

Tesis doctoral

**Detección e Identificación de los
Virus del Papiloma Humano.
Caracterización de dos nuevas variantes**

Juan Diego Arroyo Andújar

2015

Universitat Autònoma de Barcelona
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias

**“Detección e Identificación de los
Virus del Papiloma Humano.
Caracterización de dos nuevas variantes”**

Memoria presentada por **Juan Diego Arroyo Andújar** para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Jordi Gómez Castilla**, y la tutoría de la **Dra. Victòria Noguès**.

2015

Jordi Gómez Castilla, investigador de Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA: que la tesis doctoral "**Detección e identificación de los virus del papiloma humano. Caracterización de dos nuevas variantes**", presentada por Juan Diego Arroyo Andújar para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas, se ha realizado bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para ser defendida delante del Tribunal de Evaluación correspondiente.

Dr. Jordi Gómez Castilla

Barcelona, 19 de mayo de 2015

Maria Victòria Nogués Bara, profesora del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)

CERTIFICA: que la tesis doctoral "**Detección e identificación de los virus del papiloma humano. Caracterización de dos nuevas variantes**", presentada por Juan Diego Arroyo Andújar para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas, se ha realizado bajo mi tutoría y cumple los requisitos necesarios para ser defendida delante del Tribunal de Evaluación correspondiente.

Dra. Maria Victòria Nogués Bara

Barcelona, 22 de mayo de 2015

Memoria presentada por **Juan Diego Arroyo Andújar** con el título "**Detección e identificación de los virus del papiloma humano. Caracterización de dos nuevas variantes**", para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas .

Juan Diego Arroyo Andujar

Barcelona, 19 de mayo de 2015

A Azu, Inés y Elías

Agradecimientos

Al Dr. Jordi Gómez Castilla por haber aceptado la dirección de esta tesis doctoral, por todo lo que he aprendido bajo su dirección y por su amistad.

A la Dra. Blanca San Segundo de los Mozos por haberme dado la oportunidad de trabajar en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Biología Molecular de Barcelona perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Gracias a esa oportunidad, hoy la biología molecular es para mí algo más que una forma de vida. Es una forma de pensar.

Al Dr. Ramon Eritja por haberme acogido durante dos años en su laboratorio, por haberme iniciado en la química de los oligonucleótidos y por ser una persona excelente.

Al Dr. Jordi García Más por haberme ayudado a dar mis primeros pasos en la biología molecular y por los grandes momentos que hemos pasado juntos.

Al Dr. Xavier Susanna por la enorme influencia que ha ejercido en mi vida profesional y por la apuesta que hizo que por mí. Esta tesis doctoral no existiría si no fuera por él.

Al Dr. Pere Puigdomènech por su enorme contribución al impulso de la biología molecular en España.

A todo el personal de la compañía Progenie molecular, por su ayuda en tareas técnicas y documentales. Especialmente a Rosa Bermejo, Marga Edo, Diana Corella, Ana Rodrigo Martínez, Paula Olivares y Nuria Villena.

A todo el personal del departamento de Genética Molecular del Instituto de Biología Molecular de Barcelona, porque aprendí un poco de casi todos (y de algunos muchísimo). Especialmente a la Dra. Isabel Murillo, Dra. Verónica Godoy, Juanma Bravo, Laura Cavallarín, Dra. Beatriz García de la Torre y Dra. Salomé Prats.

A la Dra Victòria Noguès, tutora de esta tesis doctoral, por su asesoramiento e inestimable ayuda para una rápida presentación de este trabajo.

A mis padres, por su apoyo y confianza durante estos años.

Abreviaturas

5-FU	5-Fluorouracilo
A ₂₆₀ , A ₂₈₀	medidas de la absorvancia a 260 nm y 280 nm respectivamente
aa	aminoácido
ACS	Sociedad Americana del Cáncer (<i>American Cancer Society</i>)
ADN o DNA	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGUS	Atipia de células glandulares de significado incierto
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ALTS	ASCUS/LSIL Triage Study
ARN o RNA	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
ASCUS	Atipia de células escamosas de significado incierto
BrEt	bromuro de etidio
BSA	albúmina de suero bovino
°C	centígrados
CHIC	<i>Competitive Heterologous Internal Control</i>
CI	control interno
CIN	Neoplasia cervical intraepitelial
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
c/u	cada uno (p.e. cada nucleótido)
di-S	punteo disulfuro
DNAsa	desoxirribonucleasa
dNTP	mezcla equimolar de los 4 nucleótidos dATP, dTTP, dCTP y dGTP
dsDNA	DNA doble cadena
D.O.	unidad de densidad óptica
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitolo
E1... E8	Regiones de expresión temprana de los VPHs
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
FDA	<i>food and drugs administration</i>
FN	falsos negativos
GCG	<i>Genetics Computer Group</i>
h	hora
H ₂ O	agua
HCl	cloruro sódico
HPA	<i>hybridization protection assay</i>
HSIL	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
Kb	Kilobase
KCl	cloruro potásico
L1, L2	Regiones de expresión tardía de los VPHs
LCR	Región de control de la expresión de los genes de VPHs
LSIL	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
min	Minutos
MgCl ₂	cloruro de magnesio
mM	milimolar
mL	mililitros
MW	marcador de peso molecular
μM	micromolar
μL	microlitros
NaCl	cloruro sódico
NIH	National Institutes of Health (Instituto Nacional de Salud)
nM	nanomolar

nt	nucleótido
ORF	marco abierto de lectura (open reading frame)
OR	<i>odds ratio</i>
p53	proteína supresora de tumor p53
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polimerase chain reaction</i> (reacción de polimerización en cadena)
Rb	proteína supresora de tumor Rb (descubierto en retinoblastoma)
RFLP	análisis de fragmentos de restricción
RNAse	ribonucleasa
RNAsin	Inhibidor de ribonucleasas
rpm	revoluciones por minuto
SDS	sulfato dodecil sódico
seg	segundos
SEGO	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
SIL	Lesión escamosa intraepitelial
SSC	<i>standard saline concentration</i>
ssDNA	DNA monocadena
ta	temperatura ambiente
Taq DNA pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris, borato y EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TMA	<i>transcription-mediated amplification</i>
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	unidades enzimáticas
UV	luz ultravioleta
V	Voltios
VHB	Virus de la hepatitis B
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VP	verdaderos positivos
VLP	partículas semejantes a virus (virus like particles)
VPH	virus del papiloma humano o papilomavirus

Introducción

1 Virus del Papiloma Humano

- 1.1 Familia *Papillomaviridae*
- 1.2 Virión de los papilomavirus
- 1.3 Organización del material genético
- 1.4 Ciclo vírico
- 1.5 Pluralidad de los Papilomavirus Humanos
 - 1.5.1 Definición de especie, tipo, subtipo y variante de papilomavirus
 - 1.5.2 Caracterización de nuevas variantes
 - 1.5.3 Clasificación de los papilomavirus por criterio combinado tropismo / clínica
 - 1.5.4 Clasificación filogenética de los papilomavirus

2 Infecciones causadas por VPH mucosotrópicos y cutáneos

- 2.1 Tejidos susceptibles de infección por papilomavirus: Epitelios de Piel y Mucosas
 - 2.1.1 Organización de los tejidos epiteliales
 - 2.1.2 Mucosas
 - 2.1.3 Localización anatómica de las lesiones provocadas por papilomavirus
- 2.2 Cérvix o cuello del útero
- 2.3 Lesiones cancerosas y precancerosas del cuello del útero
 - 2.3.1 Lesiones intraepiteliales cervicales
 - 2.3.2 Carcinoma invasor de cérvix
- 2.4 Papel de los papilomavirus en la transformación neoplásica
 - 2.4.1 Infección por papilomavirus del tracto genital femenino
 - 2.4.2 Factores víricos
 - a) Tipo vírico
 - b) Persistencia vírica
 - 2.4.3. Mecanismo de la transformación neoplásica
 - a) Papel de los genes E6 y E7
 - b) Papel del gen E2
 - c) Mecanismo de integración en el genoma humano

3 Epidemiología

4 Factores de riesgo para las lesiones cervicales

5 Otras patologías asociadas a los Papilomavirus

- 5.1 Verrugas
- 5.2 Condilomas
- 5.3 Epidermodisplasia verruciforme
- 5.4 Enfermedad de Bowen
- 5.5 Papulosis bowenoide
- 5.6 Queratosis actínica
- 5.7 Enfermedad de Buschke-Löwenstein

6 Diagnóstico de las lesiones cervicales

- 6.1 Algoritmos de cribado y de diagnóstico de las lesiones cervicales
- 6.2 Exploración visual y colposcopia
- 6.3 Diagnóstico citológico (pueba de Papanicolau) e histopatológico

7 Métodos de detección e identificación de papilomavirus

- 7.1 Métodos basados en la PCR convencional genérica asociada a un sistema de identificación de VPHs
 - 7.1.1 Amplificación de secuencias consenso de los papilomavirus
 - 7.1.2 Caracterización de los productos de amplificación
- 7.2 Métodos basados en PCR a tiempo real

- 7.3 Métodos basados en la detección del ARN de E6 y E7
- 7.4 Hibridación en solución y captura de híbridos ADN-ARN

8 Control Interno de amplificación en la PCR

- 8.1 Falsos negativos y positivos en la PCR
- 8.2 Utilidad de un control interno de amplificación

Objetivos

Materiales y Métodos

1 Material biológico

- 1.1 Muestras genitales, orales y anales
- 1.2 Muestra de ADN genómico humano
- 1.3 Control standard de VPH16

2 Secuencias de referencia de papilomavirus

3 Extracción y purificación de ADN

- 3.1 Extracción de ADN vírico a partir de escobillones cervicales
- 3.2 Extracción de ADN vírico a partir de tejido parafinado
- 3.3 Extracción de ADN vírico a partir de células cervicales resuspendidas en tampón de citología líquida
- 3.4 Extracción de ADN vírico a partir de orina
- 3.5 Extracción de ADN genómico humano a partir de sangre
- 3.6 Purificación de ADN plasmídico a partir de un cultivo de E.coli
- 3.7 Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa
- 3.8 Purificación de los productos de amplificación

4 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- 4.1 Reactivos
- 4.2 Mezclas de amplificación
- 4.3 Perfiles térmicos

5 Métodos de análisis de ácidos nucleicos

- 5.1 Cálculo de la concentración de ADN por espectrofotometría
- 5.2 Cuantificación y preparación de ADN plasmídico por espectrofotometría
- 5.3 Análisis electroforético en gel de agarosa
- 5.4 Cuantificación de los fragmentos de ADN purificados para secuenciación

6 Digestión con enzimas de restricción

7 Cálculo de la sensibilidad de la reacción de detección de papilomavirus

8 Secuenciación de ADN

- 8.1 Reacción de secuenciación
- 8.2 Purificación de la reacción de secuencia
- 8.3 Análisis comparativo y filogenético de secuencias de ADN

9 Bioinformática

- 9.1 Aplicaciones de bioinformática utilizadas
- 9.2 Direcciones de Internet para la búsqueda de secuencias, bibliografía e información

Resultados

Capítulo 1. Desarrollo de un sistema de detección e identificación de VPHs

- 1.1 Comprobación de la vigencia del par de cebadores MY11 y MY09 para la detección genérica de papilomavirus

mucosotrópicos

- 1.1.1 Alineamiento de los genomas completos de tipos de referencia
- 1.1.2 Alineamiento de las secuencias del ORF L1 de Papilomavirus mucosotrópicos
- 1.2 Detección de papilomavirus en las mucosas genitales mediante PCR
 - 1) Temperatura de hibridación (*annealing*)
 - 2) Concentración óptima de MgCl₂
 - 3) Utilización de aditivos en la reacción de PCR: DMSO y Tween-20™
- 1.3 Análisis de los productos de amplificación de diferentes tipos de papilomavirus
- 1.4 Identificación de papilomavirus mediante *RFLPs*
 - 1.4.1 Mapas de restricción de los fragmentos MY11/MY09
 - 1.4.2 Patrones de restricción del fragmento MY11/MY09 de los VPHs mucosotrópicos
 - 1.4.3 Análisis de los fragmentos de restricción del producto de amplificación MY11/MY09 con *Rsa* I
 - 1.4.4 Análisis de los fragmentos de restricción del producto de amplificación MY11/MY09 con *Alu* I + *Hae* III
- 1.5 Desarrollo de un sistema de control Interno de amplificación (Tecnología *CHIC*®)
 - 1.5.1 Diseño del control interno de amplificación
 - 1.5.2 Obtención de la construcción MY11-CFTR-MY09 utilizada como molde para el CI
 - 1.5.3 Utilización del control interno de amplificación en la detección de papilomavirus
 - 1.5.4 Competencia entre el control interno y los VPHs: concentración óptima del CI
- 1.6 Utilización del método para la identificación de VPHs en muestras clínicas
- 1.7 Sensibilidad, límite de detección y especificidad
- 1.8 Marcado CE-IVD, denominación comercial y uso comercial del método

Capítulo 2. Resultados obtenidos en el estudio de muestras clínicas (período 2003-2010)

- 2.1 Muestras clínicas analizadas
- 2.2 Detección de papilomavirus en las muestras analizadas
- 2.3 Distribución de los diferentes genotipos de papilomavirus
- 2.4 Relación entre el tipo vírico y las lesiones en la mucosa genital femenina
- 2.5 Relación entre los papilomavirus y la edad en las mujeres

Capítulo 3. Caracterización de dos nuevas variantes de papilomavirus

- 3.1. Identificación de un nuevo papilomavirus (aislado A0383)
 - 3.1.1 Caso clínico
 - 3.1.2 Análisis de la muestra con referencia A0383 con el método descrito
 - 3.1.3 Estudio de la variante A0383 mediante secuenciación
 - 1) Obtención de fragmentos solapados del genoma de A0383 mediante PCR
 - 2) Secuencia completa de la variante A0383
 - 3) Descripción de las regiones del genoma vírico
 - 4) Análisis de similitud con otros tipos víricos
 - 5) Estudio filogenético de la variante A0383
- 3.2 Identificación de un nuevo papilomavirus (variante E1201)
 - 3.2.1 Caso clínico
 - 3.2.2 Análisis de la muestra con referencia E1201 con el método descrito
 - 3.2.3 Estudio de la variante E1201 mediante secuenciación
 - 1) Obtención de fragmentos solapados del genoma de E1201 mediante PCR
 - 2) Secuencia completa de la variante E1201
 - 3) Descripción de las regiones del genoma vírico
 - 4) Análisis de similitud con otros tipos víricos
 - 5) Estudio filogenético de la variante E1201

Discusión

1 Desarrollo de un nuevo sistema de detección e identificación de papilomavirus

- 1.1 Motivación para el desarrollo de un método de identificación de papilomavirus
- 1.2 Utilización de una PCR consenso para la detección de papilomavirus
- 1.3 Genotipado mediante el análisis de fragmentos de restricción (*RFLPs*)

- 1) Compatibilidad entre los tampones de restricción y el tampón de PCR
- 2) Temperatura óptima de digestión
- 3) Pérdida de especificidad de las endonucleasas en condiciones "no óptimas"
- 1.4 Construcción de los mapas y patrones de restricción del fragmento MY11/MY09
- 1.5 Control interno de amplificación
 - 1.5.1 Utilidad del control interno de amplificación en la detección de papilomavirus
 - 1.5.2 Utilización de ADN exógeno vs ADN genómico humano como molde para el CI
 - 1.5.3 Introducción del ADN exógeno en la mezcla de amplificación vs protocolo de purificación de ADN de la muestra
 - 1.5.4 Utilización de un ADN exógeno "heterólogo competitivo" vs ADN exógeno "estándar" como molde del CI
 - 1.5.5 Obtención del molde para el CI mediante PCR vs clonación
 - 1.5.6 Identificación de papilomavirus utilizando el control interno de amplificación
- 1.6 Valoración de la vigencia del método descrito

2. Resultados obtenidos en el estudio de muestras clínicas (período 2003-2010)

- 2.1 Estadísticas obtenidas con la utilización del sistema descrito en el presente trabajo
- 2.2 Relación entre el tipo vírico y la gravedad de la lesión
- 2.3 Relación entre los papilomavirus y la edad

3 Caracterización de dos nuevos aislados

Conclusiones

Bibliografía

Índice de figuras

- Figura 1. Virión de los papilomavirus.
- Figura 2. Distribución de los ORFs en el genoma de 8 papilomavirus humanos.
- Figura 3. Ciclo vírico de un papilomavirus.
- Figura 4. Árbol filogenético basado en la secuencia del ORF L1 de 189 papilomavirus.
- Figura 5. Diferente organización de los tejidos epiteliales.
- Figura 6. Epitelio estratificado escamoso de la mucosa vaginal.
- Figura 7. Anatomía del aparato genital femenino.
- Figura 8. Localización de los diferentes tipos de epitelio del cérvix.
- Figura 9. Diagrama representativo de la evolución de una lesión intraepitelial.
- Figura 10. Formas de propagación del cáncer de cuello de útero.
- Figura 11. Riesgo relativo de las lesiones cervicales según el grupo de riesgo.
- Figura 12. Riesgo específico de las lesiones cervicales según el tipo vírico.
- Figura 13. Curso teórico de la infección aguda y persistente.
- Figura 14. Productos génicos implicados en la transformación neoplásica.
- Figura 15. Frecuencia de portadoras de Papilomavirus en función del grado de la lesión.
- Figura 16. Frecuencia de la infección por papilomavirus y del cáncer en función de la edad.
- Figura 17. Condiloma de exocérnix.
- Figura 18. Condilomas vulvares visualizados mediante el test del ácido acético.
- Figura 19. Condiloma acuminado en la cavidad prepucial.
- Figura 20. Verrugas de carnicero asociadas a VPH7.
- Figura 21. Papiloma en el ojo.
- Figura 22. Papiloma oral.
- Figura 23. Tumor Buschke-Löwenstein.
- Figura 24. Papulosis bowenoide en el glande.
- Figura 25. Algoritmo de cribado y de diagnóstico/terapéutico recomendado para la prevención del cáncer cervical.
- Figura 26. Células exfoliadas de un tejido cervical sano (tinción de Papanicolaou x250).
- Figura 27. Lesión cervical asociada a VPHs (tinción de Papanicolaou 200x).
- Figura 28. Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL) (Citología Líquida, 60X).
- Figura 29. Hibridación inversa (*reverse-blot*).
- Figura 30. Captura de híbridos.
- Figura 31. Procedimiento para la obtención de las réplicas de las diferentes diluciones del control positivo de VPH para calcular el límite de detección.
- Figura 32. Similitudes de secuencia entre las regiones del genoma de los papilomavirus mucosotrópicos 6, 16, 18, 26, 32, 34, 40, 53, 54, 61, 90, 101 y 112.
- Figura 33. Alineamiento de las secuencias del ORF L1 de los tipos representativos de 13 especies de papilomavirus mucosotrópicos.
- Figura 34. Ensayo para la determinación de la temperatura óptima de hibridación para la obtención del producto de amplificación comprendido entre los oligos MY11-MY09 mediante PCR.
- Figura 35. Ensayo para la determinación de la concentración óptima de MgCl₂.
- Figura 36. Análisis electroforético de los productos de amplificación MY11-MY09, obtenidos a partir del ADN de diferentes Papilomavirus.
- Figura 37. Esquema de las digestiones enzimáticas del fragmento MY11-MY09 llevadas a cabo para la identificación del genotipo de VPH presente en muestras clínicas mediante análisis del tamaño de los fragmentos de restricción.
- Figura 38. Sitios de restricción de las enzimas empleadas en el presente sistema en el amplicón MY11-MY09.
- Figura 39. Patrones de restricción del amplicón MY11-MY09.
- Figura 40. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos mediante digestión del producto de amplificación MY11/MY09 (450 pb) con la enzima *Rsa*I.
- Figura 41. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos mediante digestión del producto de amplificación MY11/MY09 (450 pb) con la enzima *Rsa*I.
- Figura 42. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos mediante digestión del producto de amplificación MY11/MY09 (450 pb) con las enzimas *Alu*I y *Hae*III simultáneamente.
- Figura 43. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el producto de

amplificación MY11/MY09 (450 pb) con las enzimas *Afu*I y *Hae*III simultáneamente.

Figura 44. Esquema de la preparación mediante PCR de la construcción de ADN heterólogo utilizado como molde del control interno.

Figura 45. Análisis electroforético del producto de amplificación obtenido utilizando los oligonucleótidos heterólogos MY11FQ y MY09FQ, y como molde ADN genómico humano.

Figura 46. Esquema de la co-amplificación del fragmento específico de papilomavirus y del CI.

Figura 47. Análisis electroforético de los productos de amplificación de una serie de muestras portadoras y no portadoras de papilomavirus.

Figura 48. Análisis electroforético de los productos de amplificación de una muestra portadora de VPH 16 en presencia de una dilución seriada del control interno.

Figura 49 Análisis electroforético de las digestiones enzimáticas para la identificación de los diferentes genotipos víricos de acuerdo con el método descrito en el apartado 1.4.1 y la figura 36.

Figura 50. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el producto de amplificación MY11-MY09 de la serie original que incluyó la muestra A0383.

Figura 51: Esquema de la amplificación y secuenciación del genoma completo de la nueva variante A0383.

Figura 52. Árbol filogenético de la variante A0383 junto a 48 papilomavirus mucosotrópicos ya caracterizados obtenido gracias al programa TreeView.

Figura 53. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el fragmento de ADN amplificado con la pareja de oligonucleótidos MY11/MY09.

Figura 54. Esquema de la amplificación y secuenciación del genoma completo de la nueva variante E1201.

Figura 55. Árbol filogenético de la variante E1201 junto a 49 papilomavirus mucosotrópicos ya caracterizados obtenido gracias al programa TreeView.

Índice de tablas

- Tabla 1. Tabla resumen de la longitud aproximada y principales funciones de cada ORF.
- Tabla 2. Criterio para definir *especie*, *tipo*, *subtipo* y *variante* de papilomavirus.
- Tabla 3. Clasificación de los papilomavirus humanos en función del tropismo celular y de aspectos clínicos.
- Tabla 4. Clasificación filogenética de los papilomavirus humanos basada en Hans-Ulrich *et al.*, 2010, en géneros y especies y observaciones según su tropismo, riesgo y asociación.
- Tabla 5. Equivalencias entre la denominación tradicional de las displasias, la clasificación CIN I-III y la clasificación establecida por el sistema Bethesda (SIL).
- Tabla 6. Oligonucleótidos genéricos utilizados como iniciadores de la PCR para la detección de papilomavirus en muestras clínicas.
- Tabla 7. Sistemas comerciales más utilizados para la detección e identificación de papilomavirus en muestras clínicas.
- Tabla 8. Inhibidores de la PCR presentes en la muestra clínica o añadidos durante su procesamiento.
- Tabla 9. Números de acceso de las secuencias de los Papilomavirus.
- Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la detección de papilomavirus..
- Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón MY11-FQ-MY09 (molde del control interno)
- Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del genoma completo de la variante A0383
- Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del genoma completo de la variante E1201.
- Tabla 14. Composición estándar de las mezclas de amplificación utilizadas.
- Tabla 15. Mezcla de reacción para la amplificación del fragmento MY11-MY09 de papilomavirus utilizando el control interno.
- Tabla 16. Composición de la mezcla de amplificación utilizada para los fragmentos mayores de 500 pb.
- Tabla 17. Marcadores de peso molecular utilizados en el presente trabajo, su aplicación y tamaños que abarca.
- Tabla 18. Fragmentos de restricción que se obtienen a partir de la región comprendida entre los oligonucleótidos MY11 y MY09 de los diferentes papilomavirus analizados.
- Tabla 19. Resultados obtenidos para determinar el límite de detección del método de detección de VPHs.
- Tabla 20. Total de muestras analizadas desde 2003 a 2010 con el presente sistema de identificación de VPHs.
- Tabla 21. Total de muestras analizadas con el presente sistema desde 2003 a 2010.
- Tabla 22. Frecuencia de muestras portadoras de cada tipo de papilomavirus mucosotrópico detectado en el periodo de tiempo comprendido entre 2003 y 2010 en muestras que provenían de diferentes centros de España.
- Tabla 23. Resumen de las muestras de mujeres utilizadas para estudiar la relación el tipo vírico y los datos clínicos de las mujeres con patología genital.
- Tabla 24. Muestras positivas y negativas en relación a los datos clínicos conocidos.
- Tabla 25. Frecuencia de los diferentes tipos de papilomavirus dependiendo de los datos clínicos conocidos.
- Tabla 26. Frecuencia de los papilomavirus de alto y los de bajo riesgo, en relación a los datos clínicos conocidos.
- Tabla 27. Frecuencia de los papilomavirus de alto y los de bajo riesgo, en relación a los datos clínicos conocidos, agrupando las lesiones de bajo riesgo y las dudosas por un lado, y las de alto riesgo y post-tratamiento por otro.
- Tabla 28. Relación entre la detección de papilomavirus y la edad.
- Tabla 29. Distribución de tipos de papilomavirus en función de la edad de las muestras.
- Tabla 30. Tamaño y posición de los ORFs del VPH72 y la variante A0383.
- Tabla 31. Similitud de la variante A0383 con los papilomavirus más próximos.
- Tabla 32. Tamaño y posición de los ORFs del VPH86 y la variante E1201.
- Tabla 33. Similitud (%) de la variante E1201 con los virus del papiloma más próximos.
- Tabla 34. Ventajas e inconvenientes de la utilización del análisis de los fragmentos de restricción como método de identificación de papilomavirus.
- Tabla 35. Enzimas de restricción pre-seleccionadas para ser utilizadas en el método de genotipado de papilomavirus mediante RFLPs.

Introducción

1 Virus del Papiloma Humano

1.1 Familia *Papillomaviridae*

Desde el 7º informe del Comité Internacional de Taxonomía Viral (*7th Report of the ICTV*) los virus del papiloma pertenecen a la nueva familia *Papillomaviridae* (van Regenmortel *et al.*, 2002).

1.2 Virión de los papilomavirus

El virión maduro de los papilomavirus presenta una pequeña cápside icosaédrica de 55 nm de diámetro, de naturaleza exclusivamente proteica (figura 1A), formada por 72 capsómeros de 2 tipos (Finch y Klug, 1965): los capsómeros que recubren las caras y aristas del icosaedro (hexavalentes) y los capsómeros de los vértices (pentavalentes) (figura 1B).

El análisis de las proteínas de la cápside, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, muestra que está compuesta por al menos 2 proteínas estructurales. Una proteína con un peso molecular 53-59 KD que representa el 80% de la proteína vírica total (Favre *et al.*, 1975a) y otra proteína con un peso molecular de 70 KD que constituye el componente minoritario de la cápside.

