siendo esto porque la NMPCR detecta más de 3 tipos tipos de VPH en una muestra. A su vez, variables como la edad, sexo, clínica y área de toma de muestra guardan asociación con el VPH detectado sea múltiple o de infección simple, siendo

el sexo femenino en quienes mayormente se detecta infección. Se ha detectado una alta incidencia de VPH en la población juvenil, sobretodo en edades comprendidas entre los 25 y 35 años, también en personas mayores a los 50 años. Siendo esto así, es imprescindible la educación en la clínica del virus en los pacientes y un seguimiento de ser posible estricto en cuanto a la historia clínica del paciente para hallar relaciones entre lesiones y el tipo de VPH detectados en los pacientes.

La PCR a lo largo de los últimos 20 años ha sido la vanguardia en los métodos de detección virales y con el continuo mejoramiento en la técnica con modificaciones al protocolo, se puede llegar al diseño de vacunas más efectivas, kits de detección combinados con técnicas como inmunoensayos o ELISA que aún son usadas y están en constante mejoramiento; siendo más rápido y de fácil acceso y aplicaciones médicas.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

- Para efecto de las digestiones, se recomienda usar geles de acrilamida para una mejor resolución y corrida electroforética, debido a que en geles de agarosa se dificulta tipificar.
- Estandarización de las reacciones de PCR en el uso de la Taq Polimerasa.
- La falta de información en las historias médicas dificulta el análisis estadístico, quedando variables sin data y no se puede interpretar de una manera ecuánime los resultados a obtener, pudiendo tener algún tipo de sesgo o robustez en los estadísticos.
- Considerar la naturaleza de la muestra clínica (si presenta NIC I, NIC II, NIC III), en el caso de los tipos de VPH de alto riesgo oncogénico; el genoma viral está integrado y por tanto, es casi imperceptible en una PCR usando MY09/11 pudiendo dar falso negativo por lo que hay que explorar otras variantes de PCR o en su defecto, realizar otra toma de muestra.

Referencias

Aguilar, R. y Campos, J. (2007). Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Virus*, 51(3). 25

Aires, K., Cianciarullo, A., Carneiro, S., Villa, L., Boccardo, E., Pérez-Martinez, G., Perez-Arellano, I., Oliveira, M., y Ho, P. (2006). Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant lactobacillus casei cells. *Applied and environmental microbiology*, 72(1):745–752. 24

Bernard, C., Mougin, C., Laurent, R., y colaboradores (1993). Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. *Cancer detection and prevention*, 18(4):273–282. 15, 24

Bernard, H.-U., Chan, S.-Y., Manos, M. M., Ong, C.-K., Villa, L. L., Delius, H., Peyton, C. L., Bauer, H. M., y Wheeler, C. M. (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Diseases*, 170(5):1077–1085. 42

BioLabs (consultado el 23-10-2016). NEW ENGLAND Bio Labs products. <https://www.neb.com/products/r0620-hpych4v>. 43

Brassard, P., Jiang, Y., Severini, A., Goleski, V., Santos, M., Leamon, A., Chatwood, S., Lys, C., Johnson, G., Wong, T., y colaboradores (2012). Factors associated with human papillomavirus infection among women in the northwest territories. *Can J Public Health*, 103(4):282–287. 24

Cañadas, M., Lloveras, B., Lorincz, A., Ejarque, M., Font, R., Bosch, F., y Sanjosé, S.

- (2006). Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud pública de México*, 48(5):373–378. 31
- Chan, S., Bernard, H., Ong, C., Chan, S.-p., Hofmann, B., y Delius, H. (1992). Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *Journal of virology*, 66(10):5714–5725. 15, 24
- Ciuffo, G. (1907). Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol*, 48(1):12–17. 23
- Collado, R., Montosa, J., y Vizcaíno, M. (2007). *Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero*. Ed. Médica Panamericana. 32, 33
- Conway, M. y Meyers, C. (2009). Replication and assembly of human papillomaviruses. *Journal of dental research*, 88(4):307–317. 23
- Crawford, L. y Crawford, E. (1963). A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology*, 21(2):258–263. 24
- Cruz, J., Quintero, M., Bastidas, M., Quintero, W., Hernández, D., Duque, C., Blanco, N., Rojas, L., Guzmán, R., Solorzano, M., y colaboradores (2015). Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida en la detección y tipificación del virus de papiloma humano. *Rev. obstet. ginecol. Venezuela*, 75(3):172–176. XI, XIII, 25, 34, 35, 43, 44, 45
- De Villiers, E.-M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, 445(1):2–10. XI, 21, 22
- De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H.-U., y Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1):17–27. 15
- Depuydt, C., Boulet, G., Horvath, C., Benoy, I., Vereecken, A., y Bogers, J. (2007). Comparison of my09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(4):881–891. 99