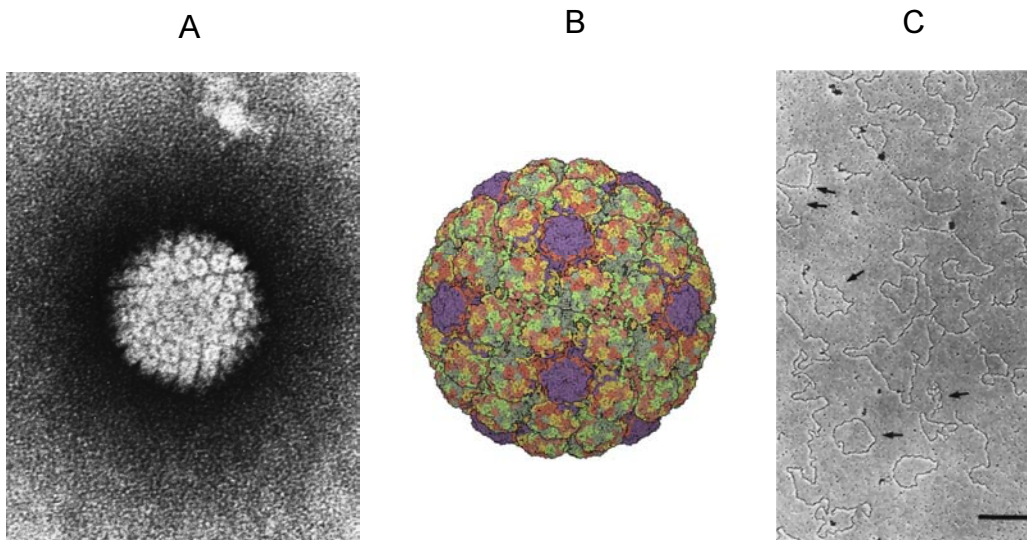


Figura 1. Virión de los papilomavirus. A: Micrografía electrónica del virión del papiloma. Tomado de *NIH-Visuals Online#AV-8610-3067*; B: Reconstrucción tridimensional de la partícula vírica. Pueden observarse los capsómeros pentavalentes correspondientes a la proteína minoritaria L2 (en púrpura) y los hexavalentes (resto de los capsómeros) correspondientes a la proteína mayoritaria L1. Tomado de Modis *et al.* (2002). C: Micrografía electrónica de moléculas de ADN de papilomavirus (señaladas con flechas). Se han incluido moléculas circulares de ADN como marcador de tamaño. Tomado de *Genitoanal Papilloma Virus Infection* (von Krogh y Rylander).

1.3 Organización del material genético

El material genético consiste en una molécula circular de ADN de doble cadena, de aproximadamente 8.000 pb (figura 1C).

Actualmente se conoce la secuencia completa del genoma de la mayoría de los papilomavirus humanos y animales. La organización general del genoma es muy parecida en todos los tipos. Todas las secuencias potencialmente codificadoras de proteínas (ORF -*Open Reading Frames*- o marcos abiertos de lectura) se localizan en una de las dos cadenas del ADN. La mayor parte de los ORFs ocupan posiciones relativas similares, y no difieren demasiado en longitud.

Los ORFs se han clasificado en 2 grupos: **ORFs E** (tempranos -*early*-) y **ORFs L** (tardíos -*late*-). La mayoría de los genes E se expresan en las primeras etapas del ciclo vírico, mientras que los genes L suelen hacerlo en las etapas finales. Los genes E y L están dispuestos en dos bloques separados por una región no codificante.

La mayoría de los ORFs no corresponden exactamente con una proteína. La transcripción del ARNm es un mecanismo muy complejo y particular de cada tipo vírico. Suelen generarse varios transcritos mono-, bi- o policistrónicos, que incluyen segmentos de varios ORFs en combinaciones aparentemente arbitrarias. El producto inicial de la transcripción está sujeto a empalmes (*splicing*) que dan lugar a varios productos génicos híbridos, provenientes de más de un ORF. Asimismo, algunos ORFs codifican segmentos para más de una proteína.

REGIÓN	LONGITUD APROX.	FUNCIÓN	OBSERVACIONES
E1	2.000 pb	Función ATPasa y 3'-5' helicasa. Relacionado indirectamente con la inmortalización celular en VPH16.	Codifica para proteína de 67,5 a 76,2 kDa. ORF bastante conservado entre los diferentes tipos de papilomavirus. Expresión tardía, dando lugar a un ARN policistrónico compuesto por los ORFs E1 y E4. Es el ARN vírico más abundante
E2	1.100 pb	Se divide en 3 dominios funcionales que regulan la transcripción y replicación del ADN viral. La proteína completa E2: activa los promotores virales mediante unión de elementos de respuesta. En VPH16 y VPH18, E2 suprime los promotores de transcripción de las proteínas E6 y E7. Cuando el VPH se integra en los cromosomas del huésped, la integridad de E2 varía y se sobreexpresan E6 y E7.	Proteína de aproximadamente 45 kDa. La función de la proteína E2 está reprimida por otras dos proteínas E2: el represor transcripcional E2 (E2TR) y el represor transcripcional E8/E2 (E8/E2TR).
E3	300 pb	No se conoce si este ORF es traducido.	Existe solo en BPV1, BPV2, EEPV y BPV4.

E4	300 pb	Inactivación de la citoqueratina. E1-E4 de VPH16 causa arresto en la fase G2 del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1-E4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo celular. E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas.	Secuencia codificante contenida dentro del marco de lectura de E2. Proteína de aproximadamente 10 a 44kDa. Se expresa a partir de un ARNm procesado (E1-E4) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral.
E5	230-250 pb	Proteína de membrana que interacciona con los receptores del factor de crecimiento, estimulando la división celular y la proliferación de las células infectadas. Involucrada en la interrupción de mecanismos de comunicación celular en VPH16, inhibiendo la acidificación de los endosomas. Podría disminuir el reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados interrumpiendo la función de las proteínas MHC clase II.	Codifica para proteína de aproximadamente 14kDa. Proteína de membrana e hidrofóbica. Uno de los ORFs más pobremente conservados. Puede expresarse como un ORF único o junto a los ORFs E1-E4 en un ARN policistrónico.
E6	450-500 pb	Proteína de transformación celular y de unión al ADN. En VPH16 es suficiente, junto con E7 para transformar e inmortalizar a las células epiteliales escamosas huéspedes. Altera el ambiente celular inhibiendo la función de p53 mediante su degradación por la vía de la ubiquitina.	Codifica para proteína de 16-18 kDa. E6 y E7 codifican para un único ARN mensajero bicistrónico que se traduce en dos pautas de lectura distintas. Expresión temprana.
E7	300-320 pb	Proteína transformadora relacionada con la integración del genoma vírico en el ADN de la célula huésped y el establecimiento de un alto número de copias en las células infectadas persistentemente. Se une a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB., que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular.	Codifica para proteína de aproximadamente 10kDa.
E8	200 pb	Proteína análoga al ORF E6, el cual no está presente en estos VPs. En BPVI involucrado con la regulación transcripcional mediante represión de la transcripción de E2.	Existe sólo en papilomavirus bovinos y en HPV6b.
L1	1.700 pb	Proteína mayoritaria de la cápside, función principalmente estructural. El extremo carboxi terminal es el sitio de señales de localización celular.	Codifica para proteína de aproximadamente 57 kDa. Proteína mayoritaria que conforma cerca del 80% de la cápside. Región mayor conservada entre los diferentes tipos de VPs.
L2	1.400 pb	Función de interacción virus-célula. Interacción con proteínas citoplasmáticas de la célula epitelial. Modulación del ciclo viral y la persistencia de la infección.	Codifica para proteína de 43 a 53 kDa. Proteína minoritaria de la cápside, se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamblaje del virus y atrae a L1 hacia estos dominios.
LCR	800-1.000 pb	Contiene varios motivos de regulación de la replicación y la transcripción vírica. Contiene sitios de unión de factores de transcripción y elementos del promotor de la ADN polimerasa. Contiene el origen de replicación.	Tamaño y secuencia muy variable entre los diferentes aislados. No contiene secuencias codificantes. Se divide en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o enhancer y la región más alejada del 5'. Algunos VPs contienen pequeños ORFs integrados en la región LCR.

Tabla 1. Tabla resumen de la longitud aproximada y principales funciones de cada ORF.

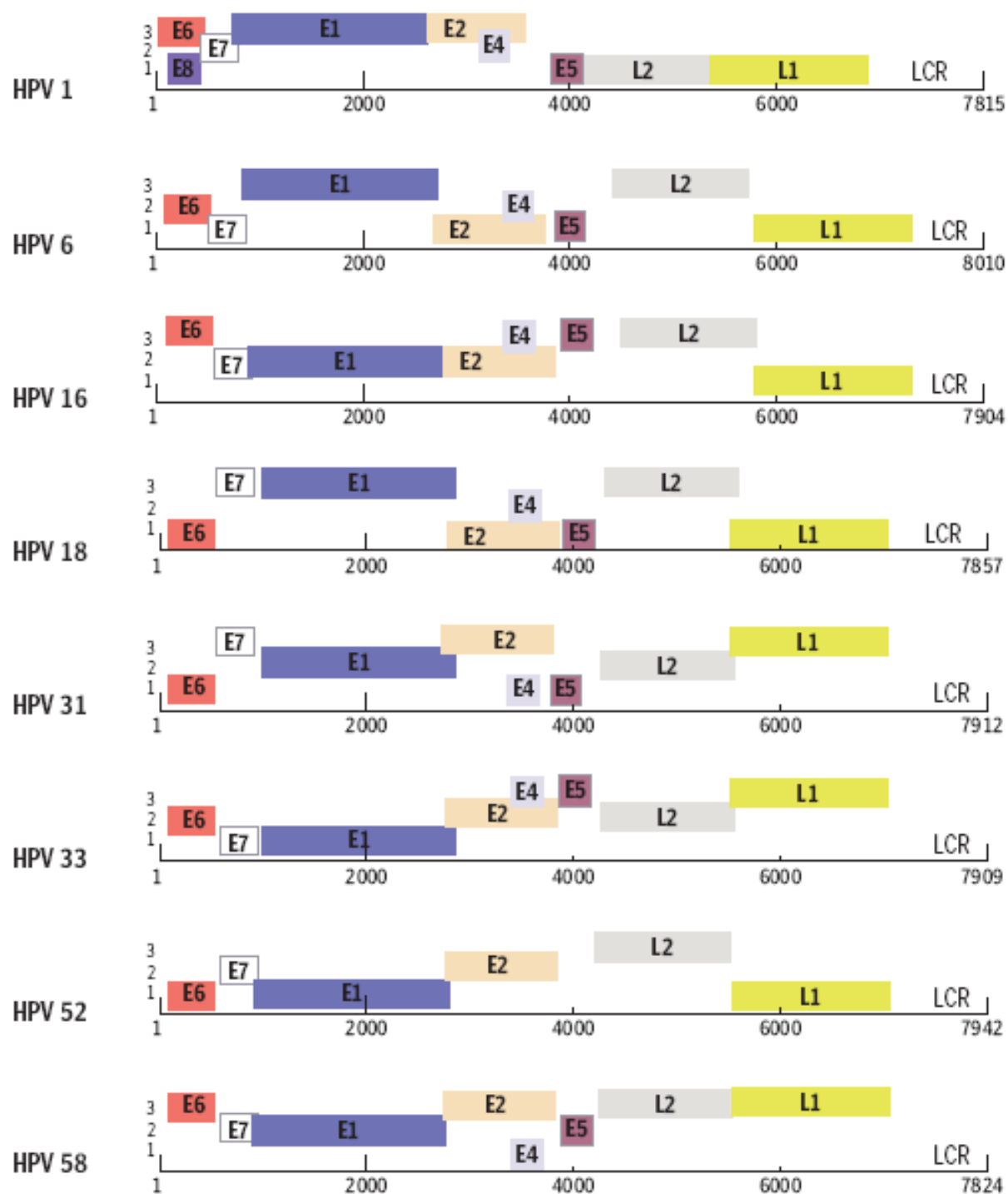


Figura 2. Distribución de los ORFs en el genoma de 8 papilomavirus humanos. Las barras de color representan los segmentos codificantes. Adyacente al ORF L1 se encuentra una región con abundantes señales reguladoras (LCR). Algunos ORFs pueden expresarse en cualquiera de los 3 marcos de lectura. Como puede observarse en la figura, algunos ORF no se han descrito en todos los tipos únicos (Fuente: Arroyo, 2010).

1.4 Ciclo Vírico

El ciclo de replicación de los papilomavirus está marcado por el grado de diferenciación de la célula epitelial (figura 3). La infección se inicia con la entrada por endocitosis de los viriones en las células basales de un epitelio estratificado escamoso. Posteriormente el ADN vírico alcanza el núcleo celular, dónde se empiezan a expresar los genes E que controlan su replicación y expresión. Entre tanto, la célula epitelial va diferenciándose y dividiéndose por mitosis, dando lugar a las células más externas del epitelio. Cuando la célula infectada alcanza las capas más externas, y por tanto el máximo grado de diferenciación, se activan los genes de la región L, que codifican para las proteínas estructurales de las partículas víricas. Una vez sintetizadas las proteínas L1 y L2 de la cápside se produce el ensamblaje de los viriones, la ruptura del núcleo celular y la liberación de virus maduros.

Las condiciones inmunológicas del huésped y su predisponibilidad genética pueden favorecer la integración del ADN vírico que se encuentra en forma episomal en el ADN celular. Este fenómeno desencadena los mecanismos de transformación neoplásica del epitelio.

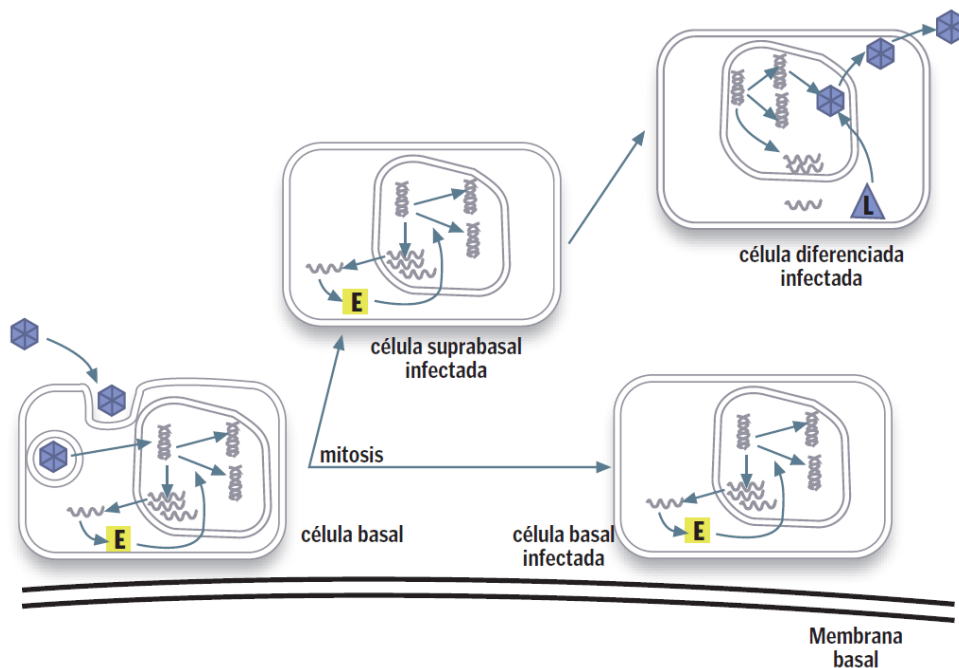


Figura 3. Ciclo vírico de un papilomavirus. E, genes de transcripción temprana. L, genes de transcripción tardía. (Fuente: Arroyo, 2010).

1.5 Pluralidad de los Papilomavirus Humanos

1.5.1 Definición de *especie*, *tipo*, *subtipo* y *variante* de papilomavirus

Los papilomavirus constituyen un grupo de virus con una destacable heterogeneidad. Hasta el momento se han caracterizado totalmente más de 200 tipos, agrupados en 18 géneros y más de 50 especies taxonómicas. Se han detectado cientos de aislados diferentes, que son considerados subtipos o variantes de los tipos de referencia.

El criterio para la clasificación taxonómica de papilomavirus se basa en el análisis filogenético, en base a la similitud de sus secuencias de nucleótidos del ORF L1. Se considera un nuevo género de papilomavirus cuando existe menos de un 60% de homología, una nueva especie entre 60 y 70%, un nuevo tipo entre 71 y 89%, un nuevo subtipo entre 90 y 98% y una nueva variante cuando existe más de un 98% de homología en la secuencia del gen que codifica la proteína L1 (de Villiers, 1994) con respecto a los papilomavirus descritos previamente.

Clasificación	Similitud de secuencia L1 (%)
Especie	60-70
Tipo	71-89
Subtipo	90-98
variante	> 98

Tabla 2. Criterio para definir *especie*, *tipo*, *subtipo* y *variante* de papilomavirus. Similitud en la secuencia de nucleótidos respecto a los tipos de referencia.

1.5.2 Caracterización de nuevas variantes

La secuenciación del ORF L1 es el método de referencia para clasificar taxonómicamente las nuevas variantes. La caracterización de una nueva variante debe incluir la secuenciación del genoma vírico, la determinación de su organización genética, la realización de análisis filogenéticos y el clonaje del genoma completo.

Las nuevas variantes secuenciadas parcialmente son denominadas provisionalmente con un alias (p.e. GA6053) hasta que el *Reference Center for Human Papillomaviruses* que pertenece al *German Cancer Research Center* (Heidelberg, Alemania), se encarga de confirmar que los nuevos tipos caracterizados poseen secuencias únicas y de asignar el número apropiado al nuevo tipo de papilomavirus. Allí se deposita y mantiene la muestra de referencia, y si el propietario lo permite, distribuye muestras del ADN de la nueva variante. Este proceso es esencial para mantener un correcto orden taxonómico.

Los nuevos tipos son denominados por un número correlativo siguiendo un orden cronológico. Los subtipos de tipos previamente descritos se denominan con una letra (p.e. VPH 5b).

1.5.3 Clasificación de los papilomavirus por criterio combinado tropismo / clínica

Se ha propuesto una clasificación de los papilomavirus humanos en dos grandes grupos, basándose en su tropismo celular y en aspectos clínicos (Van Ranst *et al.*, 1992):

- **Mucosotrópicos:** papilomavirus con tropismo por las mucosas genitales, anogenitales y orales. Todos los papilomavirus mucosotrópicos son en mayor o menor medida potencialmente oncogénicos. Dentro de este grupo pueden distinguirse 2 categorías: virus de alto y de bajo potencial oncogénico (alto y bajo riesgo) en función de su capacidad para desarrollar una neoplasia.
- **Cutáneos:** papilomavirus con tropismo por la piel. Los papilomavirus cutáneos raramente se relacionan con la formación de neoplasias, excepto los relacionados con una enfermedad dérmica denominada *epidermodisplasia verruciforme* (EV). Esta enfermedad se utiliza como criterio para clasificar los papilomavirus cutáneos en dos categorías: relacionados y no relacionados con la misma.

Mucosotrópicos		Cutáneos	
Alto riesgo	Bajo riesgo	Relacionados con EV	No relacionados con EV
16, 18, 26, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70 (64), 73, 82, 85, 97	6, 11, 13, 32, 34, 40, 42, 43, 44 (55), 54, 61, 62, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91 (79), 102, 106, 114	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20 (46), 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50, 80, 93, 94, 98, 99, 104, 107	1, 2, 3, 4, 7, 10, 26, 27, 28, 29, 41, 48, 49, 57, 60, 63, 65, 75, 76, 77, 78, 88, 92, 95, 96, 99, 100, 105, 115, 117, 118, 120, 124, 125, 150, 160

Tabla 3. Clasificación de los papilomavirus humanos en función del tropismo celular y de aspectos clínicos. Actualmente los tipos 46, 55, 64 Y 79 se han reclasificado como subtipos de los VPH 20, 44, 34 Y 91 respectivamente.

Esta clasificación no es estricta, y se mantiene en continua revisión. Algunos papilomavirus mucosotrópicos pueden encontrarse también en la piel (p.e. los tipos 34, 57 y 59). Asimismo no existen datos clínicos fehacientes para la clasificación de algunos papilomavirus mucosotrópicos como virus de alto o bajo riesgo. Por otro lado varios tipos cutáneos pueden encontrarse en lesiones relacionadas con la epidermodisplasia, pero también en otro tipo de lesiones, por lo que se clasifican dentro de ambas categorías.

1.5.4 Clasificación filogenética de los papilomavirus

En 2004, De Villiers *et al.*, propuso una clasificación de los virus del papiloma en 16 géneros designados con letras griegas que fue actualizada en 2010 por Hans-Ulrich *et al.*, incluyendo 13 nuevos géneros (figura 4).

Actualmente, los papilomavirus se dividen en 29 géneros. La tabla 4 contiene una lista de los géneros y especies de los virus del papiloma humano (géneros Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- y Nu-VP). Para los tipos del virus del papiloma de animales se utiliza una nomenclatura basada en el nombre científico del huésped (p.e. FdPV1 para *Felis domesticus* VP tipo 1).

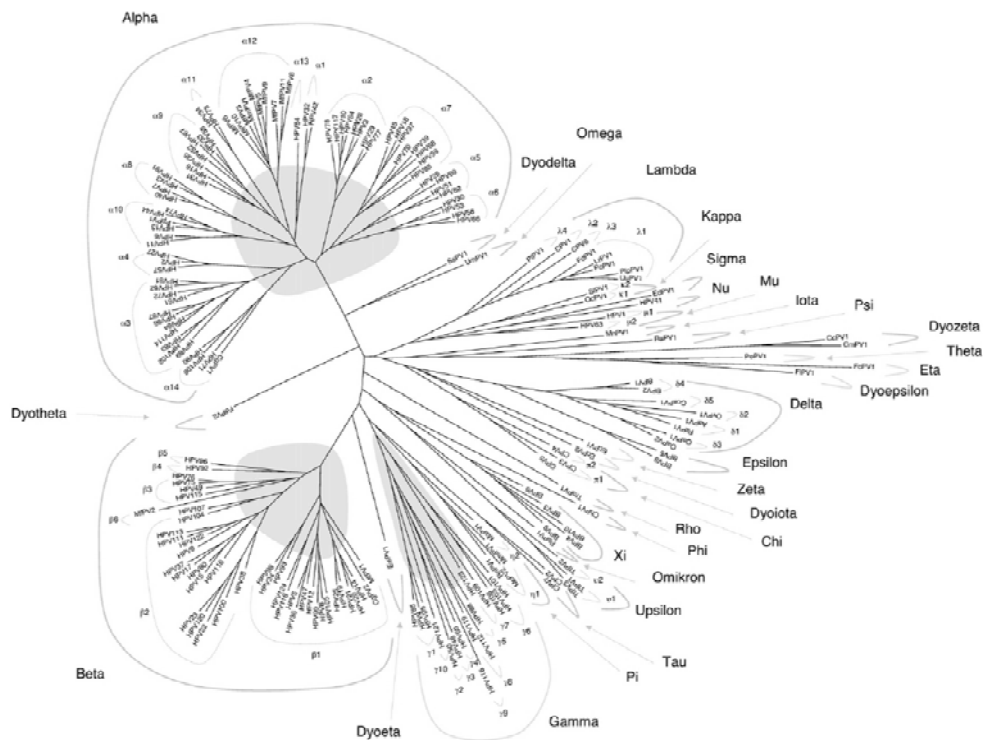


Figura 4. Árbol filogenético basado en la secuencia del ORF L1 de 189 papilomavirus. El análisis filogenético está basado en el alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de L1. Fuente: Hans-Ulrich *et al.*, 2010.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS PAPILOMAVIRUS			
GÉNERO	ESPECIE	GENOTIPOS	OBSERVACIONES
ALPHA	ALPHA-1	32, 42	Mucosotrópicos, bajo riesgo, preferentemente anogenitales.
	ALPHA-2	10, 3, 28, 29, 77, 78, 94, 117, 125, 160	Cutáneos, algunos causan verrugas planas.
	ALPHA-3	61, 62, 72, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 102, 114, 125	Mucosotrópicos, bajo riesgo, preferentemente genitales.
	ALPHA-4	2, 27, 57	Cutáneos, algunos causan verrugas comunes y planas.
	ALPHA-5	26, 51, 69, 82	Mucosotrópicos, alto riesgo, preferentemente genitales. (26: también causa verrugas comunes cutáneas).
	ALPHA-6	53, 30, 56, 66	Mucosotrópicos, alto riesgo, preferentemente genitales.
	ALPHA-7	18, 39, 45, 59, 68, 70, 85, 97	Mucosotrópicos, alto riesgo, preferentemente genitales.
	ALPHA-8	7, 40, 43, 91 (79)	Mucosotrópicos, bajo riesgo. (excepto 7 que causa verrugas de carníceros cutáneas).
	ALPHA-9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	Mucosotrópicos, alto riesgo, preferentemente genitales.
	ALPHA-10	6, 11, 13, 44 (55), 74, PpPV1	Mucosotrópicos, bajo riesgo, preferentemente oral, anogenital, alguno de ellos causan verrugas, condiloma acuminado y gigante, enfermedad de Heck.
	ALPHA-11	34 (64), 73, 177	Mucosotrópicos (cutáneos), preferentemente anogenital.
	ALPHA-12	MmPV1, MfPV3, MfPV4, MfPV5, MfPV6, MfPV7, MfPV8, MfPV9, MfPV10, MfPV11	
	ALPHA-13	54	Mucosotrópico, bajo riesgo, preferentemente anogenital.
	ALPHA-14	90, 71, 106, CgPV1	Mucosotrópicos, bajo riesgo, preferentemente anogenital.
BETA	BETA-1	5, 8, 12, 14, 19, 20 (46), 21, 24, 25, 36, 47, 93, 98, 99, 105, 118, 124, 143, 152, 195, 196, CgPV2, MfPV1	Cutáneos, algunos causan epidermodisplasia verruciforme.
	BETA-2	9, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80, 100, 104, 107, 110, 111, 113, 120, 122, 145, 151, 159, 174, 182, 198	Cutáneos, algunos causan epidermodisplasia verruciforme.
	BETA-3	49, 75, 76, 115	Cutáneos, algunos causan verrugas comunes y planas.
	BETA-4	92	Cutáneo, causa epidermodisplasia verruciforme y queratosis.
	BETA-5	96, 150, 185	Cutáneo, causa carcinoma in situ.
	BETA-6	MfPV2	
GAMMA	GAMMA-1	4, 65, 95, 158, 173	Cutáneos, alguno de ellos causan verrugas comunes y planas.
	GAMMA-2	50, 200	Cutáneo (epidermodisplasia verruciforme)
	GAMMA-3	48, 188	Cutáneo, relacionado con la papulosis bowenoide.
	GAMMA-4	60	Cutáneo, causa quistes epidermoides plantares.
	GAMMA-5	88	Cutáneo, relacionado con papulosis bowenoide y condiloma.
	GAMMA-6	101, 103, 108	Mucosotrópicos, preferentemente genitales.
	GAMMA-7	109, 123, 134, 138, 139, 149, 155, 170, 186, 189, 193	Cutáneos.
	GAMMA-8	112, 119, 147, 164, 168, 176	Mucosotrópicos, relacionados con condiloma acuminado.
	GAMMA-9	116, 129	Cutáneo.
	GAMMA-10	121, 130, 133, 142, 180, 191	Mucosotrópicos
	GAMMA-11	126, 136, 140, 141, 154, 169, 171, 181, 202	Cutáneos (verruca plana)

	GAMMA-12	127 , 132, 148, 157, 165, 199	Cutáneo.
	GAMMA-13	128 , 153	Cutáneo (lesiones queratósicas).
	GAMMA-14	131	Cutáneo (lesiones queratósicas, verrugas comunes).
	GAMMA-15	135 , 146, 179, 192	Mucosotrópico.
	GAMMA-16	137	Mucosotrópico.
	GAMMA-17	144	Mucosotrópico.
	GAMMA-18	156	Cutáneo.
	GAMMA-19	161 , 162, 166	Cutáneo.
	GAMMA-20	163 , 183, 194	Cutáneo.
	GAMMA-21	167	Cutáneo.
	GAMMA-22	172	Mucosotrópico.
	GAMMA-23	175	Mucosotrópico (condilomas).
	GAMMA-24	178 , 190, 197	Cutáneos.
	GAMMA-25	184	Cutáneo (verrugas comunes)
	GAMMA-26	187	
	GAMMA-27	201	
MU	MU-1	1	Cutáneo (verrugas comunes y plantares)
	MU-2	63	Cutáneo, causa verrugas plantares.
NU	NU-1	41	Cutáneo, causa verrugas comunes y planas.