- Ferenczy, A. (1997). Human papillomavirus infections: current concepts, new developments. *Journal SOGC*, 19(4):369–381. 21
- Franco, M. (2013). Características, ventajas y desventajas de la hibridación in situ para la identificación de agentes patógenos. *Revista de Medicina Veterinaria*, (25):63–78. 31
- Gall, J. y Pardue, M. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2):378–383. 31
- Gravitt, P., Peyton, C., Alessi, T., Wheeler, C., Coutlee, F., Hildesheim, A., Schiffman, M., Scott, D., y Apple, R. (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology*, 38(1):357–361. XI, 37
- Guzmán, S., Barboza, O., González, R., y colaboradores (2010). Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina universitaria*, 12(49):231–238. 25
- Hernández, D., Cruz, J., Quintero, M., Bastidas, M., y Puig, J. (2012). Diseño de un sistema de PCR para la detección del virus del papiloma humano mediante el uso de oligonucleótidos degenerados de la región E6. *Rev. obstet. ginecol. Venezuela*, 72(4):249–254. 97
- Howard, M. (2010). El cáncer bucal y su asociación con el virus de papiloma humano. *Revista Científica Odontológica*, 6(2):73–81. 17
- Howley, P. y Lowy, D. (2007). Papillomaviruses, p 2299–2354. *Fields virology, 5th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA*. 23
- Jablonska, S., Dabrowski, J., y Jakubowicz, K. (1972). Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer research*, 32(3):583–589. 24
- John, H., Birnstiel, M., y Jones, K. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. 31

- Lewandowsky, F. y Lutz, W. (1922). Ein fall einer bisher nicht beschriebenen hauterkrankung (epidermodysplasia verruciformis). *Archives of Dermatological Research*, 141(2):193–203. 23
- Lie, A. y Kristensen, G. (2008). Human papillomavirus E6/E7 mrna testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert review of molecular diagnostics*, 8(4):405–415. xi, 19
- Lindh, E., Chua, K.-L., Kataoka, A., Bistoletti, P., Groff, D., y Hjerpe, A. (1992). Detection of human papillomavirus (hpv) using dot blot and southern blot, hybridizing with a mixture of seven probes. *Apmis*, 100(1-6):301–308. 30
- López-Bueno, A., Mavian, C., Labella, A., Castro, D., Borrego, J., Alcamí, A., y Alejo, A. (2016). Concurrence of iridovirus, polyomavirus, and a unique member of a new group of fish papillomaviruses in lymphocystis disease-affected gilthead sea bream. *Journal of Virology*, 90(19):8768–8779. 16
- Lua, L., Connors, N., Sainsbury, F., Chuan, Y., Wibowo, N., y Middelberg, A. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and bioengineering*, 111(3):425–440. 25
- Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J., y colaboradores (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*, volumen 545. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY. 42
- Meisels, A. y Fortin, R. (1977). Condylomatous lesions of the cervix and vagina. i. cytologic patterns. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 32(5):322–324. 24
- Melo, A., Montenegro, S., Hooper, T., Capurro, I., Roa, J., y Roa, I. (2003). Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la ix región-chile. *Revista médica de Chile*, 131(12):1382–1390. 24
- Nazzari, O., Suárez, E., Venegas, M., Larraguibel, R., Rojas, L., Bronda, A., Saavedra, M., y Rojas, J. (2008). Imiquimod en crema al 5% en el tratamiento de verrugas

anogenitales asociadas a VPH: experiencia preliminar. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 73(5):325–329. 16

Olson, C., Pamukcu, A., Brobst, D., Kowalczyk, T., Satter, E., y Price, J. (1959). A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer research*, 19(7):779. 24

Papanicolaou, G. y Traut, H. (1941). The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol*, 42:193–206. 29

Park, J., Namkoong, S., Han, S., Nha, D., Lee, H., y Kim, S. (1993). Comparison of L1 consensus primers with E6 type specific primers for detection of human papillomaviruses in paraffin sections of cervical neoplasia. *Journal of Korean medical science*, 8(1):60–67. 29

Phillips, S., Cornall, A., Machalek, D., Garland, S., Bateson, D., Garefalakis, M., y Tabrizi, S. (2016). Comparison of the roche cobas® 4800 HPV assay to roche amplicor for detection of high-risk human papillomavirus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, pp. 1–3. 29

Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C., Ho, G., Klein, R., y Burk, R. (1997). PCR detection of human papillomavirus: comparison between my09/my11 and gp5+/gp6+ primer systems. *Journal of clinical microbiology*, 35(6):1304–1310. 86, 99

Quintero, M., Cruz, J., Bastidas, M., Márquez, L., y Puig, J. (2008). Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Obstetricia y Ginecología*, 68(1):25–31. 25, 34, 35, 42, 88, 92, 98, 101

Rebolledo, M., Arango, H., Rebolledo, R., y Alonsos, I. (2016). Rol del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinoma oral: una revisión. *Avances en Odontoestomatología*, 32(3):135–144. 16

Richards, R., Lowy, D., Schiller, J., y Day, P. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, l2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5):1522–1527. 22

- Rodríguez, N. y Barrios, M. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas*, volumen 85. Laboratorio de Ingeniería Genética, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela. 33, 34
- Rous, P. y Beard, J. (1935a). Carcinomatous changes in virus-induced papillomas of the skin of the rabbit. *Experimental Biology and Medicine*, 32(4):578–580. 23
- Rous, P. y Beard, J. (1935b). The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (shope). *The Journal of experimental medicine*, 62(4):523–548. 23
- Rous, P. y Kidd, J. G. (1938). The carcinogenic effect of a papilloma virus on the tarred skin of rabbits i. description of phenomenon. *The Journal of experimental medicine*, 67(3):399–428. 23
- Saiki, R., Bugawan, T., Horn, G., Mullis, K., y Erlich, H. (1986). Analysis of enzymatically amplified β -globin and hla-dq α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324(6093):163–166. 41, 49
- Sasagawa, T., Minemoto, Y., Basha, W., Yamazaki, H., Nakamura, M., Yoshimoto, H., Sakaike, J., e Inoue, M. (2000). A new PCR-based assay amplifies the E6–E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus research*, 67(2):127–139. 98
- Shope, R. y Hurst, E. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits with a note on the histopathology. *The Journal of experimental medicine*, 58(5):607–624. 23
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., y Bültmann, B. (2004). Detection and typing of human papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42:3176–3184. XI, XIII, 20, 22, 25, 35, 40, 41, 46, 47, 67, 86, 97, 98, 99
- Southern, E. (2006). Southern blotting. *Nature protocols*, 1(2):518–525. 30
- Strauss, M. J., Shaw, E. W., Bunting, H., y Melnick, J. L. (1949). “crystalline” virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Experimental Biology and Medicine*, 72(1):46–50. 24

- Syrjänen, S. y Syrjänen, K. (2008). The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health*, 16(suppl):S7–S13. XIII, 26, 27, 28
- Thappa, D., Chiramel, M., y colaboradores (2016). Evolving role of immunotherapy in the treatment of refractory warts. *Indian Dermatology Online Journal*, 7(5):364. 24
- Trudy Watt, Robin McCleery, T. (2007). *Introduction to Statistics for Biology, Third Edition*, volumen 1 de 1. Chapman and Hall/CRC, The address, 3 edición. An optional note. 100
- Van Damme, P., Bonanni, P., Bosch, F., Joura, E., Kjaer, S. K., Meijer, C. J., Petry, K.-U., Soubeyrand, B., Verstraeten, T., y Stanley, M. (2016). Use of the nonavalent HPV vaccine in individuals previously fully or partially vaccinated with bivalent or quadrivalent HPV vaccines. *Vaccine*, 34(6):757–761. 28
- Westra, T., Stirbu-Wagner, I., Dorsman, S., Tutuhatumewa, E., de Vrij, E., Nijman, H., Daemen, T., Wilschut, J., y Postma, M. (2013). Inclusion of the benefits of enhanced cross-protection against cervical cancer and prevention of genital warts in the cost-effectiveness analysis of human papillomavirus vaccination in the netherlands. *BMC infectious diseases*, 13(1):1. 25
- Zamudio, A., Zepeda, J., Rodríguez, B., y Tenorio, F. (2001). Evaluación del papanicolalou y la colposcopia en el diagnóstico de la infección por el virus del papiloma humano. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 44(1):5–7. 29, 30
- Zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research*, 36(2 Part 2):794–794. 24
- Zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1288(2):F55–F78. XIII, 17, 18, 24, 25, 92, 97
- Zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., y Bornkamm, G. W. (1974). Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. i. nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *International Journal of Cancer*, 13(5):650–656. 24