Tabla 4. Clasificación filogenética de los papilomavirus humanos basada en Hans-Ulrich *et al.*, 2010, en géneros y especies y observaciones según su tropismo, riesgo y asociación. Los datos están tomados del *International Human Papillomavirus Reference Center (IHPVRC)* que tiene registrados 204 clones de referencia correspondientes a 204 genotipos de VPH (a fecha de 22/10/2014). Los tipos 203 y 204 no se incluyen en esta tabla por no estar actualmente clasificados dentro de una especie determinada. Destacan en negrita los nombres de cada virus del papiloma que lideran los nuevos géneros. Se muestran los papilomavirus humanos identificados hasta el momento clasificados según el alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos correspondiente al ORF L1 de cada tipo. Algunos tipos, subtipos y variantes tradicionales que se definieron en base a técnicas de hibridación y/o análisis de fragmentos de restricción actualmente no cumplen este criterio filogenético. Los tipos 46, 55, 64 y 79 se han reclasificado como subtipos de los VPH 20, 44, 34 y 91 respectivamente.

2. Infecciones causadas por VPH mucosotrópicos y cutáneos

2.1 Tejidos susceptibles de infección por Papilomavirus: Epitelios de Piel y Mucosas

2.1.1 Organización de los tejidos epiteliales

Los epitelios constituyen un grupo de tejidos que recubren todas las superficies corporales y tapizan el interior de las cavidades del organismo, funcionando como barreras entre los compartimentos biológicos. Existen dos tipos de epitelios: piel y mucosas. Los epitelios están constituidos por capas de células epiteliales, estrechamente unidas entre sí, bajo la cual se encuentra la *membrana o lámina basal*, constituida por fibras de *colágeno* y *laminina*, incluidas en una matriz de mucopolisacáridos. La membrana basal no está vascularizada, por lo que el epitelio recibe el oxígeno y los nutrientes por difusión desde el *tejido conectivo denso subyacente*. A continuación se describen las mucosas por su relación con el cáncer cervical y los papilomavirus oncogénicos.

2.1.2 Mucosas

Las **mucosas** son tejidos epiteliales que recubren muchos órganos de los aparatos respiratorio, gastrointestinal, genital, de los órganos de los sentidos. Las mucosas se caracterizan por el escaso contenido en queratina, lo que les confiere menor resistencia a la acción mecánica y a la desecación que el epitelio cutáneo por lo que se mantienen húmedas gracias a una importante actividad secretora local.

La mayoría de las mucosas son una prolongación especializada de la piel, y el paso de una a otra se produce de forma gradual. La piel del área anogenital exhibe un grado variante de queratinización, desde las zonas más externas, típicamente cutáneas hasta la mucosa interna. En la mujer la queratinización tiende a desaparecer en la zona intermedia de los labios menores. En el hombre existe un área de transición análoga, entre el borde que marca el exterior y el interior del prepucio. En la región anorectal la transición se produce a 2 cm del orificio anal, en una estructura denominada *columnas de Morgagni*.

La mucosa anal está formada por un *epitelio cúbico estratificado*, que en dirección proximal evoluciona hacia un *epitelio columnar simple*. La mucosa de la uretra está constituida por un *epitelio estratificado escamoso* en la parte más distal, que evoluciona hasta convertirse en el denominado *epitelio de transición*, característico de la vejiga de la orina (no confundir con "zona de transición" entre dos tipos de epitelio). La mucosa oral presenta dos tipos de epitelios: las mucosas de la boca (paladar, encías, lengua, etc.) y cuerdas vocales están constituidas por un grueso *epitelio estratificado escamoso*. El resto del aparato respiratorio está formado por un *epitelio pseudoestratificado* característico de las vías aéreas.

2.1.3 Localización anatómica de las lesiones provocadas por papilomavirus

Prácticamente todas las infecciones debidas a Papilomavirus están confinadas a los *epitelios estratificados escamosos* y a los *epitelios glandulares*. Cada papilomavirus posee un sitio de infección relativamente específico, determinado por el grosor, el grado de queratinización y el pH del epitelio.

Las lesiones en las mucosas aparecen preferentemente en las zonas de transición entre la piel y la mucosa anogenital adyacente, o entre dos tipos distintos de mucosa. En el aparato genital femenino, la mayoría de las lesiones afectan a los labios menores, la vagina y el cérvix. En la región cervical, las lesiones suelen producirse en la zona de transición entre el epitelio estratificado escamoso del exocérnix y una zona de transición que le separa del epitelio cilíndrico del endocérnix. En el aparato genital masculino suelen producirse en el epitelio interno del prepucio y el glande. Tanto en la región anorectal como en el aparato urinario, las lesiones están localizadas en las porciones más distales del recto y de la uretra respectivamente. En el aparato urinario masculino, se suelen encontrar en el *meato urinario* y en el femenino en la región equivalente. En la cavidad oral, la mayoría de las lesiones se encuentran en las zonas más expuestas: boca y laringe, aunque también se han detectado lesiones asociadas a Papilomavirus en el epitelio de los senos paranasales, la faringe, el esófago, la tráquea, los bronquios y en la membrana conjuntiva del ojo.

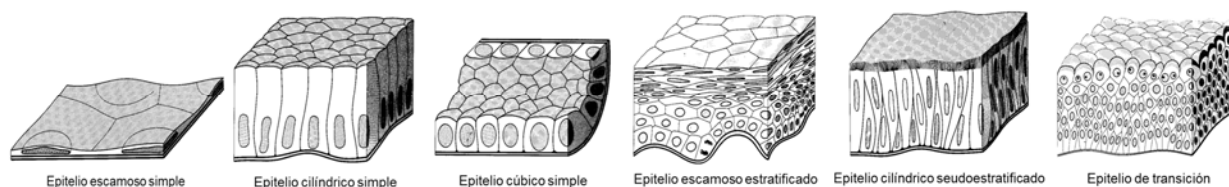


Figura 5. Diferente organización de los tejidos epiteliales. Los epitelios con una sola capa de células se denominan simples, y los que tienen más de una, estratificados. En función de la morfología de las células superficiales, los epitelios se clasifican en escamosos (células planas), cúbicos, columnares o cilíndricos y de transición (intermedio entre el escamoso y el cúbico). El epitelio escamoso simple se encuentra en superficies comprometidas en el transporte de gases (pulmones) o líquidos (capilares sanguíneos). El epitelio cilíndrico se encuentra en superficies con gran capacidad de absorción o secreción (endocérnix, intestino y estómago). El epitelio cúbico simple se presenta en pequeños túbulos con propiedades absorbentes o secretoras (riñones, glándulas salivares, páncreas, etc). El epitelio escamoso estratificado presenta un número variable de capas celulares que representan estadios de transición morfológica y funcional desde la capa basal, cuboide, hasta las capas superficiales, escamosas. Se encuentra en superficies que deben soportar un efecto abrasivo (exocérnix, vagina, boca, faringe, esófago, canal anal, epidermis, etc). El epitelio cilíndrico pseudoestratificado es similar al cilíndrico simple, aunque presenta diferente disposición de los núcleos celulares. Se presenta exclusivamente en las vías aéreas de los mamíferos. El epitelio de transición se encuentra exclusivamente en las vías urinarias, donde está especializado en la acomodación a un alto grado de distensión y a la resistencia a la acción tóxica de la orina. Fuente: *Histología Funcional*, Wheater, et al., 1987.

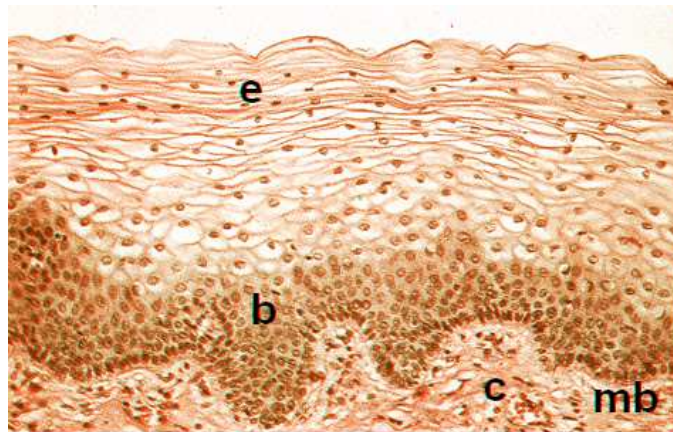


Figura 6. Epitelio estratificado escamoso de la mucosa vaginal. Se observa la gran proliferación celular de la capa basal (**b**) y la transformación en células escamosas superficiales degeneradas (**e**). Las capas intermedias están formadas por grandes células poligonales. Bajo la capa basal se dispone la membrana basal (**mb**) y por debajo de ésta, el tejido conectivo subyacente (**c**). La unión entre el epitelio y el tejido conectivo es muy irregular, de manera que se incrementa la adhesión entre ambos. Fuente: *Histología Funcional*, Wheater, *et al.*, 1987.

2.2 Cérvix o cuello del útero

El útero es un órgano fibromuscular situado en el centro de la cavidad pélvica, entre la vejiga urinaria y el recto. Mide aproximadamente 9 x 4 x 3 cm y pesa entre 50 y 100 gramos. Está constituido por 2 porciones: cérvix y cuerpo.

El cérvix forma la parte inferior del útero, haciendo protusión en el interior de la vagina. Su función es mantener cerrada la cavidad uterina, sujetando los tejidos contenidos en la cavidad pélvica e impidiendo la accidental salida del feto durante la gestación, como consecuencia de la posición bípeda de la especie humana. La zona del cuello uterino en contacto con la vagina se llama *exocérvix*. La zona comprendida entre los orificios cervicales externo e interno constituye el *canal cervical* o *endocérvix*, es fusiforme y mide unos 3 cm de longitud.

El exocérvix está revestido de un epitelio estratificado escamoso formado por 5 capas de células. El endocérvix está revestido de epitelio cilíndrico, con glándulas racemosas que producen la secreción mucosa del cérvix. El límite entre el epitelio escamoso del exocérvix y el cilíndrico del endocérvix tiene una *zona de transición*, con células en distintos grados de maduración.

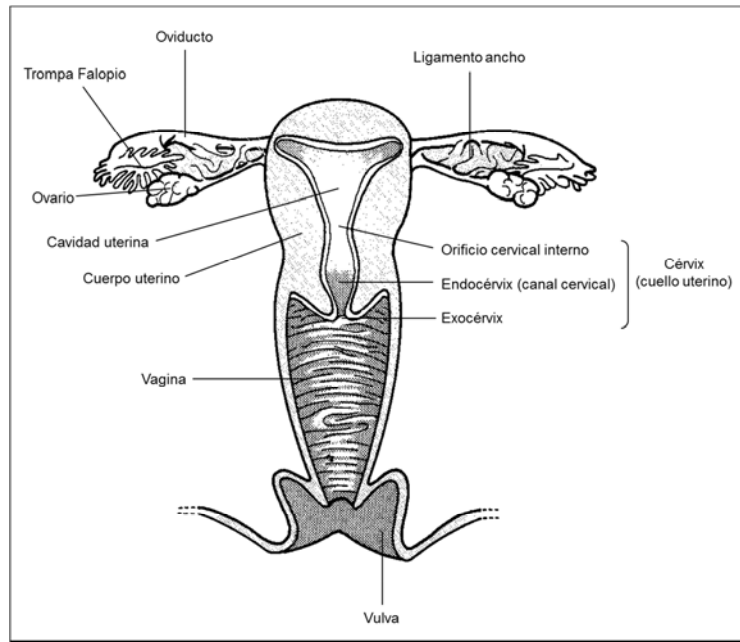


Figura 7. Anatomía del aparato genital femenino. El cérvix es la porción distal del útero. Está formado por el endocérvix (canal cervical) y el exocérvix (región próxima a la vagina). Fuente: *Licenciatura Ginecología, Delgado et al, 1990.*

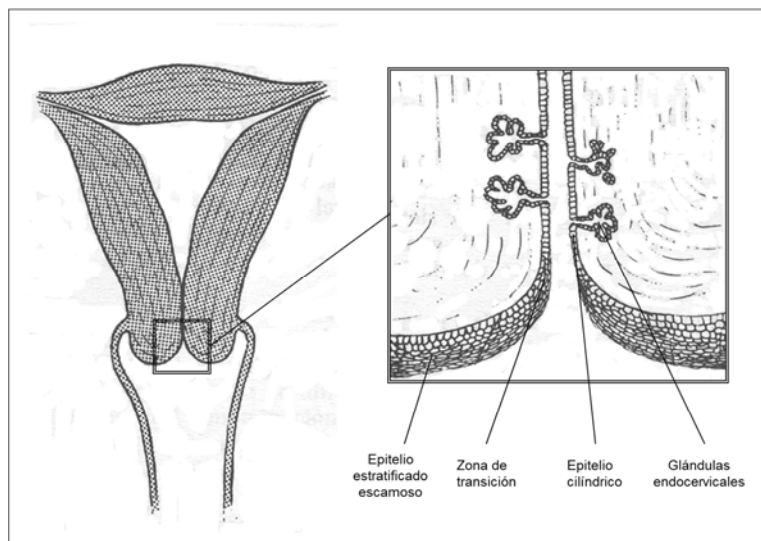


Figura 8. Localización de los diferentes tipos de epitelio del cérvix. El exocérvix está formado por epitelio estratificado escamoso, al igual que la vagina. El endocérvix y las glándulas endocervicales están formados por epitelio cilíndrico simple. La zona de transición entre ambos epitelios varía a lo largo de la vida de la mujer. En la infancia se localiza dentro del canal endocervical, durante la etapa de madurez sexual emigra hacia el exocérvix y en la menopausia vuelve al interior del endocérvix. La migración de la zona de transición entre epitelios es la razón de la diferente susceptibilidad a la infección por Papilomavirus a lo largo de la vida. Fuente: *Licenciatura Ginecología, Delgado et al, 1990.*

2.3 Lesiones cancerosas y precancerosas del cuello del útero

2.3.1 Lesiones intraepiteliales cervicales

Las neoplasias intraepiteliales son lesiones cancerosas y precancerosas de las mucosas que por definición se mantienen confinadas dentro del epitelio, sin sobrepasar la membrana basal del mismo. Las lesiones cervicales son las más importantes por su frecuencia, aunque también se pueden producir en el pene, ano, vulva y vagina. Son lesiones precursoras, cuya evolución puede variar desde la remisión espontánea sin tratamiento alguno, al desarrollo de un carcinoma invasor de cérvix.

Las lesiones intraepiteliales se caracterizan por la aparición de alteraciones en la estructura normal del tejido epitelial. Las células afectadas presentan aumento de la relación núcleo/citoplasma, hipercromatismo, aspecto granuloso de la cromatina, aumento del número de mitosis, mitosis atípicas y presencia de *coilocitos* (células epiteliales atípicas).

De acuerdo con el *Sistema Bethesda* (Solomon *et al.*, 2002) se establecen dos categorías para describir las lesiones escamosas intraepiteliales: bajo grado (LSIL, del inglés Low grade Squamous Intraepithelial Lesion) y alto grado (HSIL, del inglés High grade Squamous Intraepithelial Lesion) (tabla 5).

Estos dos grados representan esquemáticamente las sucesivas etapas por las que puede pasar una lesión de cuello de útero. Las lesiones con pronóstico más favorable no pasan de LSIL, mientras que las lesiones más graves evolucionan desde LSIL a HSIL. La mayoría de las lesiones de bajo grado remiten espontáneamente (aproximadamente en el 85 % de los casos). La progresión de las lesiones de bajo grado hacia una HSIL se produce en el restante 10-20 % de los casos (documento de consenso SEGO, 2002). No es frecuente que las lesiones de bajo grado se mantengan durante más de 12 meses, ya que o bien remiten espontáneamente o bien progresan. Las lesiones de alto grado (HSIL) son carcinomas *in situ* que si no son tratados tienen mucha probabilidad de sobrepasar la membrana basal del epitelio y alcanzar la región vascularizada, convirtiéndose en un carcinoma invasor de cérvix. Las lesiones detectadas en estadio intraepitelial tienen una supervivencia del 100 % prácticamente (Comité FIGO).

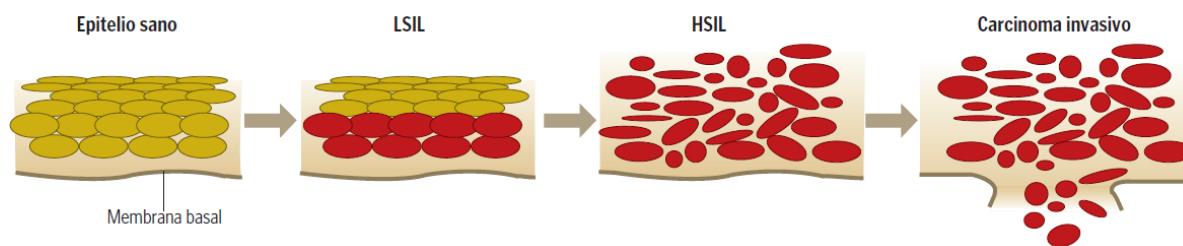


Figura 9. Diagrama representativo de la evolución de una lesión intraepitelial. De izquierda a derecha se representa un epitelio estratificado escamoso normal; una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL) que afecta como máximo al tercio inferior del epitelio; una lesión intraepitelial de alto grado (HSIL) que provoca la desestructuración del tejido y una lesión que ha alcanzado el tejido vascularizado que se encuentra bajo la membrana basal del epitelio (carcinoma invasor de cérvix) (Fuente: Arroyo, 2010).

Características	Denominación tradicional (1950-1969)	Clasificación CIN (1970-1989)	Sistema Bethesda (1990-actualidad)	
Alteraciones presentes en el tercio inferior del epitelio	displasia leve	CIN I	LSIL	ASC-US AGUS ASC-H AIS
Alteraciones presentes en dos tercios del epitelio	displasia moderada	CIN II	HSIL	
Alteraciones presentes en todo el epitelio (epitelio totalmente desestructurado)	displasia severa (carcinoma in situ)	CIN III		

Tabla 5. Equivalencias entre la denominación tradicional de las displasias, la clasificación CIN I-III y la clasificación establecida por el sistema Bethesda (SIL). Otras definiciones son: ASC (atypical squamous cells): sustituye la categoría ASCUS y puede ser calificada con: ASC-US: ASC de significado incierto y ASC-H: ASC que no debe excluir la posibilidad de que se trate de una lesión de alto grado. AIS: describe las muestras que presentan un adenocarcinoma in situ endocervical, es decir, una afectación de las células glandulares que componen el epitelio cilíndrico simple de las glándulas racemomas del endocérvix. AGUS (atypical glandular cells of undetermined significance): describe muestras que presentan células glandulares atípicas de significado incierto. Estas muestras presentan alteraciones celulares que pueden ser clasificadas como AIS en estudios posteriores.

2.3.2 Carcinoma invasor de cérvix

Las lesiones intraepiteliales que sobrepasan la membrana basal del epitelio se convierten en un carcinoma invasor de cérvix. La progresión desde las formas leves a las más graves puede producirse en un período de tiempo variable, desde varios años a menos de 12 meses. Se ha descrito que el 30% de las lesiones relacionadas con VPH16 o VPH18, evoluciona a carcinoma en un período de 6 a 24 meses. En las etapas iniciales, cuando el carcinoma no supera más de 5 mm la membrana basal, se denomina *microcarcinoma*.

Las lesiones intraepiteliales y el carcinoma invasor en sus etapas iniciales cursan subclínicamente, aunque ya hayan aparecido alteraciones histológicas. Las manifestaciones clínicas del carcinoma invasor de cérvix se producen cuando la lesión ya está muy avanzada. El primer síntoma es la metrorragia, que puede ser discontinua y en pequeña cantidad. Se suele producir por contacto directo sobre el cuello del útero, durante el coito o con la exploración citológica. La otra manifestación clínica más frecuente es la aparición de un flujo vaginal sonrosado, que presenta mal olor característico de la necrobiosis.

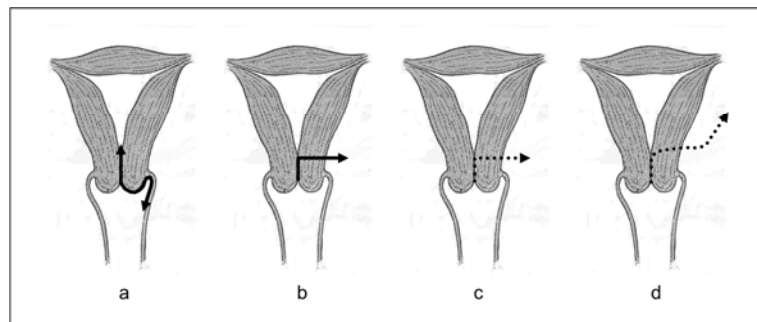


Figura 10. Formas de propagación del cáncer de cuello de útero. a: por contigüidad en superficie, hacia la vagina y el cuerpo del útero; b: por contigüidad en profundidad hacia otras estructuras pélvicas; c) a distancia por vía linfática; c) a distancia por vía vascular. El carcinoma invasor se caracteriza por la proliferación del epitelio maligno dentro del estroma, en forma de digitalizaciones de células malignas lejos de la superficie del epitelio. La extensión del carcinoma invasor se produce por contigüidad a los tejidos adyacentes de la región pélvica mediante propagación en superficie o en profundidad. Cuando se produce por superficie, afecta a la vagina, el endocérnix y el cuerpo del útero. Cuando se produce en profundidad afecta a los parametrios, los ligamentos uterinos, la vejiga y el recto. La propagación de las células malignas también puede producirse por las vías linfática o vascular. La propagación linfática se inicia con la afectación de los pequeños vasos linfáticos del estroma, alcanzando a través de éstos, los ganglios paracervicales y produciendo progresivamente la invasión linfática a distancia. La propagación vascular se produce en el cáncer avanzado, afectando por esta vía el hígado, pulmón, cerebro, etc. Fuente: *Licenciatura Ginecología*, Delgado *et al.*, 1990.

2.4 Papel de los papilomavirus en la transformación neoplásica

2.4.1 Infección por papilomavirus del tracto genital femenino

Se considera que los papilomavirus son los únicos agentes etiológicos necesarios para el desarrollo de las neplasias cervicales, si bien, la infección no es suficiente para el desarrollo de la neoplasia y en la carcinogénesis intervienen otros factores.

Las infecciones del tracto genital femenino debidas a papilomavirus son muy comunes en mujeres en edad sexual. En la mayoría de las ocasiones, el sistema inmunológico de la paciente interviene en la eliminación espontánea de la infección en un período aproximado de 8-10 meses. En estos casos, se desarrolla una inmunidad natural contra el tipo de papilomavirus causante de la lesión e incluso parece haber también inmunidad cruzada entre tipos. El 70 % de las infecciones es indetectable a los 2 años del diagnóstico (Moscicki *et al.*, 1998). El resto de las infecciones evolucionan inicialmente hacia una lesión intraepitelial.

2.4.2 Factores víricos

Se han realizado innumerables estudios para aportar datos sobre la relación entre la infección por papilomavirus y las lesiones precancerosas y cancerosas del cérvix. Los condicionantes víricos de la progresión neoplásica son el tipo vírico y la persistencia de la infección.

a) Tipo vírico

Existen más de 50 tipos de papilomavirus mucosotrópicos que infectan el tracto genital, diferenciados en las categorías de alto y bajo riesgo. Las lesiones debidas a los papilomavirus pueden evolucionar de forma muy diferente, en función del potencial oncogénico del tipo vírico. Las lesiones asociadas a los tipos de bajo riesgo suelen ser benignas y remiten espontáneamente (Schneider, 1993). Las lesiones con más probabilidad de progresión hacia un carcinoma, están asociadas a papilomavirus de alto riesgo. La infección por éstos es el factor más importante para el desarrollo de un cáncer de cuello de útero. Los tipos de alto riesgo VPHs 16, 18, 31 y 45 se detectan en el 80% de los carcinomas de cérvix (Coutlée *et al.*, 2005). El tipo 16 se detecta en la mitad de los carcinomas y el tipo 18 es el principal causante del adenocarcinoma de útero.

El diferente potencial oncogénico de los papilomavirus de alto y bajo riesgo se basa en su capacidad de integración en el genoma celular, así como la eficacia de los productos de los ORFs E6 y E7 para bloquear las proteínas celulares supresoras de tumores p53 y Rb (Shah, 1997).

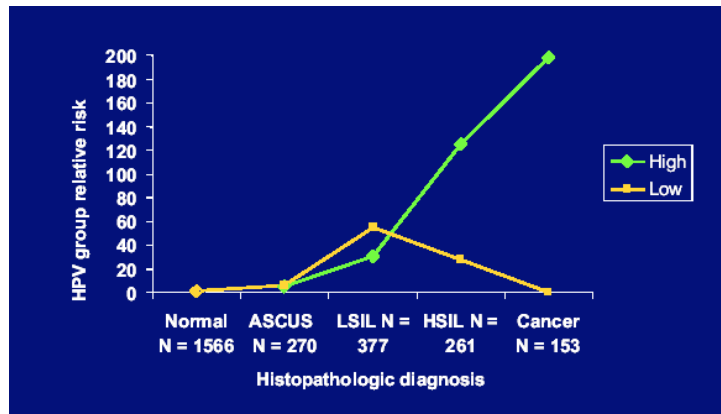


Figura 11. Riesgo relativo de las lesiones cervicales según el grupo de riesgo. El riesgo entre ambos grupos es equivalente en las lesiones de bajo grado (LSIL), pero es significativamente distinto en las lesiones de alto grado. La asociación entre el cáncer de cuello de útero y los tipos de bajo riesgo es prácticamente inexistente. Fuente: Lorincz *et al.*, 1992.

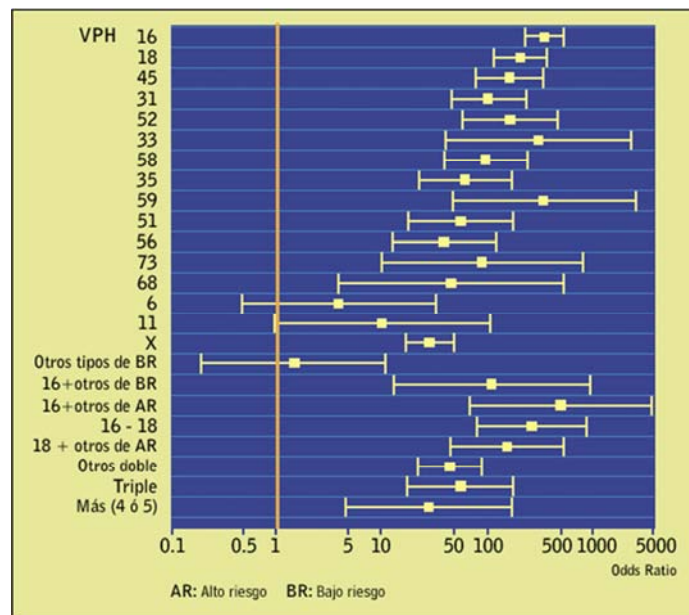


Figura 12. Riesgo específico de las lesiones cervicales según el tipo vírico. Existen diferencias significativas entre tipos, especialmente entre los tipos de bajo riesgo VPHs 6 y 11 y el resto de VPHs (de alto riesgo). Los riesgos específicos de algunas combinaciones de las co-infecciones indican que el tipo vírico es un factor de riesgo más importante que el número de tipos distintos que co-infectan un tejido. Fuente: HPV Today, n° 4 (febrero, 2004).
Nota: El concepto de *Odds Ratio* se define como la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro. Es una forma de expresar la proporción de veces de que un suceso ocurra frente a que no ocurra. Un OR = 2,5 indica que un efecto aparece ante la presencia de otra variable 2,5 veces más que si esta variable no estuviera presente.

b) Persistencia vírica

La infección persistente es el principal requisito para la progresión de las lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado hacia el cáncer cervical, aunque está modulada por otros factores ambientales o congénitos (Bosch *et al.*, 2006). La persistencia se define como el mantenimiento de una infección en un período superior a 1 año (Vernick y Steigman, 2003). Viene marcada por la ineficacia del sistema inmune para eliminar la infección.

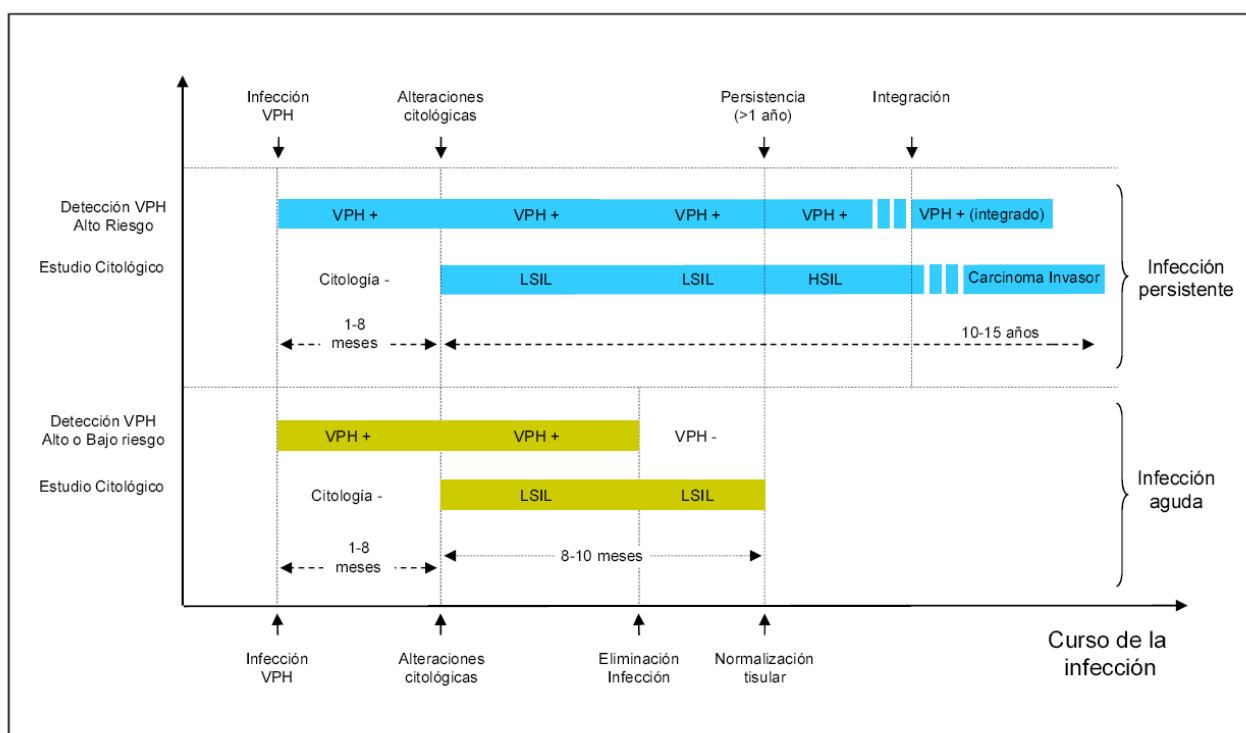


Figura 13. Curso teórico de la infección aguda y persistente. Las alteraciones citológicas suelen aparecer entre 1-8 meses después de producirse la infección. Las infecciones debidas a papilomavirus de bajo riesgo no suelen evolucionar a HSIL, remitiendo espontáneamente en un período de 8-10 meses. Las debidas a papilomavirus de alto riesgo pueden evolucionar en un período variable de tiempo, normalmente superior a los 12 meses. Las lesiones de bajo grado no suelen mantenerse por un tiempo superior a los 12 meses, ya que o bien evolucionan hacia un HSIL o remiten espontáneamente. La infección persistente y la integración del virus en el ADN humano son los factores más importantes de la transformación neoplásica y desencadenantes del carcinoma invasor.

2.4.3 Mecanismo de la transformación neoplásica

a) Papel de los genes E6 y E7

Los genes E6 y E7 son los principales responsables de la transformación neoplásica y su nivel de expresión está relacionado con el grado de oncogenicidad de las neoplasias intraepiteliales cervicales.

Los papilomavirus de alto riesgo expresan los productos E6 y E7 que bloquean las proteínas celulares p53 y Rb (Dyson *et al.*, 1989; Scheffner *et al.*, 1990). Ambas participan en los mecanismos de reparación de errores durante la replicación del ADN celular y en la apoptosis de células modificadas o infectadas. La expresión de las proteínas E6 y E7 provoca la inactivación de los mecanismos de reparación y la inmortalización celular, desencadenando la transformación neoplásica. Se ha descrito que los productos de los ORFs E6 y E7 de los papilomavirus de alto riesgo se unen a estas proteínas celulares de forma más eficiente que los de los tipos de bajo riesgo (Shah, 1997).

b) Papel del gen E2

El ORF E2 expresa la proteína E2, un factor de transcripción que inhibe la expresión de E6 y E7 interactuando con las señales reguladoras localizadas en la región LCR. La expresión basal de E6 y E7 es muy baja, ya que la proteína E2 la mantiene prácticamente silenciada. La integración del genoma vírico en el ADN provoca la interrupción del ORF E2 impidiendo la expresión del factor E2 y provoca la sobreexpresión de E6 y E7, de forma que se inactivan los mecanismos reparadores, provocando el desarrollo de la neoplasia.

c) Mecanismo de integración en el genoma humano

La integración del genoma vírico en el genoma humano es el mecanismo molecular más importante para el desarrollo del carcinoma cervical. Ésta suele producir la interrupción o delección del ORF E2, mientras que los ORFs E6, E7 y la región LCR permanecen intactos.

El mecanismo de integración todavía no se conoce con exactitud. Se han descrito diferentes formas de integración. El mismo tipo de papilomavirus puede presentar diferentes patrones de interrupción del cromosoma humano y de sus propios ORFs en diferentes muestras de carcinoma cervical. (Zur Hausen, 2000).

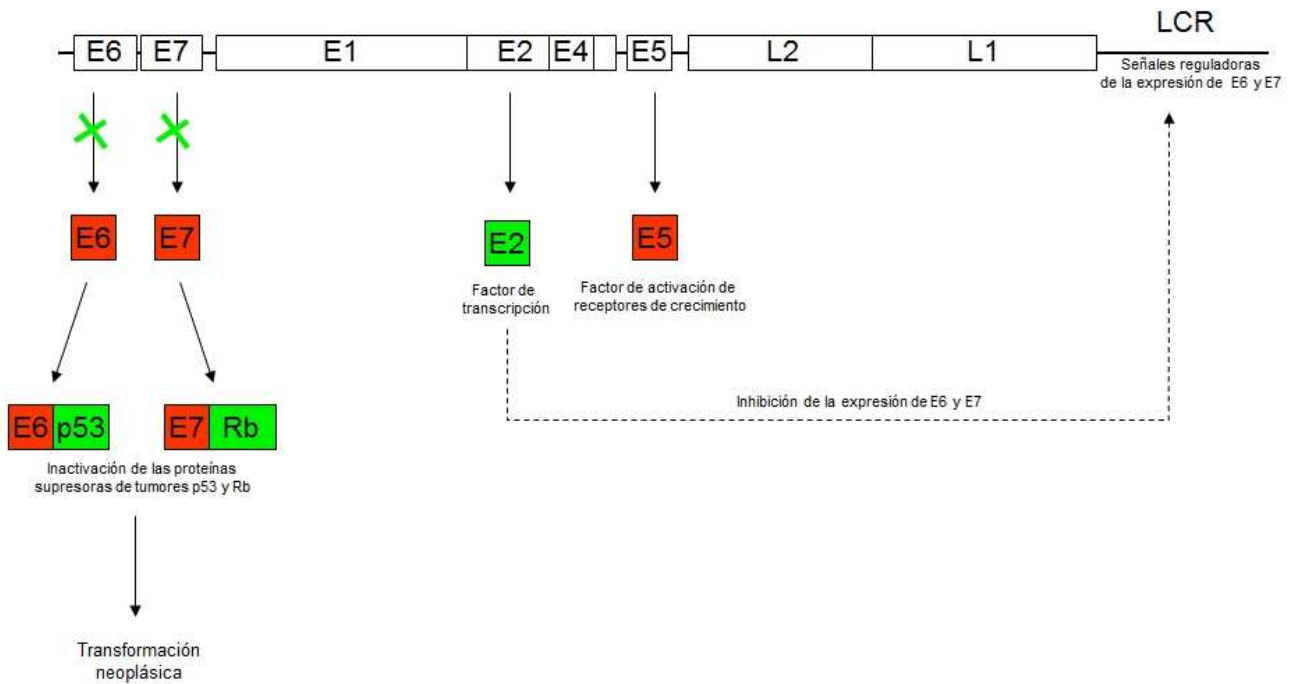


Figura 14. Productos génicos implicados en la transformación neoplásica. Los ORFs E6 y E7 expresan proteínas que bloquean las proteínas celulares p53 y Rb, implicadas en la regulación del ciclo celular. El factor de transcripción E2 se une a las señales reguladoras de la transcripción de E6 y E7, localizadas en la región LCR, manteniendo su expresión en niveles basales. La integración del genoma vírico en el ADN celular provoca la interrupción del gen E2, impidiendo la expresión del factor E2. En ausencia de modulación se produce una sobreexpresión de E6 y E7 que provoca la inactivación de los mecanismos de reparación y la inmortalización celular. El ORF E5 expresa un factor de crecimiento, que acelera el ciclo celular y facilita la acumulación de errores no reparados en el ADN.

3 Epidemiología

La infección por papilomavirus humanos es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en las mujeres. En el mundo se estima que hay 300 millones de portadoras de VPH y que cerca de 500.000 mujeres desarrollarán un cáncer de cuello uterino, el 83 % en países en vías de desarrollo (Parkin, 2006, Varela et al., 2010, De Sanjosé y García, 2006). En mujeres asintomáticas, la prevalencia mundial de la infección es del 10 % aproximadamente (Clifford et al., 2005; de Sanjosé, 2006) si bien presenta una fuerte variabilidad geográfica. Las tasas más altas se observan en Europa del Este, 29.1%, África, 22.1%, y América Central, 20.4%; las más bajas, en Europa del Sur, 6.8%, Europa del Oeste, 8.4%, y Asia, 8% (De Sanjosé et al., 2007).

Los 25 países de la Unión Europea tienen una población femenina aproximada de 195 millones de mujeres mayores de 15 años. De ellas 15,5 millones serían portadoras de VPH, 2 millones de mujeres tendrían condilomas acuminados, 2 millones con lesiones LSIL, 95.000 mujeres con HSIL y entre ellas se generarían 33.000 casos nuevos de carcinoma invasor (cerca de 60.000 en toda Europa) (De Sanjosé y García, 2006).

En España, la prevalencia de portadoras es del 3-6 % (de las más bajas del mundo) coincidiendo con la baja prevalencia del cáncer cervical (documentos de consenso SEGO, 2002). Entre 175.000 y 350.000 presentarían un condiloma, un número equivalente con lesiones LSIL y entre 8.500 y 9.000 casos de HSIL (febrero 2007, Grupo de trabajo de la Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones) (De Sanjosé y García, 2006).

Según el proyecto Globocan, en el año 2008 en el mundo se documentaron aproximadamente 275.000 muertes asociadas a esta patología (incidencia de 7,8 casos cada 100.000 mujeres) si bien el número real de fallecimientos podría ser superior, ya que el carácter asintomático en las etapas iniciales puede favorecer un diagnóstico deficiente en países con una estructura sanitaria poco desarrollada. Algunos trabajos describen una mortalidad en el mundo de aproximadamente 500.000 mujeres al año.

En España, este mismo estudio indica que se diagnosticaron 1948 casos de cáncer de cérvix en 2008 (incidencia de 6,3 casos por cada 100.000 mujeres) y 712 fallecimientos. Estas cifras corresponden al segmento medio / bajo europeo (documentos de consenso SEGO 2008). En España, el cáncer de cérvix representa el 4,5% del total de los casos de cáncer en mujeres, siendo una de las prevalencias más bajas del mundo (documentos de consenso SEGO, 2002).

Parece existir un pico de prevalencia de la infección del 20 % entre 20-24 años (Meijer *et al.*, 1998, Sellors *et al.*, 2000) mientras que en mujeres entre 35 y 40 años es del 5 % (documentos de consenso SEGO, 2002). La edad media de aparición de las lesiones

intraepiteliales se sitúa entorno a los 21-28 años, mientras que el carcinoma invasor se manifiesta principalmente entre los 41-51 años (figura 16). En la mayoría de los estudios realizados en todo el mundo, se observa un aumento de la prevalencia en edad peri o post menopáusica (Castellsagué et al., 2007) que podría estar relacionado tanto con la adquisición de nuevas infecciones mediante nuevos contactos sexuales como a la reactivación de infecciones latentes debido a la pérdida de eficacia del sistema inmune (Trottier y Franco 2006, de Sanjosé et al., 2007). La relación entre la edad y la prevalencia de la infección y del cáncer de cérvix, sugieren que el período que transcurre entre la infección y el desarrollo del carcinoma invasor es de 10-15 años y que la persistencia de la infección es un factor importante para la transformación neoplásica. La población femenina de más de 40 años, que tiene una infección persistente por papilomavirus de alto riesgo, es el grupo de mayor riesgo para el desarrollo de un carcinoma invasor de cérvix.

En las lesiones precursoras se identifica el tipo 16 en aproximadamente el 25% de los casos, seguido del tipo 18 (7,5%) y el 31 (6,1%) (Bosch y de Sanjosé, 2007). En el cáncer cervical el VPH 16 es el tipo más prevalente (64.5%), seguido por el VPH 33 (6.1%), el tipo 18 (5.8%), el 31 (3,6%) y el 45 (3,5%) (documentos de consenso SEGO 2008).

En varios estudios realizados con métodos de alta especificidad que detectan un amplio número de genotipos, el análisis de muestras con lesiones precursoras (LSIL, HSIL, condilomas y ASCUS) indica que VPH 16 es el genotipo de alto riesgo más frecuente (entre 14-31 % dependiendo del estudio) seguido de los genotipos 31, 33, 18 y 45 (entre un 3-6 %). Respecto a los tipos de bajo riesgo, el más frecuente es el genotipo VPH 6 (entre 14-43 % dependiendo del estudio), seguido de los genotipos 61, 11, 70 y 44 (entre 3-19 % dependiendo del estudio) (Pista *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2012; Kulmala *et al.*, 2007).

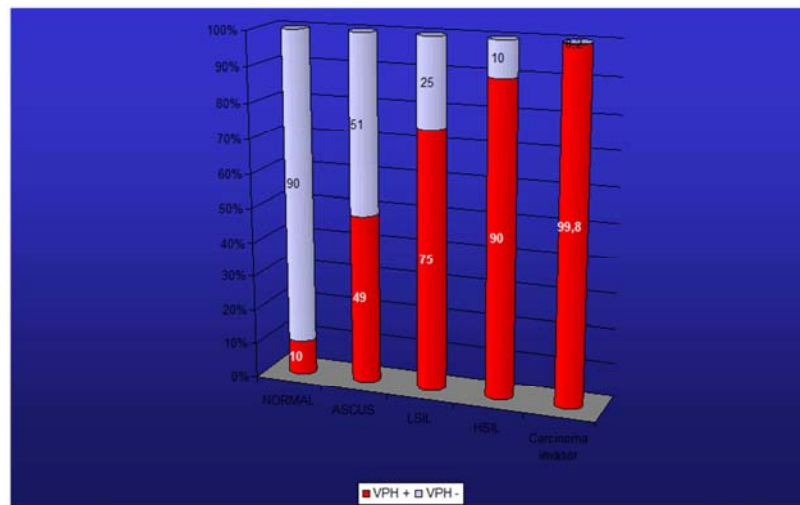


Figura 15. Frecuencia de portadoras de Papilomavirus en función del grado de la lesión. Se detectó ADN de Papilomavirus en el 10 % de la población femenina sin alteraciones celulares; en el 49 % de los estudios citológicos dudosos (ASCUS), en el 29-75 % de las lesiones de bajo grado (LSIL); en el 90 % de las lesiones de alto grado (HSIL) y en el 99,8 % de los carcinomas invasores. Datos proporcionados por el estudio ALTS.

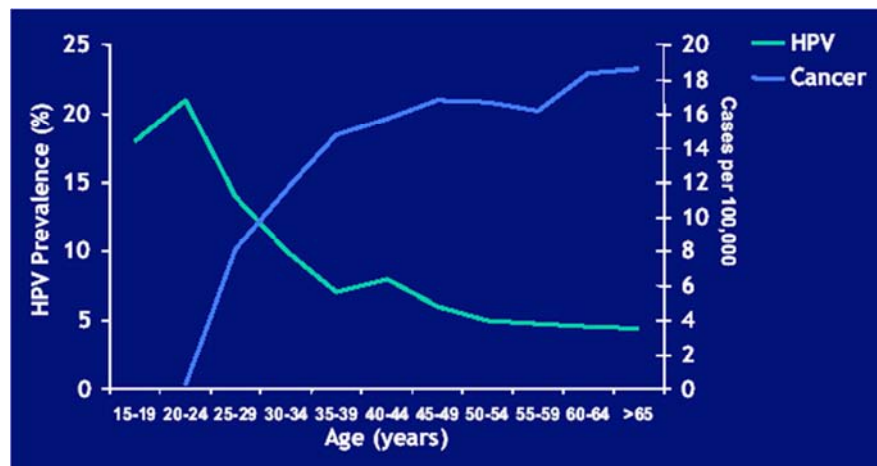


Figura 16. Frecuencia de la infección por papilomavirus y del cáncer en función de la edad. Tomado de: <http://www.microbio.uab.edu/medmicro/Lectures/brokerppt2.pdf>. Datos de *NCI SEER Data, 1990-1994*; Melkert *et al.*, 1993.

4 Factores de riesgo para las lesiones cervicales

El cáncer cervical es una enfermedad de transmisión sexual por lo que la conducta sexual es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de las neoplasias intraepiteliales y del cáncer cervical.

1) **Conducta sexual:** se han descrito que el riesgo de lesión cervical aumenta con el número de compañeros sexuales, la actividad sexual del compañero (Schneider *et al.*, 1988; Kjaer *et al.*, 1991; Shiffman, 1995; Burk *et al.*, 1996), la edad temprana para el primer coito (Edeibiri, 1990), la no utilización de preservativos y las relaciones sexuales con hombres no circuncidados.

2) **Uso de anticonceptivos orales:** el riesgo de cáncer de cérvix aumenta con su administración prolongada.

3) **Estado inmunológico:** se ha descrito una mayor prevalencia de neoplasias intraepiteliales cervicales en pacientes con inmunodeficiencia (Shah *et al.*, 1997; Luque *et al.*, 1999; Temmerman *et al.*, 1999) o inmunosuprimidas (Koutsky *et al.*, 1992).

4) **Estado hormonal:** se ha observado una exacerbación de las lesiones durante el embarazo.

5) **Tabaquismo:** la frecuencia del cáncer cervical en mujeres fumadoras es el doble que en las no fumadoras (Franco, 1996).

6) **Co-infección por *Chlamydia trachomatis* o herpesvirus:** las mujeres con infecciones asociadas a estos patógenos tienen mayor riesgo de desarrollar un cáncer cervical que las no afectadas (Edelman *et al.*, 2000; Baseman y Koutsky, 2005). Parece deberse a la cervicitis crónica provocada por estos agentes.

7) **Predisposición genética:** determinados perfiles genéticos del sistema HLA y determinados polimorfismos en el gen p53 predisponen para el desarrollo de la neoplasia (Gostout *et al.*, 1998).

8) **Número de embarazos:** se ha descrito un riesgo superior en mujeres con una alta paridad.

Finalmente, existen otras vías de transmisión diferentes a la sexual. La infección con VPHs genitales se encuentra en ocasiones en mujeres vírgenes, bebés y niños. Existen evidencias de transmisión horizontal, vertical y perinatal de VPHs.

5 Otras patologías asociadas a los Papilomavirus

5.1 Verrugas

Las verrugas son tumores cutáneos benignos. Existen diferentes tipos de verrugas, dependiendo del tipo de Papilomavirus causante. Cada tipo de Papilomavirus rige en gran medida la localización y la naturaleza de la lesión. Pueden aparecer en cualquier región de la piel, pero se localizan principalmente en las manos. También pueden aparecer en regiones queratinizadas de los aparatos genitales masculino y femenino (piel del prepucio, escroto, labios mayores, etc.). Los principales tipos de VPH asociados verrugas comunes son debidas a infección con VPH6 o VPH11, siendo el primero el tipo predominante.

Las verrugas plantares se encuentran en las plantas de las manos y de los pies. Crecen hacia el interior y pueden llegar a ser muy dolorosas. Los principales tipos de VPH asociados verrugas plantares son VPH1, 2 y 4.

5.2 Condilomas

Los condilomas son verrugas generalmente exofíticas de las mucosas. La mayoría de los condilomas son anogenitales (denominados de forma inexacta verrugas venéreas) pero también se encuentran en otras mucosas. En el hombre, los condilomas aparecen generalmente en el frenillo, en el surco coronal y en el meato urinario, y en ocasiones se extienden por la uretra en dirección proximal. En la mujer, aparecen en los labios, la vulva, alrededor del ano, en la vagina y en el cuello uterino. La mayor parte de los condilomas están causados por papilomavirus de los tipos 6 y 11.

Estrictamente, los condilomas son lesiones de desarrollo benigno. A pesar de ello, en ocasiones se denominan *condilomas atípicos* a las neoplasias intraepiteliales cervicales de grado bajo (LSIL) y en general a lesiones precancerosas.

5.3 Epidermodisplasia verruciforme

La epidermodisplasia verruciforme es una rara enfermedad de la piel, caracterizada por la aparición de lesiones -planas o maculares en las regiones expuestas al sol. Inicialmente están diseminadas por todo el cuerpo, pero acaban confluyendo. Suele estar asociada a una inmunodeficiencia o a una inmunosupresión. Los pacientes son portadores de papilomavirus poco habituales (VPHs 5 y 8 principalmente). Aproximadamente el 30 % desarrolla un carcinoma de células escamosas de la piel.

5.4 Enfermedad de Bowen

La enfermedad de Bowen es un carcinoma epidermoide *in situ*, que normalmente se presenta en una sola placa eritematosa, remarcada y alargada, parecida a un eccema o a la psoriasis. Puede progresar hacia un carcinoma de células escamosas y no suele remitir espontáneamente. Los principales tipos de VPH asociados a esta enfermedad son VPH16 y 18.

5.5 Papulosis bowenoide

La papulosis bowenoide es una lesión morfológicamente similar a la enfermedad de Bowen. Consiste en pequeñas máculas rojizas de 2-10 mm, generalmente diseminadas. Normalmente aparece en el glande, pero también se han encontrado en la vulva. Histológicamente no puede distinguirse de la enfermedad de Bowen, ni de otros carcinomas *in situ*. La mayoría de los casos descritos han tenido un desarrollo benigno, y muchos han experimentado una regresión espontánea.

5.6 Queratosis actínica

La queratosis actínica es una forma premaligna de una neoplasia de los queratinocitos. Consiste en pápulas hiperqueratósicas que aparecen en zonas expuestas al sol, principalmente en el dorso de las manos y la frente. El potencial de degeneración maligna suele ser bajo.

5.7 Enfermedad de Buschke-Löwenstein

La enfermedad de Buschke-Löwenstein (condiloma gigante) es un tumor maligno que puede evolucionar hacia un carcinoma de células escamosas. Consiste en espectaculares excrecencias de color pardo oscuro, con aspecto de coliflor que pueden presentarse en el pene, la vulva y la región anorectal. La mayor parte de los casos están causados por el tipo VPH6.

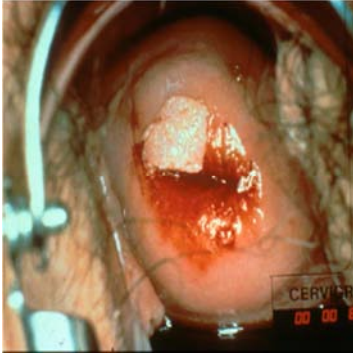


Figura 17. Condiloma de exocérnix. Fuente: <http://www.microbio.uab.eu/medmicro/>



Figura 18. Condilomas vulvares visualizados mediante el test del ácido acético. Fuente: Genitoanal Papilloma Virus Infection, von Krogh y Rylander

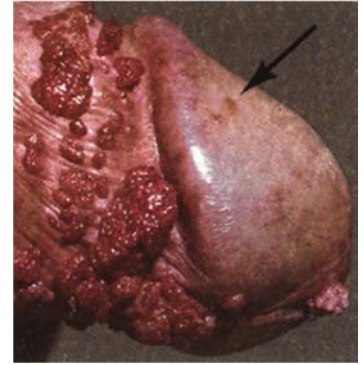


Figura 19. Condiloma acuminado en la cavidad prepucial. La flecha indica verrugas comunes en el glande. Fuente: Genitoanal Papilloma Virus Infection, von Krogh y Rylander



Figura 20. Verrugas de carnicero asociadas a VPH7. Fuente: <http://www.microbio.uab.eu/medmicro/>



Figura 21. Papiloma en el ojo. Fuente: <http://www.microbio.uab.eu/medmicro/>



Figura 22. Papiloma oral. Fuente: <http://www.microbio.uab.eu/medmicro/>



Figura 23. Tumor Buschke-Löwenstein. Fuente: Santos-Rancaño Elsevier Vol. 91. Núm. 08. Octubre 2013.



Figura 24. Papulosis bowenoide en el glande. Fuente: Genitoanal Papilloma Virus Infection, von Krogh y Rylander

6 Diagnóstico de las lesiones cervicales

6.1 Algoritmos de cribado y de diagnóstico de las lesiones cervicales

Actualmente, el diagnóstico de las lesiones cervicales se basa en el grado de alteración del epitelio y en la detección de VPHs. No existe un único protocolo consensuado, pero los datos epidemiológicos y clínicos sugieren cuál debe ser la práctica clínica más adecuada.

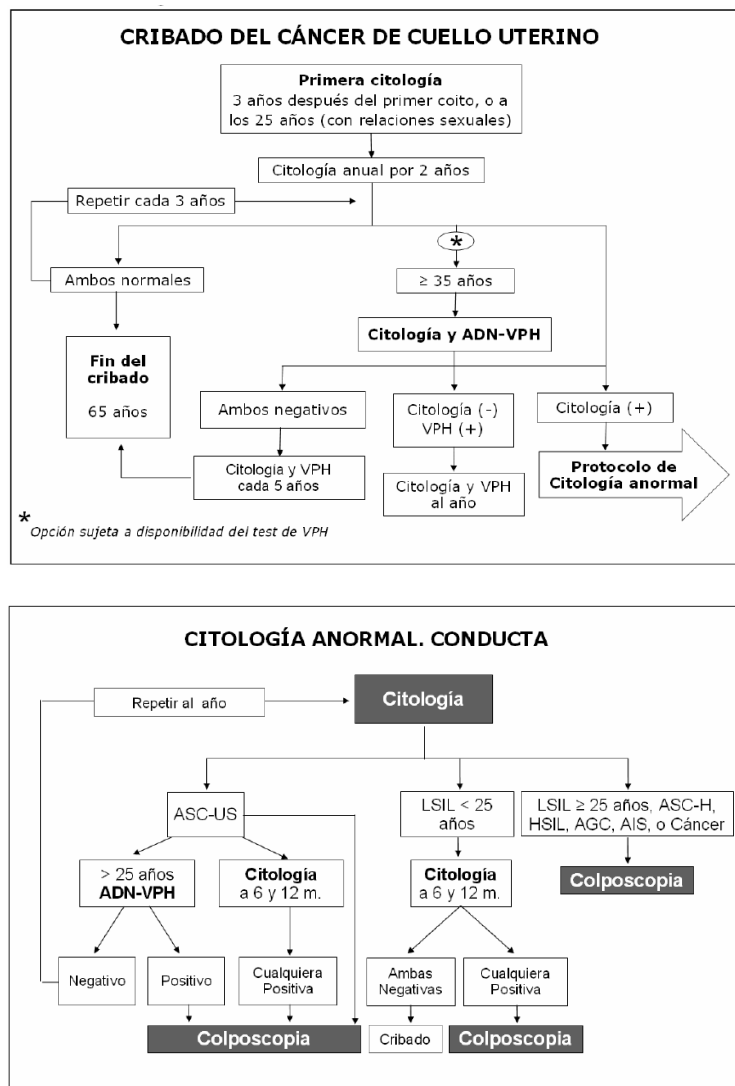


Figura 25. Algoritmo de cribado y de diagnóstico/terapéutico recomendado para la prevención del cáncer cervical. La detección e identificación de VPHs está especialmente indicada para las lesiones de bajo grado (LSIL), ya que permite determinar su potencial evolutivo, y las lesiones clasificadas como AS-CUS, para dilucidar la naturaleza de las atipias. Fuente: Progresos de Obstetricia y ginecología, nº49 suplemento 2 (noviembre, 2006).

6.2 Exploración visual y colposcopia

La exploración visual permite detectar algunas lesiones genitales. Puede complementarse con la aplicación de ácido acético al 3-5% (figura 20) o yodina sobre la mucosa. Ambas sustancias reaccionan con el epitelio dañado y permiten delimitar el borde del área afectada. La exploración visual no es suficiente para establecer un diagnóstico preventivo, ya que la mayoría de las lesiones pasan desapercibidas por su aspecto y localización. La colposcopia consiste en la observación del epitelio cervical mediante un colposcopio (lupa de 10-20 aumentos con un foco de luz). En muchas ocasiones la realización de una colposcopia se acompaña de una biopsia.

6.3 Diagnóstico citológico (prueba de Papanicolau) e histopatológico

El estudio citológico de células cervicales exfoliadas o test de Papanicolau constituye la base del diagnóstico de las lesiones cervicales. Consiste en la preparación de un frotis a partir de un legrado de células de la mucosa genital practicado con un escobillón. Las células cervicales son fijadas en un porta y teñidas mediante el método de Papanicolau. El estudio citológico permite detectar *coilocitos* (células epiteliales modificadas relacionadas con una infección por VPHs) y valorar el grado de atipia citológica (LSIL/HSIL).

La prueba de Papanicolau tiene un relativo carácter preventivo ya que la mayoría de las portadoras del virus no presenta alteraciones citológicas. Tampoco permite deducir el potencial evolutivo de una lesión de bajo grado. Metodológicamente, la preparación del frotis conlleva algunos problemas, ya que las células pueden apelmazarse, desecarse o deformarse. Por otro lado, el diagnóstico se establece en base a la morfología celular, por lo que está sujeto a la subjetividad del patólogo. La mortalidad del cáncer cervical ha descendido el 74% entre 1955 y 1992, gracias a su implantación en los análisis ginecológicos de rutina. La citología en fase líquida es una variante de la citología convencional. La muestra se coloca en una solución que evita que las células se apelmacen, se sequen o se deformen. Mediante un dispensador automático, la toma es diluida convenientemente y las células son extendidas en una fina capa sobre el porta. Con este sistema, se obtienen mejores preparaciones, lo que permite una visualización más eficaz del tejido y obtener menos resultados inciertos.

El estudio histológico se realiza mediante la toma de una biopsia. En los genitales externos se resecciona el tejido afectado. Las biopsias exocervicales se realizan en la zona lesionada mediante un sacabocados, mientras que las muestras del canal endocervical se realizan mediante una conización cervical, simultáneamente diagnóstica y terapéutica. El tejido es fijado en parafina y estudiado en cortes de 1-5 micras. El resultado de la biopsia suele informarse según la clasificación CIN I-III, en lugar de la denominación LSIL/HSIL.

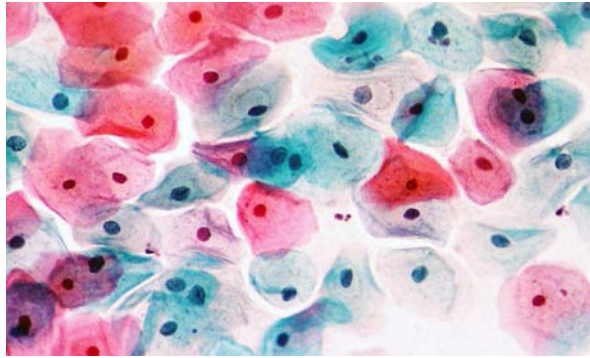


Figura 26. Células exfoliadas de un tejido cervical sano (tinción de Papanicolau x250). Al microscopio óptico, se observan las células muertas superficiales de color rosado, y las vivas de las capas basales de color azul. El diagnóstico se establece por la morfología celular y extracelular. Mediante el estudio citológico también pueden detectarse infecciones causadas por bacterias, hongos o virus. Tomado de <http://www.anapat.com.mx>

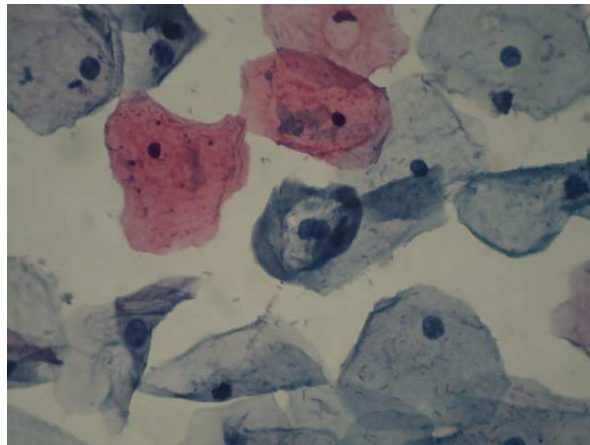


Figura 27. Lesión cervical asociada a VPHs (tinción de Papanicolau 200x). Se observan coilocitos caracterizados por presentar núcleos grandes y una vacuola perinuclear que desplaza al citoplasma (en el centro de la imagen). Tomado de la página web de la Sociedad Argentina de Citología. <http://sociedaddecitologia.org.ar>.

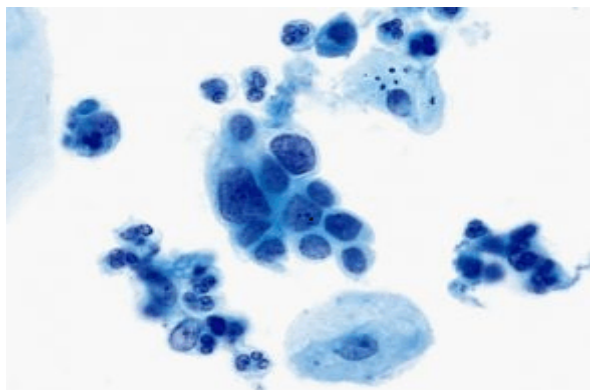


Figura 28. Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL) (Citología Líquida, 60X). Tomada del boletín oncológico del área sanitaria de Teruel (www.boloncol.com).

7 Métodos de detección e identificación de papilomavirus

La detección e identificación de VPHs es una prueba complementaria y/o alternativa al estudio citológico. Está indicada especialmente en los resultados dudosos del estudio citológico (ASC-US y AGUS) y para predecir el potencial oncogénico en las lesiones de bajo grado. También permite confirmar el diagnóstico y predecir el potencial evolutivo a corto plazo en las lesiones de alto grado. Asimismo, es de utilidad como prueba de cribado en población asintomática para complementar la baja sensibilidad del test de Papanicolaou, y también como prueba para realizar el seguimiento post-tratamiento (conización, resección, radioterapia, quimioterapia o histerectomía). Los métodos de detección de VPH se basan en la detección del ácido nucleico vírico ya que las pruebas serológicas muestran una escasa correlación con la clínica. Actualmente los sistemas más utilizados para la detección del ADN vírico utilizan una de las siguientes estrategias:

- 1) Métodos basados en PCR convencional (genérica) + sistema de identificación de VPHs
- 2) Métodos basados en PCR a tiempo real
- 3) Detección del ARN de E6 y E7
- 4) Hibridación en solución (captura de híbridos)

7.1 Métodos basados en la PCR convencional genérica asociada a un sistema de identificación de VPHs

7.1.1 Amplificación de secuencias consenso de los papilomavirus

Se basan en la utilización de oligonucleótidos consenso, diseñados en regiones conservadas, como los ORFs L1, E6 y E7 (Manos *et al.*, 1989; Gregoire *et al.*, 1989; Fujinaga *et al.*, 1991; Snijders *et al.*, 1991; Evander *et al.*, 1992; Contorni y Leoncini, 1993; Pizzighella *et al.*, 1993; Shamanin *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1995). Estos sistemas rinden un producto de amplificación común a varios genotipos, cuyo análisis mediante una técnica complementaria permite la identificación del tipo vírico (tabla 6). Se han utilizado dos sistemas de oligonucleótidos de forma mayoritaria, cuyas características se describen a continuación:

Los oligonucleótidos degenerados MY11 y MY09 (Manos *et al.*, 1989) permiten obtener un producto de amplificación común del gen L1 de 450 pb aproximadamente, dependiendo del tipo vírico. A pesar del tiempo transcurrido desde el diseño de estos iniciadores de la PCR, la práctica demuestra que pueden seguir utilizándose para la detección de la mayoría de los VPHs descritos recientemente. El sistema basado en los oligonucleótidos PGMY11/PGMY09 (Gravitt *et al.*, 2000) es en realidad una mezcla de 5 oligonucleótidos en sentido directo homólogos a MY11 y 13 en sentido inverso homólogos a MY09.

Los oligonucleótidos GP5/GP6 permiten obtener un fragmento del gen L1 de 140 pb aproximadamente, dependiendo del tipo vírico. Los oligonucleótidos GP5/GP6 pueden utilizarse internamente al fragmento MY11-MY09, para la realización de amplificaciones anidadas. El sistema basado en los oligonucleótidos GP5+/GP6+ (de Roda *et al.*, 1995) permite aumentar el espectro de tipos víricos detectados con los oligonucleótidos originales.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición (VPH6)	Características	Longitud amplicón (aproximada)	Especificidad	Referencia
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAYGG	6722-6741	Amplifica una región conservada de la región L1	450 pb	VPHs mucosotrópicos	Manos et al., 1989
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	7151-7170				
PGMY11	Homólogos a MY11		Mezcla de 18 oligonucleótidos homólogos a MY11/MY09 sustituyendo las indeterminaciones	450 pb	VPHs mucosotrópicos	Gravitt et al., 1998, 2000
PGMY09	Homólogos a MY09					
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	6764-6786	Amplifica una región conservada de la región L1	150 pb	VPHs mucosotrópicos	A J van den Brule (1990)
GP6	GAAAATAAACTGTAATCA	6975-6902				
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	6964-6786	Versión extendida de GP5/6	150 pb	VPHs mucosotrópicos	Jacobs et al., 1995; de Roda Husman (1995)
GP6+	GAAAATAAACTGTAATCATATTC	6975-6902				
L1C1	CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT		Amplifica una región conservada de la región L1	244-256 pb	VPHs mucosotrópicos	Shidara et al., 1994
L1C2-1	TACCCTAAATACTCTGTATTG					
L1C2-2	TACCCTAAATACCCTATATTG					

Tabla 6. Oligonucleótidos genéricos utilizados como iniciadores de la PCR para la detección de papilomavirus en muestras clínicas.

7.1.2 Caracterización de los productos de amplificación

La PCR permite obtener cantidades detectables de una secuencia específica de ADN, pero requiere de una técnica complementaria que posibilite visualizar y/o caracterizar los productos de la amplificación. Desde el punto de vista clínico es muy importante identificar el tipo vírico presente en la lesión, o al menos conocer si se trata de un virus del alto o bajo riesgo. Por ello, la detección de VPH debe combinarse con un sistema de identificación del tipo vírico:

- **Secuenciación del ADN:** es el método de referencia para la identificación de papilomavirus. No obstante, no suele ser de aplicación en el laboratorio de rutina dados los costes, el tiempo necesario para la realización de la técnica y las necesidades de manipulación.

- **Análisis de fragmentos de restricción (RFLP):** se basa en la digestión de los productos de PCR con endonucleasas de restricción y en la identificación de patrones de restricción específicos. Las principales ventajas de este método son la sencillez y la rapidez, unido a la posibilidad de discriminar entre un amplio espectro de tipos víricos, si se utilizan combinaciones adecuadas de enzimas de restricción. El principal inconveniente es la menor sensibilidad, cuando la visualización de los fragmentos se realiza mediante análisis electroforético. El sistema *Papitype (Progenie molecular S.L.)* desarrollado a partir de los hallazgos realizados en el presente trabajo, está basado en esta estrategia. El sistema comercial *PVH-Fast (Genómica S.A.U.)*, actualmente descatalogado, está basado en este sistema. Un gran número de trabajos de investigación utilizan esta estrategia.

- **Métodos de identificación basados en hibridación genómica de los productos de amplificación:** consiste en la unión de productos de amplificación marcados químicamente, a sondas de ADN específicas de los diferentes tipos víricos, previamente fijadas en soportes sólidos. Algunos de los sistemas más utilizados se explican brevemente a continuación:

Fujirebio dispone del sistema comercial *INNO-LiPA® HPV Genotyping Extra* basado en la utilización de oligonucleótidos específicos de los tipos víricos fijados en una membrana de nylon. Se suministran las tiras de nylon ya preparadas con sondas específicas o semi-específicas, que permiten distinguir entre 28 tipos de Papilomavirus.

Roche Molecular Systems dispone de un sistema similar, *Linear Array HPV Assay* que permite identificar entre 37 tipos. Está basado en la amplificación del fragmento de 450 pb del gen L1 delimitado por los oligonucleótidos MY11 y MY09. Actualmente, esta compañía dispone del sistema *AMPLICOR® Human Papillomavirus Test* para la detección y el tipado de Papilomavirus, que permite detectar 13 tipos de alto riesgo, con un límite de detección de 100 copias del genoma vírico por cada ensayo.

Genomica dispone del sistema comercial *CLART® HPV2*. Está basado en la amplificación del fragmento MY11-MY09 marcado con biotina y en su hibridación con una matriz de baja densidad o *array* de oligonucleótidos dispuesta en un tubo o placa microtriter. Permite identificar 35 tipos diferentes de VPHs.

Luminex dispone del sistema *X-map*. Consiste en una hibridación sobre nanosferas en suspensión. Cada nanosfera se fabrica con un polímero plástico de una tonalidad específica de rojo distinguible de las demás. Cada nanosfera es recubierta con una sonda diferente, lo que permite identificar el ADN de la muestra mediante hibridación. El analizador de Luminex utiliza tecnología de citometría para conseguir un flujo de esferas aisladas. Además incorpora dos fuentes de luz láser que inciden simultáneamente sobre la misma nanosfera. Una de ellas excita el color rojo de la nanosfera y la distingue del resto. La otra luz emite en la longitud del verde y permite identificar en qué nanosfera se ha producido hibridación con el ADN de la

muestra (marcado químicamente). La aplicación desarrollada para la detección e identificación de VPHs permite detectar 24 tipos diferentes. Según algunos estudios, este sistema presenta una sensibilidad ligeramente inferior a la obtenida mediante la amplificación del fragmento MY11-MY09 y visualización en gel de agarosa del producto de amplificación (Jiang *et al.*, 2006).

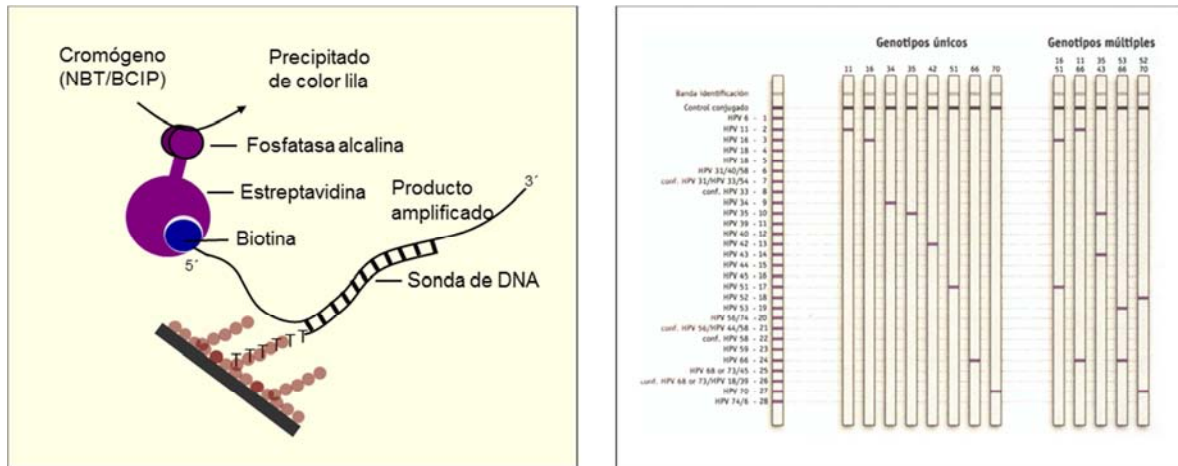


Figura 29. Hibridación inversa (*reverse-blot*). Izquierda: esquema del funcionamiento de la hibridación inversa. Los oligonucleótidos utilizados como sondas de hibridación han sido fijados en tiras de nylon. El producto de amplificación (marcado con biotina) hibrida con la sonda complementaria y es reconocido por el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina. La hibridación se detecta mediante un producto coloreado. Derecha: tiras de nylon preparadas con las sondas específicas de tipo. Cada banda es portadora de un oligonucleótido cuya secuencia es específica de un tipo de papilomavirus. La hibridación se produce en la banda portadora del oligonucleótido complementario al producto de amplificación obtenido de la muestra clínica.

7.2 Métodos basados en PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real es una variante de la PCR convencional cuyo objetivo es amplificar y cuantificar el producto amplificado. Para ello, se utilizan sondas marcadas con fluoróforos que emiten fluorescencia en caso de amplificación. El ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento significativo en la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra.

Roche diagnostics ha desarrollado el sistema comercial *Cobas® HPV Test* basado en esta técnica. En el mismo ensayo se consiguen detectar 14 tipos de VPH de alto riesgo e identificar dos de ellos (VPH 16 y VPH 18) en diferentes canales. Además, en otro canal diferente, se amplifica el gen de la beta-globina como control interno. Su uso está muy extendido. Este sistema está aprobado por la FDA ("Food and drugs administration").

El sistema *BD Onclarity HPV Assay* permite detectar 14 tipos de VPH de alto riesgo mediante esta técnica. Este método incluye la amplificación de un fragmento del gen de la beta globina humana como control interno. Los resultados son interpretados mediante un programa informático.

Abbot dispone del sistema comercial *RealTime High Risk HPV* basado en esta técnica. Consigue detectar 14 VPH de alto riesgo y genotipar los VPH 16 y 18. Al igual que en los sistemas anteriores, utiliza la amplificación del gen de la beta-globina como control interno.

Anyplex™ II HPV HR Detection (Seegene) se basa en PCR a tiempo real combinándolo con las tecnologías TOCE y DPO para detectar e identificar 14 tipos de VPH de alto riesgo en una sola reacción. Además, permite cuantificar la carga viral. También utiliza un sistema de control interno. Los resultados se interpretan con el programa *Seegene Viewer*.

7.3 Métodos basados en la detección del ARN de E6 y E7

Los métodos basados en el análisis del ARN de los ORFs E6 y E7 permiten determinar no sólo la presencia del virus, sino el potencial oncogénico, ya que la expresión de los productos génicos de E6 y E7 es un marcador de la conversión de las células en malignas.

El sistema comercial *Aptima HPV Assay® (GenProbe)* permite detectar cualitativamente 14 tipos de VPHs en tres pasos que tienen lugar en el mismo tubo: captura de la diana, amplificación mediante TMA ("Transcription-Mediated Amplification") y detección de los productos de amplificación mediante HPA ("Hybridization Protection Assay"). El sistema incluye un control interno. Este sistema está aprobado por la FDA ("Food and Drugs Administration").

7.4 Hibridación en solución y captura de híbridos ADN-ARN

La técnica de hibridación consiste en la incubación en solución del ADN vírico presente en la muestra con varias sondas de ARN específicas de diferentes genotipos, aprovechando la mayor estabilidad de los híbridos ADN-ARN, frente a los de ADN. No precisa una purificación previa del ADN a partir de la muestra, y puede utilizar el líquido residual de las "citologías líquidas". Es sencillo, rápido, económico y tiene la gran ventaja de que permite realizar una semi-cuantificación de la carga viral. Se trata del sistema más reproducible de todos los métodos desarrollados y la sensibilidad es sólo ligeramente inferior a la de los protocolos basados en la PCR (Ying *et al.*, 2014). Tiene el inconveniente de que el empleo de sondas específicas de tipo limita la detección a un número fijo de VPHs, no permitiendo detectar aquéllos cuya sonda no esté incluida en el sistema.

El sistema comercial *Digene HC2 HPV DNA Test (Qiagen)* se basa en esta técnica. Utiliza 18 sondas específicas de tipo, separadas en 2 soluciones con las sondas de los papilomavirus de alto (13 sondas) y bajo riesgo (5 sondas) respectivamente. Las sondas de los tipos de alto riesgo corresponden a los VPHs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Dado que las sondas están agrupadas, no permite determinar específicamente el tipo de VPH presente en la muestra ni las coinfecciones.

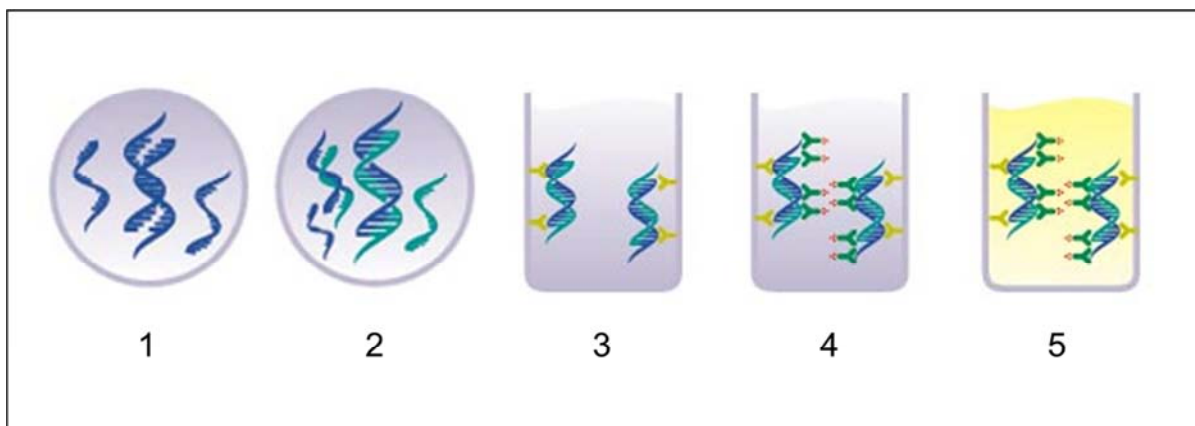


Figura 30. Captura de híbridos. (1) El ADN aislado a partir de la muestra biológica es desnaturalizado en una solución alcalina sin ningún tratamiento previo (2) Se incubó en solución con una mezcla de sondas de ARN de cadena sencilla, complementarias a las secuencias de ADN de varios tipos de Papilomavirus. (3) La solución se dispensa en un pocillo de microplaca, sensibilizado con anticuerpos específicos que reconocen y retienen a los híbridos ADN-ARN. (4) El pocillo es incubado con un nuevo anticuerpo que también tiene afinidad por las moléculas híbridas, en esta ocasión marcado con fosfatasa alcalina. (5) En presencia de un sustrato luminiscente se detecta la hibridación y por tanto la presencia de ADN vírico en la muestra. La señal es cuantificada por un luminómetro. Tomado de <http://www.digene.com>

Nombre	Fabricante	Método	Diana	Especificaciones	Tipos detectados	Control Interno
Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test	Digene Corporation (Actualmente Qiagen)	Hibridación sondas ARN y detección por quimioluminiscencia	-	Detecta tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68,		Calibradores positivos y negativos en cada serie
CareHPVT M Test	Qiagen	Versión simplificada del anterior	-	Detecta tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68		-
Digene® HPV Genotyping PS Test, RUO	Qiagen	PCR + hibridación reversa	L1 (GP5+/6+)	Detecta e identifica tipos 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82		-
Cobas 4800 HPV Test	Roche Molecular Systems, Inc.	PCR multiplex a tiempo real	L1	Detecta tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 Identifica tipos 16 y 18		Gen de la Beta-Globina
AMPLICOR HPV Test	Roche Molecular Systems, Inc.	PCR + hibridación reversa	L1	Detecta e identifica tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68		Gen Beta-Globina
Roche Linear Array HPV Genotyping Test	Roche Molecular Systems, Inc.	PCR + hibridación reversa	L1 (PGMY09/11)	Detecta e identifica tipos 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39, y CP6108		-
SPF10-INNO LiPA	Fujirebio	PCR + hibridación reversa	L1 (SPF10)	Detecta e identifica 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 74 y 82		Gen humano HLA-DBP1
Aptima HPV 16 18/45 Genotype Assay	Gen-Probe, Inc.	Detecta ARNm de E6 y E7	E6 y E7	Diferencia el VPH 16 del 18 o 45		Transcritos de ARN
APTIMA HPV Test	Gen-Probe, Inc.	Detecta ARNm de E6 y E7	E6 y E7	Detecta tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68		Transcritos de ARN
Cervista HPV HR Test	Hologic Inc	PCR isoterma	-	Detecta tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68		Histona 2 humana (HIST2H2BE)
Cervista HPV 16/18	Hologic Inc	PCR isoterma	-	Identificación de VPH 16 y 18 en muestras + para Cervista HPV HR Test		-
BD Onclarity HPV Assay	Becton, Dickinson and Company	PCR a tiempo real	-	Detecta tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 Identifica los tipos 16, 18, 31, 45, 51 y 52		Gen Beta-Globina
AVantage HPV E6 Test	Arbor Vita Corporation	Tiras con anticuerpos monoclonales	E6 / E7	Detecta e identifica los tipos 16, 18 y 45 y solo Detecta tipos 31, 33, 52 y 58		-
Direct E6/E7 Whole-cell ELISA	OncoHealth Corporation	EIA	E6 / E7	Detecta 14 tipos de VPH de VPH-AR		-
Direct E6/E7 Flow Cytometry Assay	OncoHealth Corporation	Citometría de flujo	E6 / E7	Detecta 14 tipos de VPH de VPH-AR		-
EIA kit HPV GP HR	Diassay	EIA	L1 (GP5+/GP6)	Detecta 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59		No dispone

			+))		
RealTime High Risk HPV test	Abbott Molecular	PCR a tiempo real	L1 (GP5+/GP6 + modificados)	Detecta tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 Identifica 16 y 18	Gen Beta-Globina
PreTect HPV-Proofer	NorChip	RT-PCR isotérmica a tiempo real	E6 / E7	Detecta tipos 16, 18, 31, 33 y 45	Gen Beta-Globina
NucliSENS EasyQ HPV	Biomérieux	RT-PCR isotérmica a tiempo real	E6 / E7	Detecta tipos 16, 18, 31, 33 y 45	-
Clart HPV 2	Genómica	PCR + hibridación en microarrays	L1 (MY11/MY09)	Detecta e identifica tipos 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89	Gen CFTR (control extracción) y plásmido modificado (control de amplificación)
HPV Direct Flow Chip Kit	Master Diagnostica	PCR + hibridación reversa	L1	Detecta e identifica 36 tipos de HPV de VPH-AR y bajo riesgo.	Fragmento de ADN genómico humano
Anyplex II HPV HR Detection	Seegene	PCR a tiempo real (DPO + TOCE)	-	Detección, identificación y cuantificación de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	
BIOPAP Kit	Biotools	PCR	L1, L2 y E6 / E7	Diferencia entre dos grupos: VPH generales (6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 y 69) y VPH oncogénicos (16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 y 67)	
GenoID real-time HPV	GenoID	PCR a tiempo real		Detecta 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.	
HPV OncoTect	Labco	Hibridación in situ de ARNm E6 y E7 + Citometría de flujo		Detecta "todos" los tipos oncogénicos	
ProDect®Chip HPV Typing	bcs Biotech SpA	PCR + Hibridación en array		Detecta e identifica 19 VPHs	
CHIPRON LCD-Array kits HPV Type 3.5	Chipron	PCR + Hibridación en array		Detecta e identifica 24 VPHs (AR Y BR)	
Luminex xMAP HPV Genotyping	Luminex	Hibridación sobre nanosferas		Detecta e identifica 26 VPHs	

Tabla 7. Sistemas comerciales más utilizados para la detección e identificación de papilomavirus en muestras clínicas.

8 Control Interno de amplificación en la PCR

8.1 Falsos negativos y positivos en la PCR

Los falsos negativos en la PCR se producen cuando por alguna causa no se genera producto de amplificación o en escasa cantidad, a pesar de la presencia del patógeno en la muestra clínica. La presencia de inhibidores de la PCR es la causa habitual del bajo rendimiento de las reacciones, ya que inhiben total o parcialmente la reacción. Entre los principales inhibidores podemos encontrar tanto componentes de la muestra clínica como compuestos añadidos durante la purificación o manipulación de los ácidos nucleicos (tabla 8). Dado que es una característica inherente a las muestras o a su procesamiento, las inhibiciones no pueden detectarse salvo que se utilicen sistemas de prevención específicos (Bessetti, 2007).

Los falsos positivos se producen cuando se obtiene un resultado positivo para determinado patógeno a partir de una muestra clínica no portadora del mismo. Las dos principales causas son las contaminaciones y las amplificaciones inespecíficas. La generación de productos inespecíficos de tamaño y/o secuencia similar al producto específico se debe a la hibridación de los oligonucleótidos y las sondas con secuencias similares de ADN humano o del propio agente infeccioso, y a su consiguiente amplificación y detección. Esta circunstancia se ve favorecida en las muestras negativas, ya que los excedentes de reactivos no utilizados favorecen la amplificación de fragmentos inespecíficos. La utilización de oligonucleótidos degenerados, como sucede en muchos protocolos para la detección de VPHs, es un factor adicional que favorece este fenómeno.

Inhibidor	Fuente	Efecto	Concentración crítica
Urea	Orina	Inhibe Taq polimerasa	> 20 mM
Sales biliares	Heces	?	?
Polisacáridos	Heces, geles agarosa	Bloquean la unión de los iones de magnesio	?
Grupo hemo (hemoglobina)	Sangre	Bloquea la Taq polimerasa	> 1 mg/ml
Proteínas (colágeno, melanina, mioglobina, Inmunoglobulina G, etc)	Tejidos varios	Bloquea la Taq polimerasa	?
iones divalentes (Ca ²⁺)	Leche, hueso	?	?
Heparina	Tubos toma de sangre	Quelante	> 0,15 UI/ml
Proteinasa K	Reactivos de purificación	Degrada la Taq polimerasa	?
Diluyentes orgánicos	Conservante de la citología líquida	?	?
Detergentes (SDS, Tween-20, Triton X-100)	Reactivos	Desnaturaliza la Taq polimerasa	SDS: > 0,005 %
EDTA	Tampón TE	Quelante	> 0,5 mM
Alcoholes	Reactivos extracción	Desnaturaliza la Taq polimerasa	Etanol: > 1% Isopropanol: > 1%
DMSO	Aditivo PCR	Inhibe Taq polimerasa	>10%
Sales (Acetato sódico, KCl, NaCl)	Reactivos	?	NaCl: > 25 mM Acetato sódico > 5 mM
Fenol	Reactivos extracción	Desnaturaliza la Taq polimerasa	>0,2 %
Polvo de los guantes de latex	Manipulación del fungible	?	?

Tabla 8. Inhibidores de la PCR presentes en la muestra clínica o añadidos durante su procesamiento.

8.2 Utilidad de un control interno de amplificación

El control interno (CI) de amplificación es un sistema para la detección de los falsos negativos (Hoorfar *et al.*, 2004). Se basa en la amplificación paralela de un fragmento diferente al del patógeno, que no depende de la presencia o no del patógeno en la muestra y por tanto siempre debe detectarse. Está constituido por un molde de ADN o ARN y unos oligonucleótidos que permiten la amplificación de un fragmento de éste y genera un producto distinguible en tamaño y/o secuencia al producto específico del patógeno. El CI puede utilizarse también para detectar problemas en la extracción del ADN o su omisión en la mezcla de amplificación. Su utilización también permite prevenir falsos positivos debidos a la amplificación de productos inespecíficos. En ausencia del ADN del agente patógeno, el CI consume el excedente de reactivo, minimizando la amplificación de secuencias no deseadas y dificultando que pueda generarse un falso positivo. Algunas de los parámetros para la implementación del CI se citan a continuación:

1) **Composición del molde:** el ácido nucleico utilizado como molde del CI debe ser del mismo tipo que el del patógeno. En el caso de la amplificación de ARN, el molde utilizado como CI debe estar compuesto por este mismo material, de forma que permita prevenir la acción de las ribonucleasas.

2) **Procedencia del molde:** pueden utilizarse componentes añadidos en alguna etapa del protocolo, o bien secuencias humanas presentes en la muestra clínica que se han co-purificado junto al ácido nucleico del patógeno. En el primer caso se pueden utilizar plásmidos o ácido nucleico de un fago (Ninove *et al.*, 2011) tales como ADN del fago T4 o ARN del fago MS2, así como cualquier otro ADN o ARN exógeno. En el segundo caso suele utilizarse el gen de la beta-globina o algún ARNm de expresión constitutiva (p.e. GAPDH).

3) **Concentración de los componentes del CI:** la concentración de los componentes del CI (especialmente el molde) debe estar ajustada para permitir su amplificación y detección, pero evitando que una concentración excesiva favorezca la competencia entre el CI y el agente infeccioso que se desea detectar, así como una cantidad insuficiente que no permita su detección en caso de una posible inhibición parcial.

4) **Etapas en la que se introducen los componentes del CI:** en el caso de que se utilice un componente añadido como molde del CI, es importante determinar la etapa en la que esto se realiza y las consecuencias que tiene. Los componentes del control interno pueden introducirse directamente en la mezcla de amplificación o durante la purificación de ácidos nucleicos. En este caso, suele efectuarse en los primeros tampones utilizados (p.e. la solución de lisis de las proteínas víricas) y permite la verificación completa del conjunto del método.

Objetivos

- 1 Desarrollar un procedimiento para detectar e identificar papillomavirus con alta especificidad y sensibilidad, que incluya un mecanismo para la detección de los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción de amplificación.

- 2 Implementar el sistema desarrollado en la práctica clínica de rutina.

- 3 Analizar los resultados obtenidos utilizando el sistema desarrollado y obtener datos epidemiológicamente significativos con muestras clínicas.

- 4 Describir nuevas variantes de papilomavirus identificadas con el método utilizado que no habían sido descritas previamente.

Materiales y Métodos

1 Material biológico

1.1 Muestras genitales, orales y anales

Las muestras utilizadas procedían de diferentes hospitales y centros de España, tomadas entre los años 2003 y 2010. Fundamentalmente consistían en escobillones y células del epitelio cervico-vaginal resuspendidas en tampón de "citología líquida". Ocasionalmente se han procesado biopsias. Los escobillones o torundas utilizados eran de diferentes tipos, principalmente de algodón seco, pero también de polímeros plásticos. No deben usarse escobillones con medio de cultivo como los usados para los análisis microbiológicos.

La toma de la muestra la realiza un ginecólogo, mediante un legrado cervico-vaginal. El procedimiento es similar a la toma realizada para el estudio citológico (test de Papanicolau). Consiste en frotar el cuello del útero, o la zona lesionada con una torunda o escobillón cervical, con objeto de descamar células epiteliales. Posteriormente, la torunda debe lavarse con una solución de suero fisiológico (cloruro sódico al 0,9%) para desprender las células recuperadas. Puede utilizarse un escobillón específico para la toma endocervical y otro para la exocervical.

1.2 Muestra de ADN genómico humano

Se ha utilizado una muestra de ADN genómico humano del autor de este trabajo, para la amplificación del fragmento de ADN heterólogo constituido por el gen CFTR y las regiones homólogas a los oligonucleótidos MY11 y MY09, que se ha utilizado como molde del control interno en las amplificaciones para la detección del ADN de los papilomavirus.

1.3 Control standard de VPH16

Se ha utilizado el Control positivo VPH 16 ("*1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA*". NIBSC code: 06/202 (107 UI/ml= 104 UI/ μ l)) como material biológico de referencia para el cálculo de sensibilidad del método de detección de VPHs desarrollado en el presente trabajo.

2 Secuencias de referencia de papilomavirus

Todas las secuencias se han obtenido del banco de secuencias del *GenBank* (base de datos de secuencias del NIH -*National Institutes of Health*- de Estados Unidos) donde están registradas las secuencias del genoma completo de la mayoría de los papilomavirus.

VPH	Acceso	VPH	Acceso	VPH	Acceso
6	L41216	52	X74481	73	X94165
6b	X00203	53	X74482	74	AF436130
11	M14119	54	U37488	81	AJ620209
13	X62843	55	U31791	82	NC_002172
16	K02718	56	X74483	83	AF151983
18	NC_001357	57	X55965	84	AF293960.1
30	X74474	58	D90400	85	NC_004762
31	J04353	59	X77858	86	NC_003115
32	X74475	61	U31793	87	NC_002627
33	M12732	62	AY395706	89	AF436128
34	X74476	66	U31794	90	AY057438
35	M74117	67	D21208	91	NC004085
35h	X74477	68	EU918769	97	DQ080080
39	M62849	69	AB027020	102	DQ080083
40	X74478	70	U21941	103	DQ080078
42	M73236	71	002644	106	DQ080082
44	U31788	72	GI1491683	108	NC_012213
45	X74479				

Tabla 9. Números de acceso de las secuencias utilizadas de los papilomavirus.

3 Extracción y purificación de ADN

3.1 Extracción de ADN vírico a partir de escobillones cervicales

Las células epiteliales son portadoras de ADN genómico humano y en el caso de las muestras positivas también de ADN de papilomavirus. La extracción de ambos se realiza simultáneamente mediante una lisis de las células epiteliales recogidas con el escobillón cervical, utilizando proteasa K en un tampón adecuado.

Procedimiento:

- 1 Añadir 1,5 mL de NaCl 0,9% al tubo que contiene el escobillón. Agitar en vórtex.
- 2 Decantar el sobrenadante en un tubo de 1,5 mL.
- 3 Centrifugar 10 min a 13.000 rpm.
- 4 Descartar el sobrenadante.
- 5 Resuspender el precipitado de células con 50 µL de solución de digestión 2x.
- 6 Añadir 50 µL de proteasa K (400 µg/mL)
- 7 Incubar 1 h a 55 °C
- 8 Inactivar la proteasa K calentando 10 min a 95 °C
- 9 Centrifugar 10 min a 13.000 rpm. El sobrenadante contiene el ADN vírico.
- 10 Tomar 5 µL del sobrenadante para la reacción de amplificación. Para ello, agitar bien éste sin llegar a resuspender el "pellet".

Solución de digestión 2x: 39 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,78 mM EDTA, 2% Tween-20.

3.2 Extracción de ADN vírico a partir de tejido parafinado

Las biopsias cervicales se incluyen en bloques de parafina que posteriormente son cortados con el microtomo con el objeto de realizar el estudio histológico. Existen muchos protocolos para "desparafinar" el tejido y proceder a la extracción del ADN. Cabe destacar que durante el proceso de fijación, el tejido es sometido a la acción de disolventes orgánicos que pueden dañar el ácido nucleico, por lo que no es recomendable la utilización de este tipo de muestras para obtener ADN, como molde para las reacciones de amplificación. Las muestras se procesan siguiendo el sistema comercial automatizado de purificación de ácidos nucleicos *Maxwell 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega)*.

Procedimiento:

- 1 Puesta en marcha del equipo.
 - 1.1 Presionar el botón de encendido.
 - 1.2 Verificar que el instrumento indica "LEV" y "RSCH" (modo de funcionamiento).
 - 1.3 Seleccionar la opción "run" de la pantalla del menú con el botón "run/stop".
 - 1.4 Elegir el método DNA y apretar "run/stop".
 - 1.5 Seleccionar "FFPE/Cells".
 - 1.6 Verificar la utilización del kit de extracción adecuado.
 - 1.7 Abrir la puerta y volver a apretar el botón "run/stop" para extraer la plataforma.
- 2 Preparación de la plataforma
 - 2.1 Colocar los cartuchos en la plataforma de forma que esté equilibrada. El émbolo en el primer pocillo y el tubo de elución abierto en los agujeros.
 - 2.2 Añadir 50 µL de "elution buffer" en el tubo de elución.
- 3 Preparación de las muestras
 - 3.1 Realizar 1-5 cortes con una cuchilla estéril a partir del bloque que contiene el tejido.
 - 3.2 Eliminar la parafina sobrante alrededor del tejido con una cuchilla estéril tanto como sea posible.
 - 3.3 Colocar los cortes en un tubo de centrifuga de 1,5 mL.
 - 3.4 Resuspender el precipitado de células con 50 µL de solución de digestión 2x.
 - 3.5 Añadir 50 µL de proteasa K (400 µg/mL).

- 3.6 Incubar 1 h a 55 °C.
- 3.7 Inactivar la proteasa K calentando 10 min a 95 °C.
- 3.8 Pipetear el buffer de lisis del último pocillo del cartucho y mezclarlo con los 100 µL de la muestra.
- 3.9 Volver a pipetear esa mezcla en el último pocillo del cartucho.

Finalmente, colocar la plataforma dentro del equipo presionando el botón "run/stop". Cerramos la puerta. Cuando finaliza la extracción abrir la puerta y sacar la plataforma.

- 4 Recuperación del ADN
- 4.1 Centrifugar 5 min a 13.000 rpm.
- 4.2 Pipetear por las paredes todo el volumen de ADN eluido y pasarlo a un tubo de 1,5 mL nuevo.
- 4.3 Eliminar el tubo con las bolas magnéticas (en algunos casos pueden inhibir las PCRs).
- 4.4 Etiquetar el tubo que contiene el ADN.

3.3 Extracción de ADN vírico a partir de células cervicales resuspendidas en tampón de citología líquida

Previamente a la extracción de ADN, las células resuspendidas en el tampón de citología líquida son concentradas mediante centrifugación. A contiución se extrae el ADN aplicando el siguiente protocolo anterior *Maxwell 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega)* excepto en el paso de preparación de la muestra que se seguirá el siguiente procedimiento:

Procedimiento:

Preparación de las muestras:

- 1 Centrifugar 1,5 mL a 13.000 rpm durante 5 min. Descartar el sobrenadante (excepto 100 mL).
- 2 Repetir el paso en el mismo tubo hasta obtener un precipitado de aproximadamente 25 µg.
- 3 Resuspender el precipitado en 100 mL del propio sobrenadante y proceder con el protocolo de purificación explicado anteriormente (*Maxwell 16 Cell LEV DNA Purification Kit –Promega-*).

3.4 Extracción de ADN vírico a partir de orina

La detección del ADN de papilomavirus en muestras de orina está indicada en los casos de lesiones uretrales. La extracción del ADN vírico a partir de las células epiteliales recogidas en la orina se ha realizado mediante el sistema comercial "*QiAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)*" siguiendo las instrucciones del fabricante.

Procedimiento:

- 1 Pipetear 400 µL del preparado "buffer" AVL conteniendo el "carrier" ARN en un tubo de 1,5 mL.
- 2 Añadir 100 µL de orina al tubo del buffer AVL/carrier ARN. Mezclar en vórtex durante 15 s.
- 3 Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 min.
- 4 Centrifugar levemente el tubo para quitar las gotas del tapón.
- 5 Añadir 400 µL de etanol (96-100%) y mezclar en el vórtex durante 15 s.
- 6 Centrifugar levemente el tubo para quitar las gotas del tapón.
- 7 Pipetear 450 µL de la mezcla anterior en una columna de purificación.
- 8 Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo de elución.

- 9 Repetir los pasos 7 y 8.
- 10 Añadir 500 µL de buffer AW1 a la columna.
- 11 Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo de elución.
- 12 Añadir 500 µL de buffer AW2 a la columna.
- 13 Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 min. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo de elución.
- 14 Añadir 500 µL de buffer AW2 a la columna.
- 15 Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 min. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo de elución.
- 16 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Descartar el eluido y colocar la columna en un tubo de 1,5 mL sin tapón.
- 17 Añadir 50 µL de buffer AVE equilibrado.
- 18 Incubar 1 min a temperatura ambiente.
- 19 Centrifugar durante 1 min a 8.000 rpm y recoger el eluido con el ARN/ADN.

Conservar el ARN/ADN a 4°C para su uso en el mismo día. Congelar a -20°C para usos posteriores.

3.5 Extracción de ADN genómico humano a partir de sangre

La extracción del ADN genómico humano a partir de sangre total se ha realizado mediante el sistema comercial *Qiamp Blood DNA Mini kit (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Es aconsejable atemperar las muestras de sangre antes de proceder con el protocolo. Es muy importante agitar vigorosamente las muestras antes de pipetear, ya que las células blancas portadoras del ADN precipitan cuando la sangre se mantiene en reposo algunas horas.

Procedimiento:

- 1 Mezclar en un tubo de 1,5 mL: 100 µL de muestra + 10 µL de Qiagen Proteasa + 100 µL de *buffer AL*
- 2 Incubar a 56°C durante 10 min.
- 3 Centrifugar levemente para quitar las gotas del tapón del tubo.
- 4 Añadir 200 µL de etanol (96-100%) y mezclar en vórtex.
- 5 Centrifugar levemente para quitar las gotas del tapón del tubo.
- 6 Pipetear la mezcla anterior en la columna de purificación.
- 7 Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
- 8 Descartar el eluido y colocar la columna en un nuevo tubo de elución.
- 9 Añadir 250 µL del "buffer" AW1 a la columna.
- 10 Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
- 11 Descartar el eluido y colocar la columna en un nuevo tubo de elución.
- 12 Añadir 500 µL de "buffer" AW2 a la columna
- 13 Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 min.
- 14 Descartar el eluido y colocar la columna en un tubo de 1,5 mL sin tapón.
- 15 Repetir el paso anterior.
- 16 Añadir 50 µL de agua destilada o de "elution buffer".
- 17 Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
- 18 Centrifugar durante 1 min a 8.000 rpm y recoger el eluido con el ADN.
- 19 Etiquetar el tubo del ADN antes de descartar la columna.

Conservar el ADN a 4 °C para su uso en el mismo día. Congelar a -20 °C para usos posteriores.

3.6 Purificación de ADN plasmídico a partir de un cultivo de E.coli

Se han utilizado plásmidos de E. coli para la preparación de marcadores de peso molecular, y como estándar de referencia para el cálculo de la cantidad de ADN en un gel de agarosa. La obtención de los plásmidos se realiza a partir de un cultivo de una cepa de *E. coli* transformada. Se ha utilizado el método comercial *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Procedimiento para la preparación del cultivo de *E. coli*:

- 1 Inocular de 1 a 10 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL
- 2 Incubar toda la noche (12-16 horas) a 37 °C.

Procedimiento para la obtención del lisado de bacterias:

- 1 Pipetear 1.5 mL de cultivo en un tubo de microcentrífuga.
- 2 Centrifugar durante 5 min a 13.000 rpm.
- 3 Descartar el sobrenadante.
- 4 Volver a repetir la centrifugación anterior hasta precipitar todo el volumen de cultivo.
- 5 Añadir 250 µL de solución de resuspensión ("*Cell Resuspension Solution*") y resuspender el "pellet".
- 6 Añadir 250 µL de solución de lisis de células ("*Cell Lysis Solution*")
- 7 Mezclar por inversión (no agitar en vórtex).
- 8 Incubar hasta que la suspensión claree (aproximadamente de 1 a 5 minutos). Si no se ha aclarado el lisado, incubar 5 min adicionales.
- 9 Añadir 10 µL de proteasa ("*Alkaline Protease Solution*")
- 10 Mezclar por inversión.
- 11 Incubar 5 min a temperatura ambiente (15-30°C).
- 12 Añadir 350 µL de solución de neutralización ("*Neutralization Solution*") y mezclar por inversión.
- 13 Centrifugar el lisado bacteriológico a 13.000 rpm durante 10 min.

Procedimiento para la purificación del plásmido:

- 1 Preparar para cada muestra un tubo de 2 mL de recolección con una columna.
- 2 Decantar el volumen de lisado (aproximadamente 850 µL) en una columna colocada en un tubo de recolección (evitar remover el precipitado blanco).
- 3 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
- 4 Descartar el tubo con el eluido.
- 5 Añadir 750 µL de Solución de Lavado a la columna.
- 6 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
- 7 Descartar el tubo con el eluido.
- 8 Repetir el proceso de lavado usando 250 µL de Solución de lavado de Columnas.
- 9 Centrifugar 2 min a 13.000 rpm. Dar un pulso de centrifuga para eliminar restos de solución de lavado.
- 10 Colocar la columna en un tubo nuevo.
- 11 Añadir 100 µL de agua libre de Nucleasas ("*Nuclease-Free Water*") a la columna. Incubar 2 min.
- 12 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min
- 13 Recoger el eluido con el ADN
- 14 Tapar el tubo y conservar a -20 °C o inferior.

3.7 Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa

Para la purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa se utilizó el reactivo *QIAquick Gel Extraction Kit* siguiendo las instrucciones el fabricante.

Procedimiento:

- 1 Con un bisturí, recortar el fragmento del gel que contiene la banda correspondiente al producto de PCR.
- 2 Añadir tres volúmenes del tampón QG por cada volumen de gel y mezclar (p.e. añadir 300 mL de tampón QG a 100 mg de muestra).
- 3 Incubar a 50°C durante 10 min (o hasta que el gel esté completamente disuelto).
- 4 Después de que el gel se haya disuelto completamente, comprobar que el color de la mezcla es amarillo (similar al del buffer QC sin agarosa disuelta)
- 5 Añadir 1 volumen de isopropanol a la muestra y mezclar (100 µL isopropanol para 100 mg gel).
- 6 Colocar la columna de centrifuga en el tubo 2 mL provisto en el kit.
- 7 Para fijar el ADN, colocar la muestra en la columna y centrifugar 1 min a 13.000 rpm.
- 8 Descartar el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo.
- 9 Añadir 700 µL de Buffer PE a la columna y centrifugar 1 min a 13.000 rpm.
- 10 Descartar el filtrado anterior y colocar la columna en un nuevo tubo. Centrifugar 1 min a 13.000 rpm.
- 11 Colocar la columna en un tubo de centrifuga de 1,5 mL nuevo.
- 12 Añadir 50 µL de agua destilada e incubar durante 1 min a temperatura ambiente. Para obtener un ADN más concentrado añadir solo 30 µL.
- 13 Centrifugar la columna durante 1 min a 13.000 rpm y recuperar el eluido.

3.8 Purificación de los productos de amplificación

Se ha utilizado el protocolo de *QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)*. Permite eliminar dNTPs, oligonucleotidos y otros componentes de la reacción de amplificación por PCR, de forma que puede utilizarse posteriormente en reacciones de secuenciación o re-amplificación.

Procedimiento:

- 1 Añadir 5 volúmenes del "buffer" PB (del kit) a un volumen de la muestra de PCR y mezclar.
- 2 Colocar una columna suministrada con el kit en los tubos de 2 mL también suministrados. Rotular la columna.
- 3 Transferir a la columna el volumen de la mezcla.
- 4 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
- 5 Descartar el eluido y colocar nuevamente la columna en el mismo tubo.
- 6 Añadir 700 µL del "buffer" PE a la columna.
- 7 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
- 8 Descartar el eluido y colocar nuevamente la columna en el mismo tubo.
- 9 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
- 10 Colocar la columna en un tubo de 1,5 mL nuevo y rotulado con la descripción de la muestra.
- 11 Añadir 50 µL de H₂O a la columna. La membrana de la columna debe quedar totalmente húmeda.
- 12 Dejar en reposo 1 minuto a temperatura ambiente.
- 13 Centrifugar a 13.000 rpm durante 1min.
- 14 Conservar el volumen eluido (con el producto de PCR purificado) y descartar la columna.

Conservar las muestras congeladas a -20 °C hasta su utilización.

4 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR ("*Polimerase Chain Reaction*") permite la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN a partir de un fragmento de ADN que actúa como molde y dos oligonucleótidos que actúan como cebadores ("*primers*"). Los principales componentes de la reacción son el ADN que actúa como molde, una polimerasa termoestable (taq polimerasa o un enzima equivalente), dos oligonucleótidos que actúan como cebadores o iniciadores complementarios a las secuencias situadas en los extremos de la región que se desea multiplicar o "amplificar", nucleótidos tri-fosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) y cloruro de magnesio.

La PCR es una reacción cíclica. Cada ciclo consta de una etapa de desnaturalización de la doble hebra de ADN, la hibridación de los dos oligonucleótidos a las secuencias complementarias de cada hebra y la extensión o síntesis del ADN. El número de ciclos en una PCR puede variar entre 20 y 50, dependiendo de la cantidad inicial de ADN y de las necesidades finales. En el presente trabajo se han utilizado los equipos Applied Biosystems 9600 y 2400 indistintamente.

El laboratorio de Biología Molecular está dividido en tres áreas de trabajo, definidas por las restricciones de uso de reactivos, muestras y productos de PCR. ZONA A: zona de preparación de mezclas de amplificación. En esta área no debe manipularse ninguna muestra ni ningún producto de PCR. ZONA B: zona de manipulación de las muestras biológicas: en esta zona se obtienen los ácidos nucleicos a partir de la muestra original (suero, plasma, sangre, etc). En esta área no debe manipularse ningún producto de PCR. Zona C: zona de amplificación y detección. Una vez se ha obtenido el ácido nucleico y se ha mezclado con los reactivos adecuados debe procederse a la amplificación en esta zona. Para ello se utiliza un termociclador. El material y reactivos pueden traspasarse en sentido A-C, pero no al contrario. El personal debe cambiar de guantes para manipular reactivos cuando pasa en sentido de C a A, pero no es necesario hacerlo en dirección A a C.

4.1 Reactivos

- Taq polimerasa y tampón de PCR 10x

Se ha utilizado la Taq polimerasa 5 U/ μ L de *Roche Applied Science*, a una concentración final de 0,02 U/ μ L (1 U por cada reacción de 50 μ L). Referencias: 11 146 165 001 (100 U), 11 146 173 001 (500 U), 11 418 432 001 (4 \times 250 U), 11 596 594 001 (10 \times 250 U) y 11 435 094 001 (20 \times 250 U). Esta polimerasa se ha utilizado para la detección de papilomavirus, obtención del molde del control interno y la amplificación de los fragmentos menores de 500 pares de bases para la secuenciación de las variantes A0383 y E1201.

Se ha utilizado el tampón de PCR 10x suministrado por la misma firma que la polimerasa. La composición del mismo es 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0,1% gelatina (p/v).

Se ha utilizado la Taq *Expand Long Template PCR System* 5 U/μL de *Roche Applied Science*, a una concentración final de 0,02 U/μL (1 U por cada reacción de 50 μL). Referencias: 11 681 834 001 (150 U), 11 681 842 001 (2 x 360 U) y 11 759 060 001 (10 x 360 U). Esta polimerasa se ha utilizado para la amplificación de los fragmentos mayores de 500 pares de bases para la secuenciación de las variantes A0383 y E1201. Se ha utilizado en combinación con el tampón 1 de PCR 10x suministrado por la misma firma que la polimerasa. La composición del mismo es 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C), 100 mM KCl, 1mM dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v) y 50% glicerol (v/v).

- Nucleótidos tri-fosfato (dNTPs)

Se han utilizado los 4 nucleótidos a una concentración de 200 μM c/u en la mezcla de amplificación. Para facilitar la preparación de las mezclas de reacción se prepararon diluciones stock de dNTPs a una concentración de 10 mM c/u.

- Oligonucleótidos

Se han utilizado todos los oligonucleótidos a una concentración de 200 nM. Para facilitar la preparación de las mezclas de reacción, se ha dispuesto una solución de "stock" a 100 μM y una solución de trabajo a 10 μM. Se ha partido de oligonucleótidos sintéticos, purificados con columnas de fase reversa y precipitados.

Se han utilizado oligonucleótidos cebadores de la PCR con tres diferentes objetivos: la detección de papilomavirus mediante la amplificación consenso del gen L1, la obtención del fragmento MY11-FQ-MY09 (molde del control interno) utilizando para su preparación ADN genómico humano, y la obtención de los fragmentos que han permitido la secuenciación de los genomas completos de las variantes A0383 y E1201.

Los oligonucleótidos utilizados para la detección de los papilomavirus son los ampliamente utilizados MY11 y MY09 (Manos y Yang, 1990).

Los oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón MY11-FQ-MY09 consisten en dos secuencias de ADN heterólogo. El oligonucleótido MY11-FQ está formado por la secuencias del oligonucleótido MY11 en el extremo 5' y una secuencia complementaria al gen CFTR humano en el extremo 3'. El oligonucleótido MY09-FQ está diseñado de forma análoga.

Por último se diseñaron oligonucleótidos para secuenciar el genoma completo de las nuevas variantes A0383 y E1201. Inicialmente se amplificó y secuenció el fragmento de 450 pb aprox. comprendido entre los oligos MY11 y MY09. Para extender el segmento analizado hasta obtener el genoma completo de las nuevas variantes, se realizó un estudio filogenético que determinó que estaban incluidos en la especie Alpha-3. En base a las regiones conservadas entre los genotipos pertenecientes a este grupo se diseñaron los oligonucleótidos que permitieron obtener algunos productos de amplificación a partir de la secuencia de las nuevas variantes. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y mediante superposición de secuencias se consiguió secuenciar ambos genomas completamente.

Procedimiento para la preparación de los oligonucleótidos

- 1 Añadir al precipitado del oligonucleótido el volumen de tampón TE pH 7 necesario para obtener una concentración 100 μM *.
- 2 Resuspender el oligonucleótido bombeando con la pipeta.
- 3 Preparar una dilución 1:10 del "stock" 100 μM , para obtener la solución de trabajo 10 μM **
- 4 Conservar ambas diluciones a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descartar los viales sometidos a más de 5 ciclos de congelación/descongelación.

NOTAS:

*El volumen de tampón depende de la cantidad de oligonucleótido obtenida en la síntesis; p.e. si se suministran 29,8 nanomoles de oligonucleótido liofilizado, añadir 298 μL de TE.

**Habitualmente se han preparado 25 μL de oligonucleótido 100 μM + 225 μL de TE.

Identificación	Secuencia	Región	Posición*
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	L1	6582-6601
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	L1	7014-7033

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la detección de papilomavirus. La posición de los oligonucleótidos se refiere a la secuencia de referencia del VPH 16 (K02718).

Identificación	Secuencia	Región	Posición*
MY11FQ	GCMCAGGGWCATAAYAATGGGCTACCCCTGAAAGTAAC	Crom. 7	155138-155155
MY09FQ	CGTCCMARRGGAWACTGATCGCTTTCCTTTATCAATATTAAC	Crom. 7	155661-155682

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón MY11-FQ-MY09 (molde del control interno). Las secuencias en gris son complementarias a la región "ATP binding site" del gen CFTR humano. Las secuencias en negro son complementarias a los papilomavirus. La posición de los oligonucleótidos se refiere a la secuencia de referencia NC_000007.14

Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del genoma completo de A0383	
IDENTIFICACIÓN	SECUENCIA
DE1	YATCCTCYACATGGCATTGG
DE2	CTGCGAGTGGTATCTAGAAC
DE3	GGACTGTGGATCTTAAGGAC
DE4	GWAYRGCCATASCCACTRTC
DE5	TCCCGACCGTTTTCGGTCTC
DE6	GACTCTGACTCTGAGCTGTC
DE7	GACACCGAAAACGGTCCG
DE9	GCCATAAGTATACGCCGGG
DE10	GCACGT(T/C)TATAATG(T/C)(T/C)T(A/G)CACAT
DE12	G(A/C)CA(G/T)(G/A)TGCA(C/G)TTCAATTGC
DE17	AC(C/T)ACCCC(G/T)GCTGT(G/T)TT(G/A)GA
DE19	CCCTATT(C/T)TTTT(T/G)CAGATG
DE14	TATTTCTAGCACGTCTGCCG
DE21	GAAGACCCAAACGCAGCAGC
DE18	TTAAGGACGGATCATCTAATGG
DE23	CAAGCAGGACTTACTCATGTAG
DE25	GGTCAGAAACAGTACTATGTAAC
DE24	CCTCCCATGTGTTTGTGTCC
DE27	GTGACAGTGCTGACCAGTGG
DE26	CTGTTACAGATGTCCCTTGC
DE29	GTATAGAACCACACCTGCAAC
DE28	CCACCCAGATATCAAACACAC
DE35	TTGAAATGCACTCCATAAACCC
DE16	TTGGACATAGCGATCAGTACTG
DE31	ACGAGACGATAATTGTGGATTG
DE30	GAAGGGATCAGTGTAGCAACC
DE33	TATGTGCCTATAGGTAICTGC
DE32	GGCTCAATAACAACAGGCGG
DE34	TGTGGGTGTGCTGGTAAATAC
DE41	GTCTTTGGTAGATAGTGAACCTAAG
DE42	CTTAAATATTTCTAGCACGTCTGC
DE43	CACAAACAGTATTATGTGACATTTG
DE44	CAGGTGCACTGTAACCGTTATC
DE45	CATAACCAATCCTGGATACTCTTG
DE46	AGTGGGCCATTGTGAAATATAGTG
DE47	GGCCATGTATTTACCAGCACAC
DE48	CTGGATCATAACAGGATTGTC
DE48	CTGGATCATAACAGGATTGTC
DE49	CAAGTATGACAATGTTACTGTTCC
DE50	CACCATAATAATAGAGGTTGGTGC

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del genoma completo de la variante A0383. **W:** A+T; **M:** A+C; **K:** G+T; **S:** C+G; **Y:** C+T y **R:** A+G.

Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del genoma completo de E1201	
IDENTIFICACIÓN	SECUENCIA
CU4	CAGACCGAAAAGCGGGAGAC
CU1	CAATTCAGGATGGCGACATGG
CU5	CCTYACCAAYATTTTTKTGCT
CU6	GTTAMCACCTATAGGCCWGCT
CU7	TAGACAGCTCAGAGGAGGAGG
CU8	CCTGTCCACTSYCCWGCTAT
CU10	ACTTTCGTTTTAGGGCNTGCAC
CU9	GGATGGRCAGGAAGTKCCGTTAG
CU12	TATYACTTTTAAAYTGCTTAC
CU11	GGGTATGGCAATACGCAGGTGGA
CU14	TTTGGKGGTCTATTAGCAT
CU13	GATTTAARTGTRRCAAAG
CU16	CTCATGCAAAACAATGATTTBCCTGT
CU15	AAGGTDGCWGAYACAGGSGAYTGGA
CU18	TCCTGGCACGCATCTAAACG
CU17	AAGGTCSTGGGCACGWTTAGA
CU20	CCCCAGCTKACATAKTCCATT
CU19	GGCCACCAGGTGGTGCC
CU22	CGCTGTCGTTAMAAGCGGGCG
CU21	ACTCTGTATCYAGYACYCAGG
CU24	GAAAGCCARAAGMAAAGAAGWAGCA
CU23	TGCTWCTTCTTTKCTTYTGGCTTTC
CU25	TGGGCCAGCCTGGGTGTSTT
CU26	AATAACTRGAATCCTCYAC
CU27	GAACCYATAAGTAGTACWCC
CU28	ACTAGGRTGYTCAAATATAATWGTTTC
CU29	TATATGAYATWTATGCAGAT
CU30	TCACCAGGCCGCCACAWAGCCATCTG
CU31	GGGTATCARTACAGGGTGTTC
CU32	GCGMTCRGTGTCWGGATTATATA
CU34	GCCATTTGTAAATAATCTGGATA
CU33	TTRTGGAAATGTRACAKWTGT
CU35	TGTCCGGCTGCACCCYGTG
CU39	TCGGTCTCCCCTTTTCGGT
CU4b	ACCGAAAAGCGGGAGACCGA
CU37	CAAWAAAWTGCTTTTAGGCA
CU41	GAGCACTCCAGCTACGGATC
CU42	ATCTACCTGTGGCTCAGGTTC
CU43	ATACAAACATTAACAAGTGAATG
CU44	CATAAACTAATAAATCTATGCC
CU45	AGGAAATGGACTATGTCAGCTG
CU46	CCACATCCCACTGTAGG
CU47	CCTCGCTTAAATTTGTACAGC
CU48	TATAATTGGGCGTCAGGAAGG
CU49	AACAAGTCTGAGGTGCCTTTGG
CU50	CAACCACAGTAACAACAGCTG

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del genoma completo de la variante E1201. **W:** A+T; **M:** A+C; **K:** G+T; **S:** C+G; **Y:** C+T y **R:** A+G.

- ADN molde

Cantidad de ADN (extracciones a partir de escobillones cervicales): la cantidad utilizada del ácido nucleico diana obtenido a partir de escobillones cervicales depende de las células que se han desprendido del tejido cervical y de la habilidad con que el ginecólogo ha tomado la muestra. Se ha optado por utilizar un volumen fijo de 5 μ L de la extracción de ADN por cada escobillón purificado.

Cantidad de ADN para las amplificaciones del gen CFTR humano, para preparar el control interno de Papilomavirus: se ha optado por utilizar un volumen fijo de 5 μ L de la extracción de ADN por cada reacción de 50 μ L.

4.2 Mezclas de amplificación

- Mezcla de amplificación estándar

Se ha utilizado la siguiente mezcla de amplificación para la detección de papilomavirus (sin control interno), la obtención del producto del control interno MY11-FQ-MY09 y la amplificación de fragmentos menores de 500 pares de bases de las variantes A0383 y E1201.

Componente	Volumen (μ L)	Concentración final
Buffer 10x *	5	1x
dNTPS 10 mM c/n **	1	0,2 mM
Oligonucleótido directo 10 μ M	2	0,4 μ M
Oligonucleótido reverso 10 μ M	2	0,4 μ M
Taq polimerasa 5 U/ μ L	0,2	1U
ADN molde	5	-
H ₂ O	34,8	-

Tabla 14. Composición estándar de las mezclas de amplificación utilizadas. *Composición del buffer 10x: 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH 8.3 (20°C). **Composición de los dNTPs 10 mM c/n: 10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP.

- Mezclas de amplificación para la detección de papilomavirus (incluyendo control interno)

Se ha utilizado la mezcla de reacción indicada en la tabla 15 para la detección de los papilomavirus. Previamente se determinó la concentración mínima de control interno que permite su amplificación sin competir con el virus.

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer 10x	5	1x
dNTPS 10 mM c/n	1	0,2 mM
Control interno 10x	5	1x
Oligonucleótido MY11 10 μM	2	0,4 μM
Oligonucleótido MY09 10 μM	2	0,4 μM
Taq polimerasa 5 U/ μL	0,2	1U
H ₂ O	29,8	-

Tabla 15. Mezcla de reacción para la amplificación del fragmento MY11-MY09 de papilomavirus utilizando el control interno.

- Mezcla de reacción para la amplificación del fragmento de ADN MY11-FQ-MY09

Se utiliza la composición estándar indicada en la tabla 14, utilizando como oligonucleótido directo MY11FQ (10 μM) y como oligonucleótido reverso MY09FQ (10 μM). El ADN molde utilizado es ADN genómico humano obtenido del autor del presente trabajo.

- Mezclas de amplificación para la obtención de los fragmentos que han permitido la secuenciación de los genomas completos de las variantes A0383 y E1201

Para la obtención de los fragmentos de las variantes A0383 y E1201 se han utilizado dos procedimientos:

- 1) Fragmentos menores de 500 pb: se han utilizado mezclas de reacción con la composición estándar (tabla 14) utilizando las parejas de oligonucleótidos indicadas en el capítulo 2 del apartado de "Resultados". Como ADN molde se han utilizado las muestras con referencia A0383 y E1201. En estas reacciones se ha utilizado Taq polimerasa convencional (*Roche Applied Science*).
- 2) Fragmentos mayores de 500 pb: se han utilizado mezclas de reacción basadas en la tabla 16, utilizando las parejas de oligonucleótidos indicadas en el capítulo 2 del apartado de "Resultados". Como ADN molde se han utilizado las muestras con referencia A0383 y E1201. En estas reacciones se ha utilizado Taq Expand Long Template PCR System (*Roche Applied Science*).

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer expand 1*	5	1x
dNTPS 10 mM c/n **	1	0,2 mM
Oligonucleótido directo 10 µM	2	0,4µM
Oligonucleótido reverso 10 µM	2	0,4µM
Taq expand 5 U/µL	0,2	1U
H ₂ O	35,8	-

Tabla 16. Composición de la mezcla de amplificación utilizada para los fragmentos mayores de 500 pb. *Composición del buffer 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C), 100 mM KCl, 1mM dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v) y 50% glicerol (v/v). **Composición de los dNTPs 10 mM c/n: 10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP.

4.3 Perfiles térmicos

- Detección de papilomavirus:

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:s)
1	95	2:00
	94	0:30
40	50	0:30
	72	1:00
1	72	4:00
	4	

- Obtención del ADN heterólogo MY11-FQ-MY09:

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:s)
1	95	2:00
	94	0:30
40	55	0:30
	72	1:00
1	72	4:00
	4	

- Fragmentos para la secuenciación de los genomas A0383 y E1201 menores de 500 pb: se han utilizado 4 temperaturas de hibridación diferentes dependiendo del fragmento.

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:s)
1	94	4:00
	94	0:30
40	50 / 55 / 60 / 65	0:30
	72	0:30
1	72	5:00
	4	

- Fragmentos para la secuenciación de los genomas A0383 y E1201 mayores de 500 pb: se han utilizado 4 temperaturas de hibridación diferentes dependiendo del fragmento.

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:s)
1	95	4:00
	94	0:30
35	50 / 55 / 60 / 65	0:30
	72	2:00
1	72	5:00
	4	

5 Métodos de análisis de ácidos nucleicos

5.1 Cálculo de la concentración de ADN por espectrofotometría

- 1 Realizar una dilución de la solución inicial (si), p.e. 1:200.
- 2 Leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 nm.
- 3 Realizar el siguiente cálculo:

$$\text{Concentración si } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{DO}) \times \text{N} \times \text{D}$$

N: factor de 0,03 para oligonucleótidos, 0,04 para ARN y 0,05 para ADN.

DO: densidad óptica medida a 260 nm.

D: factor de la dilución realizada (p.e 200).

5.2 Cuantificación y preparación de ADN plasmídico por espectrofotometría

- 1 Diluir el plásmido purificado en el apartado anterior: 5µL de DNA + 995 µL H₂O (hacer 3 réplicas).
- 2 Leer la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro, utilizando en cubetas de cuarzo. Hacer el blanco con H₂O.
- 3 Calcular la concentración de ADN utilizando la siguiente fórmula (utilizar la media de las 3 lecturas de la Abs260): $\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{Abs260} \times 50 (\mu\text{g DNA} / \text{mL}) \times 200$

5.3 Análisis electroforético en gel de agarosa

La electroforesis en agarosa es adecuada para la separación de moléculas de ADN con un tamaño entre 100 y 20.000 pb. El porcentaje de agarosa del gel depende del tamaño de los fragmentos de ADN que van a analizarse (cuanto más pequeños son estos fragmentos, más grande es el porcentaje de agarosa empleado). Se han usado geles de agarosa entre el 1-4 % en tampón TBE (opcionalmente TAE) y con una concentración final de BrEt 0,5 µg /ml. El tampón de electroforesis debe ser el mismo con el que se ha preparado el gel. El voltaje aplicado dependió del tamaño del gel y la cubeta de electroforesis empleados. Antes de analizar las muestras, se añadió tampón de carga 5x hasta una concentración final de 1x. Una vez finalizada la electroforesis se visualizaron los fragmentos de ADN, colocando el gel encima de una fuente de luz UV

Procedimiento de la preparación del tampón de carga 5x:

- 1 Mezclar 4,59 mL de Glicerol con una concentración final del 40% y 1 mL de EDTA a pH 8.
- 2 Disolver 0,1 mL de TRIS-HCl a pH 8 con una concentración final de 10 mM.
- 3 Añadir 0,5 mL de azul de bromofenol.
- 4 Añadir 3,81 mL de agua a la mezcla.
- 5 Mezclar, alícuotar y guardar a -20°C.

Procedimiento de la preparación de TBE 5X:

- 1 Disolver 108 g de TRIS y 55 g de ácido bórico en 40 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0.
- 2 Añadir hasta 2 L de agua.

Procedimiento para la preparación de geles de agarosa

- 1 Verter 200 mL de TBE 1X en un matraz.
- 2 Pesar 6 g de agarosa para un gel del 3% 1%.
- 3 Añadir la agarosa a los 200 mL de TBE 1x y agitar vigorosamente.
- 4 Fundir la agarosa en un microondas.
- 5 Dejar enfriar un poco y verter en los moldes.
- 6 Poner el peine en la zona superior de lo que será el gel sin que toque el fondo.

- 7 Dejar a temperatura ambiente hasta que haya solidificado la agarosa.
- 8 Teñir con bromuro de etidio.

Marcadores de peso molecular

Se han utilizado varios marcadores de peso molecular para ADN. Algunos de estos son comerciales, mientras que otros se han preparado artesanalmente.

Marcador	Marca	Aplicación y tamaños
Biomarker Low	BioVentures	Bandas: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 525, 700, 1000.
λ / Hind III + Eco RI	Artesano	Bandas: 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 y 21226.
pUC18 / Taq I + Dde I + Pvu II	Artesano	Bandas: 166, 235, 322, 426, 458, 540, 754, 910, 1444, 2364.
Marcador en escalera	Promega	Bandas: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 y 800.
Marcador VIII	Roche	Bandas: 19, 26, 34, 37, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, 489, 501, 692, 900 y 1114.
HyperLadder V	Bioline	Bandas: 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400 y 500.

Tabla 17. Marcadores de peso molecular utilizados en el presente trabajo, su aplicación y tamaños que abarca.

5.4 Cuantificación de los fragmentos de ADN purificados para secuenciación

En la reacción de secuenciación es necesario añadir la cantidad adecuada de ADN molde para que la reacción funcione en condiciones óptimas. Los productos de PCR de las muestras amplificadas, se cuantificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% o al 2%. La cuantificación se realizó por comparación del fragmento de ADN purificado con un patrón de ADN del que se conoce su concentración.

El patrón utilizado es el marcador de peso molecular denominado Marker VIII (Roche LifeScience). Este marcador aporta información tanto del tamaño de la banda en función de la altura de aparición de la misma, como de la cantidad de ng de ADN en función de la intensidad de la banda.

6 Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se realizan mezclando el ADN diana, la/las enzimas de restricción y el tampón adecuado para esta enzima. Para la preparación de las digestiones se han seguido las siguientes condiciones:

Procedimiento para el análisis de los fragmentos de restricción del fragmento MY11/MY09

El tipado de las muestras se ha realizado mediante 2 digestiones independientes del producto genérico de PCR (fragmento de 450 pb). Para ello, el producto de PCR se divide en 2 alícuotas: un alícuota se ha digerido con *Rsa* I, y el otro con *Alu* I y *Hae* III simultáneamente, tal y como se indica en el punto 1.4 de resultados.

Procedimiento:

- 1 Preparar 2 alícuotas de 20 μ L con el fragmento de ADN amplificado.
- 2 Añadir a uno de los tubos 1 μ L de *Rsa* I y al otro 2 μ L de la mezcla de *Alu* I y *Hae* III.
- 3 Incubar a 37°C durante 2 horas.
- 4 Añadir 5 μ L de tampón de carga de electroforesis 5X a cada tubo.
- 5 Cargar el volumen de las 2 digestiones en pocillos adyacentes de un gel de agarosa al 3% y realizar la electroforesis.

Se recomienda cargar las digestiones junto al marcador de peso molecular.

7 Cálculo de la sensibilidad de la reacción de detección de papilomavirus

La **sensibilidad analítica** es la capacidad de un sistema de detectar un analito presente en una muestra. La sensibilidad se calcula con la fórmula $S = VP / (VP + FN)$, donde VP es el número de verdaderos positivos y FN el de falsos negativos. Indica la proporción de muestras positivas en las que efectivamente se detecta un analito. El **límite de detección** es el valor mínimo que puede detectarse de un analito para un valor de sensibilidad determinado (habitualmente el 95 %).

La **especificidad** se define como la proporción de muestras sin el analito que dan un resultado negativo. Es decir, es una medida de la capacidad de la técnica de no dar falsos positivos. Se calcula con la fórmula $E = VN / (VN + FP)$, donde VN es el número de verdaderos negativos y FP el de falsos positivos.

Procedimiento:

- 1 Resuspender el control positivo VPH (*1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA*. NIBSC code: 06/202) con 0,5 mL de agua.

2 Preparar 10 alícuotas de 50 μL (conservarlas a -20°C). Cada alícuota es portadora de VPH16 a la concentración de 10^5 UI/ μL .

3 A partir de las alícuotas anteriores preparar 24 réplicas de diluciones seriadas de 10^4 UI/ μL , 10^3 UI/ μL , 10^2 UI/ μL y 10^1 UI/ μL de acuerdo con el procedimiento que se muestra en el siguiente esquema:

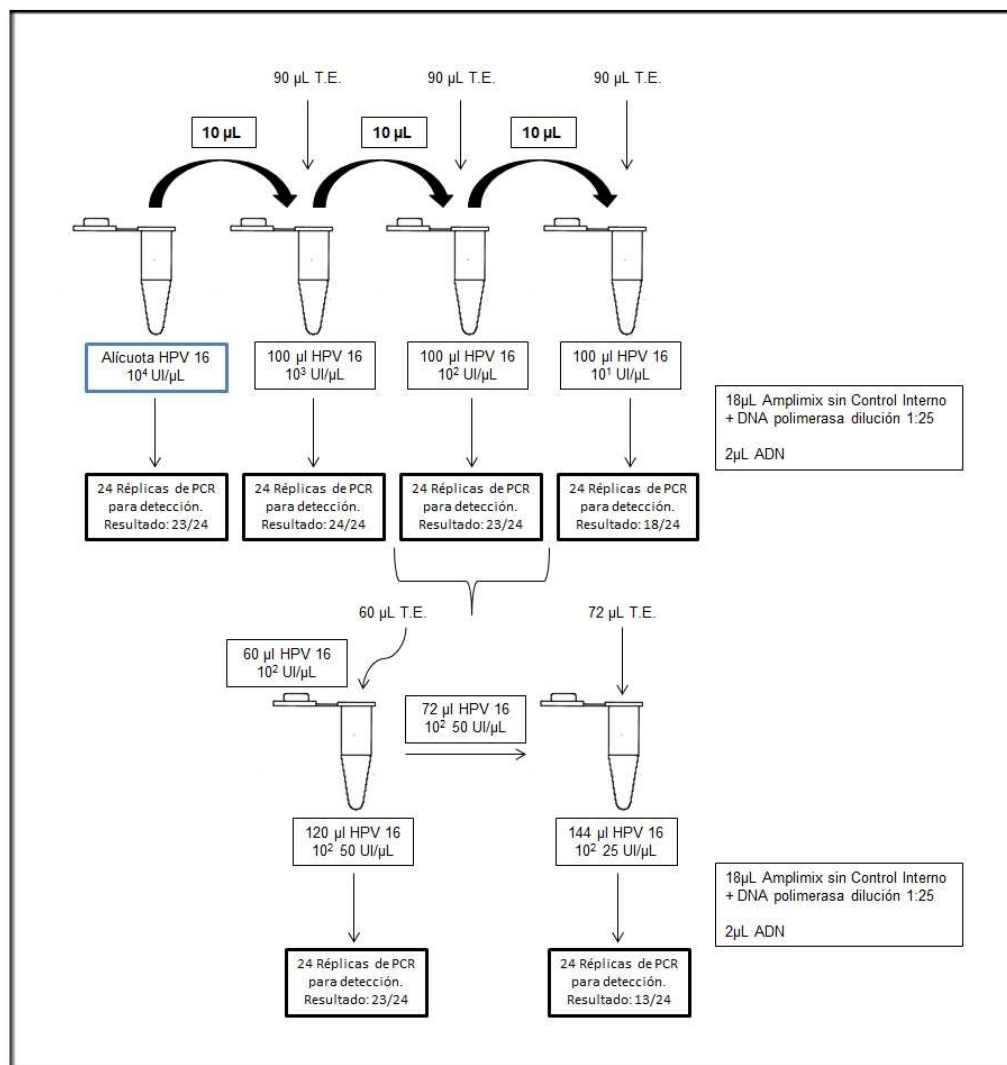


Figura 31. Procedimiento para la obtención de las réplicas de las diferentes diluciones del control positivo de papilomavirus para calcular el límite de detección.

8 Secuenciación de ADN

8.1 Reacción de secuenciación

El método de secuenciación de ADN empleado en este trabajo se basa en el descrito por Sanger *et al.* (1977). Se ha utilizado el reactivo comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies)*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Procedimiento:

1 Realizar la mezcla siguiente:

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)
Tampón	1x	2
BigDye Terminator	0,5x	1
Oligonucleótido	10 µM	1
Producto de PCR purificado	-	Según cuantificación
H ₂ O	-	Hasta 10

2 Colocar las reacciones en el termociclador y ejecutar el siguiente perfil térmico:

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:s)
1	96	1:00
	96	10:00
25	55	5:00
	60	4:00

8.2 Purificación de la reacción de secuencia

Una vez finalizada la reacción de secuenciación se deben eliminar los restos de reactivos implicados, especialmente los fluorocromos no incorporados. El primer paso consiste en precipitar el producto de secuenciación. Para ello, se usó el kit de precipitación ZR DNA Sequencing Clean-up (Zymo Research).

Procedimiento:

- 1 Añadir 240 µL de "Sequencing Binding Buffer" a los 10µL de reacción de secuencia.
- 2 Colocar la mezcla en la columna y centrifugar 30 seg a 13.000 rpm.
- 3 Añadir 300 µL de "Sequencing Wash Buffer" a la columna y centrifugar 30seg a 13.000.
- 4 Colocar la columna en un tubo de micro centrifuga de 1,5 mL nuevo.
- 5 Añadir 20µL de formamida a la columna y centrifugar 15 seg a 13.000 rpm.
- 6 El eluido que aparece en el tubo es la reacción de secuencia purificada.

La reacción de secuencia se puede conservar durante tiempo en formamida. La formamida, realmente actúa como soporte para que el capilar del secuenciador pueda tomar la secuencia.

8.3 Análisis comparativo y filogenético de secuencias de ADN

El tratamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, así como, la búsqueda en los bancos de datos se han realizado con los programas GCG (Devereux, *et al.*, 1984) y PCGene. La construcción de los árboles filogenéticos se han realizado con la ayuda del Clustal V, TreeView y el programa Phylip.

9 Bioinformática

9.1 Aplicaciones de bioinformática utilizadas

GCG: Genetics Computer Group

Análisis de secuencias de ADN y proteínas.

PC gene

Ánálisis de secuencias de ADN.

ClustalX

Alineamiento de secuencias

Philip

Estudio filogenéticos

TreeView

Realización y visualización de árboles filogenéticos.

DNA Expert

Análisis de secuencias de ADN.

SeqEd (McIntosh) y *SeqScape* (PC)

Procesamiento de los ficheros de las secuencias obtenidas en los autoanalizadores de la firma *Applied Biosistemas*.

Chromas

Procesamiento los ficheros de secuencias obtenidas en los secuenciadores de la firma *Applied Biosistemas*[®].

9.2 Direcciones de Internet para la búsqueda de secuencias, bibliografía e información

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

http://cancer.gov/cancer_information/cancer_type/cervical

<http://cfnavarra.es/salud/anales/textos>

<http://www.eurogin.com/meeting/em3.htm>

<http://www.mlo-on-line.com>

<http://www.accessexcellence.org>

<http://www.digene.com>

<http://www.microbio.uab.edu/medmicro/Lectures/brokerppt2.pdf>

<http://www.ftns.wau.nl/id-array/participants/Clemens%20Prinsen.htm>

Resultados

Los resultados obtenidos se estructuran en tres capítulos:

Capítulo 1. Desarrollo de un sistema de detección e identificación de VPHs

Se describen los resultados obtenidos en el desarrollo de un sistema de detección e identificación de papilomavirus humanos, incluyendo su diseño teórico y los ensayos de optimización y verificación realizados para la determinación de las condiciones experimentales más adecuadas. Asimismo se describe el desarrollo de un sistema de control interno de amplificación para evitar los falsos negativos debido a la inhibición de la muestra, su mecanismo molecular y los ensayos realizados para su implementación en el sistema de detección de VPHs.

Capítulo 2. Resultados obtenidos en el estudio de muestras clínicas (período 2003-2010)

Se describen los resultados obtenidos al utilizar el método descrito en el capítulo 1, al procesar 9000 muestras clínicas en el período comprendido entre 2003 y 2010. Se realizan diferentes análisis estadísticos de la distribución de los diferentes tipos víricos identificados.

Capítulo 3. Caracterización de dos nuevas variantes de papilomavirus

Se describen los resultados obtenidos al identificar dos nuevas variantes no descritas previamente, que fueron detectadas en dos muestras clínicas analizadas con el método presentado en el capítulo 1. Se caracteriza la secuencia completa de ambas variantes y se determina su proximidad filogenética respecto a los tipos víricos actualmente descritos.

CAPÍTULO 1. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VPHs

1.1 Comprobación de la vigencia del par de cebadores MY11 y MY09 para la detección genérica de papilomavirus mucosotrópicos

1.1.1 Alineamiento de los genomas completos de tipos de referencia

En el presente trabajo se han utilizado los oligonucleótidos MY11 y MY09 (Manos et al., 1989) como iniciadores de la PCR. Dado el tiempo transcurrido desde su diseño, y el gran número de nuevos tipos de papilomavirus descritos desde entonces, se consideró necesario comprobar su usabilidad actual. Para ello se realizó un alineamiento de los genomas completos de los tipos de referencia (representativos) de 13 especies de papilomavirus que incluyen 54 tipos mucosotrópicos, utilizando el algoritmo *clustal*. El objetivo era verificar las regiones del genoma vírico más adecuadas para el diseño de un sistema de detección de amplio espectro de los papilomavirus mucosotrópicos.

Se utilizaron las secuencias de los tipos representativos de las especies Alpha-1 (VPH32), Alpha-3 (VPH61), Alpha-5 (VPH26), Alpha-6 (VPH53), Alpha-7 (VPH18), Alpha-8 (VPH40), Alpha-9 (VPH16), Alpha-10 (VPH6), Alpha-11 (VPH-34), Alpha-13 (VPH54), Alpha-14 (VPH-90), Gamma-6 (VPH101) y Gamma-8 (VPH112). En el caso de Alpha-8 se analizó la secuencia de VPH40 ya que el tipo de referencia de esta especie (VPH7) no es mucosotrópico.

Se obtuvieron los siguientes valores de similitud de secuencia, expresado en porcentaje de nucleótidos conservados respecto a la secuencia completa de nucleótidos de la región analizada: E6 (17,7 %), E7 (18,9 %), E1 (25,1 %), E2 (25,7 %), E4 (15,6 %), E5 (18,5 %), L2 (31,1 %) y LCR (9,3 %). Se comprobó que las regiones más conservadas son por este orden los ORFs L1, E1 y E2. Se consideró que el ORF L1 es una región óptima para el desarrollo de un método de detección genérico.

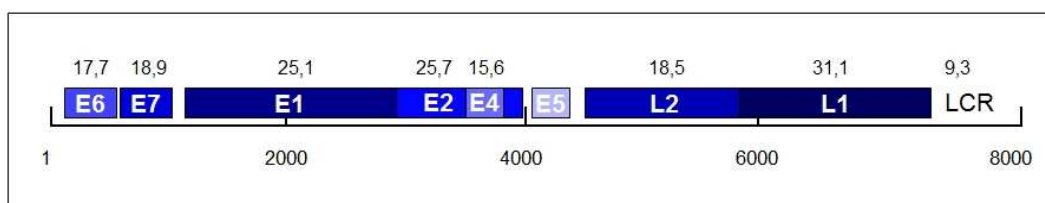


Figura 32. Similitudes de secuencia entre las regiones del genoma de los papilomavirus mucosotrópicos 6, 16, 18, 26, 32, 34, 40, 53, 54, 61, 90, 101 y 112. Los números situados sobre los ORFs indican el número de posiciones conservadas respecto al total de nucleótidos del ORF (en porcentaje). El ORF E5 se ha excluido del análisis porque no estaba presente en todos los tipos.

1.1.2 Alineamiento de las secuencias del ORF L1 de Papilomavirus mucosotrópicos

Se comprobó que los oligonucleótidos MY11 y MY09 son adecuados para la detección genérica de VPHs. Las especies Alpha-14 (VPH90), Gamma-6 (VPH101) y Gamma-8 (VPH112) podrían no ser detectadas debido a la similitud de MY09. Estos genotipos no provocan lesiones clínicamente importantes, pero debe tenerse en cuenta en los estudios epidemiológicos por el sesgo estadístico que podría suponer.

Table showing sequence alignment for VPH40, VPH6, VPH34, VPH54, VPH32, VPH16, VPH26, VPH53, VPH18, VPH61, VPH90, VPH101, and VPH112. The table contains multiple rows of nucleotide sequences with dashes indicating gaps and asterisks indicating conserved regions.



Figura 33. Alineamiento de las secuencias del ORF L1 de los tipos representativos de 13 especies de papilomavirus mucosotrópicos. Las posiciones señaladas con asterisco están conservadas en todos los papilomavirus alineados. Las zonas de color azul indican las secuencias dónde hibridan los oligonucleótidos iniciadores MY11 y MY09 utilizados en el presente trabajo.

1.2 Detección de papilomavirus en las mucosas genitales mediante PCR

Se ha amplificado mediante PCR la secuencia conservada del ORF L1 comprendida entre los oligonucleótidos MY11-MY09 de los papilomavirus mucosotrópicos, a partir del ADN vírico obtenido de tejido epitelial con los que se obtiene un producto de amplificación de 450 pb aproximadamente (dependiendo del tipo vírico).

Las condiciones experimentales se ensayaron inicialmente con muestras clínicas portadoras de papilomavirus identificados previamente mediante secuenciación y con el sistema comercial *VPH Fast* (Genomica S.A.U.) actualmente descatalogado. Los tiempos de desnaturalización, extensión y elongación final que se han utilizado son considerados estándar en las reacciones de PCR teniendo en cuenta la longitud del fragmento.

1) Temperatura de hibridación (*annealing*)

Se ha realizado un ensayo para determinar la temperatura de hibridación óptima de la PCR. Para ello se han realizado amplificaciones con temperaturas de hibridación de 45 °C, 50 °C, 55 °C y 60 °C, utilizando como molde el ADN de varios tipos de papilomavirus mucosotrópicos: VPH6, 16, 18, 32, 34, 53, 54, 71 y 81. No se ha podido comprobar con ningún tipo de las especies correspondientes a los VPHs 101 y 112, por no disponer de muestra. Se ha establecido la temperatura de hibridación óptima en 50 °C (figura 34).

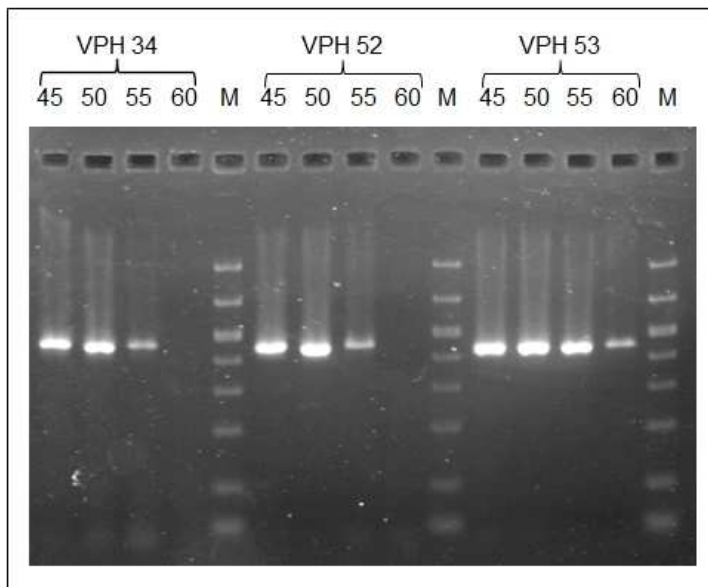
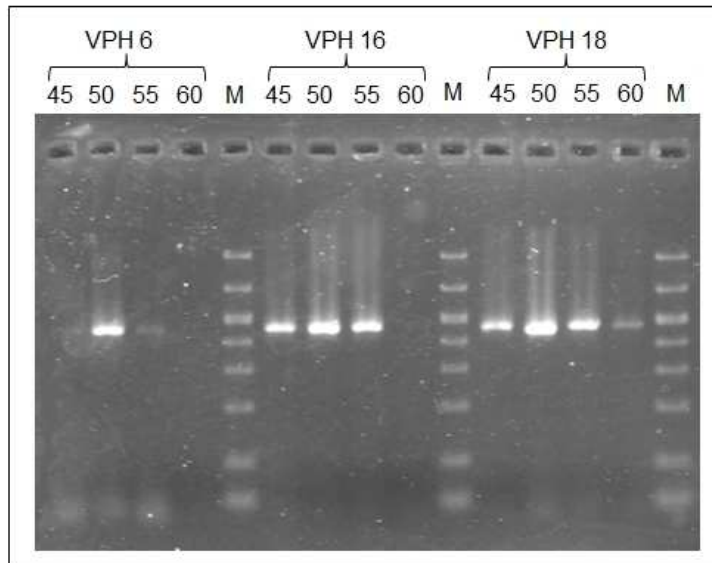
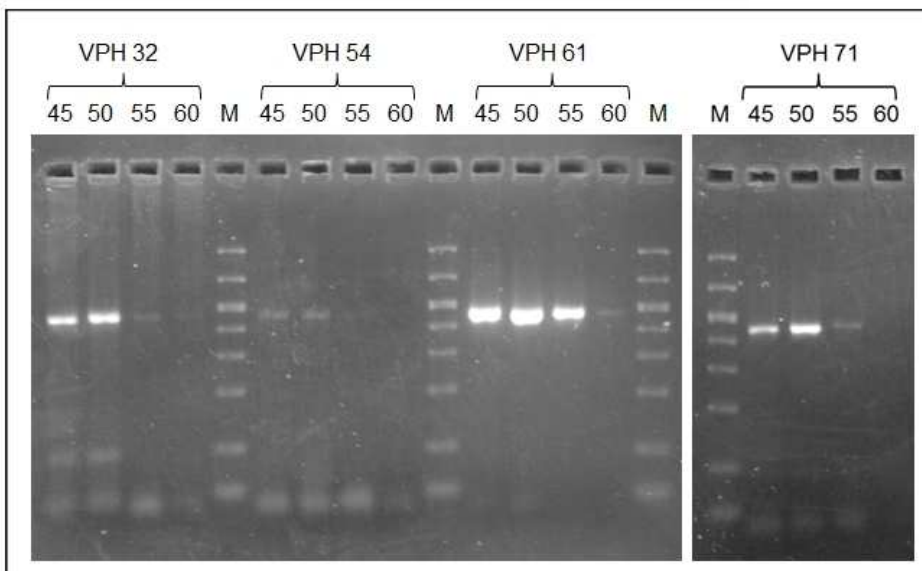


Figura 34. Ensayo para la determinación de la temperatura óptima de hibridación para la obtención del producto de amplificación comprendido entre los oligos MY11-MY09 mediante PCR. Se han realizado amplificaciones con temperaturas de hibridación de 45 °C, 50 °C, 55 °C y 60 °C utilizando como molde el ADN los VPH 6, 16, 18, 34, 52, 53, 32, 54, 61 y 71 obtenidos de muestras cervicales. En todos los tipos analizados se observa que la temperatura de hibridación de 50 °C es la que presenta el mayor rendimiento en la PCR, por lo que se ha considerado óptima. M: marcador de peso molecular *Biomarker Low* (Bioventures).



2) Concentración óptima de MgCl₂

Se ha realizado un ensayo para la determinación de la concentración óptima de MgCl₂. Para ello, se han realizado amplificaciones a partir del ADN del VPH52, utilizando concentraciones crecientes de MgCl₂. Se ha observado que se obtiene el máximo rendimiento en la amplificación cuando la concentración de MgCl es entre 1,5 y 2mM.

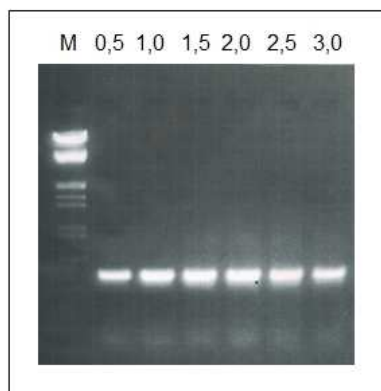


Figura 35. Ensayo para la determinación de la concentración óptima de MgCl₂. Se han realizado amplificaciones utilizando 0,5 mM, 1mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM y 3 mM de MgCl₂ en la mezcla de reacción, utilizando como molde el ADN del VPH 52 obtenido de una muestra de mucosa genital femenina. La concentración óptima de MgCl₂ se encuentra entre 1,5 y 2 mM. M: ADN del fago lambda digerido con Hind III y Eco RI. Gel de agarosa 3% / BrEt.

3) Utilización de aditivos en la reacción de PCR: DMSO y Tween-20™

Se han testado DMSO y Tween-20™ como aditivos en la reacción de PCR, ya que se ha descrito que pueden mejorar la eficiencia de ésta (Chakrabarti *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2011). Para ello, se han realizado amplificaciones a partir del ADN del VPH52, utilizando diferentes concentraciones de DMSO (1-6%) y Tween-20 (0,01-0,2). No se observó ninguna mejora con el uso de estos aditivos (resultados no mostrados).

1.3 Análisis de los productos de amplificación de diferentes tipos de papilomavirus

Se procedió a la detección de diferentes tipos de papilomavirus disponibles, con las condiciones de reacción establecidas previamente. Se comprobó la especificidad de todos los productos de amplificación mediante la secuenciación de los mismos.

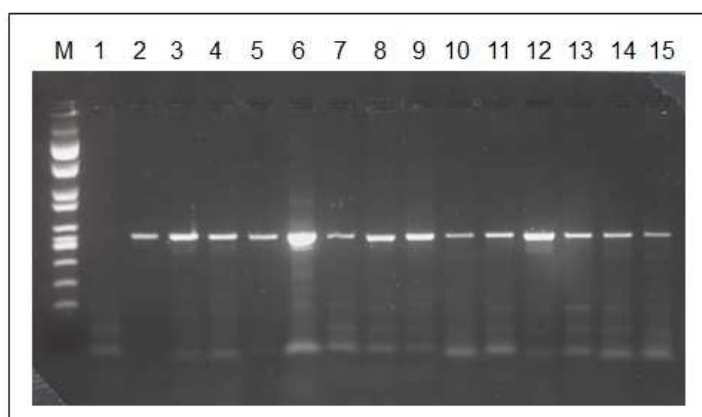


Figura 36. Análisis electroforético de los productos de amplificación MY11-MY09, obtenidos a partir del ADN de diferentes Papilomavirus. Carriles: 1: muestra no portadora de Papilomavirus; 2: VPH 6; 3: VPH 11; 4: VPH 16; 5: VPH 18; 6: VPH 31; 7: VPH 33; 8: VPH 52, 9: VPH 53; 10: VPH 58; 11: VPH 61; 12: VPH 62; 13: VPH 67; 14: VPH: 68; 15: VPH 69. M: ADN del plásmido pUC18 digerido con TaqI, Gel de agarosa 3% / BrEt.

1.4 Identificación de papilomavirus mediante *RFLPs*

1.4.1 Mapas de restricción de los fragmentos MY11/MY09

Se ha realizado un estudio teórico basado en el análisis de los fragmentos de restricción del producto de amplificación MY11/MY09, al ser digerido con las enzimas de restricción *Afl* II, *Alu* I, *Alw* 26I, *Alw* 44I, *Ava* II, *Ava* L, *Avr* II, *Bbs* I, *Bbv* I, *Bfr* I, *Bgl* II, *Bsa* BI, *Bsa* JI, *Bsa* OI, *Bsa* WI, *Bsi* EI, *Bsm* I, *Bso* FI, *Bsp* I286, *Bsr* BI, *Bsr* DI, *Bsr* FI, *Bsr* GI, *Bst* NI, *Bst* OI, *Bst* UI, *Cfo* I, *Cla* I, *Csp* 45I, *Dpn* I, *Dra* I, *Eco* RI, *Fok* I, *Hae* II, *Hae* III, *Hha* I, *Hpa* II, *Hin* P1I, *Hinc* II, *Hind* II, *Kas* I, *Mbo* I, *Mbo* II, *Mnl* I, *Msa* A1I, *Mse* I, *Msl* I, *Msp* I, *Mun* I, *Mvn* I, *Nci* I, *Nhe* I, *Nsp* I, *Rsa* I, *Sac* II, *Sau* 3AI, *Sau* 96I, *Sfi* II, *Sna* BI, *Spe* I, *Sph* I, *Tth* 111I, *Xba* I, *Xcm* I, *Xho* I, *Xho* II y *Xma* I. En el apartado de discusión se exponen más detenidamente los criterios para la selección de las enzimas de restricción incluidas en el estudio.

Como resultado del estudio de los mapas de restricción, se ha podido establecer un protocolo de digestiones con las enzimas de restricción *Rsa* I, *Alu* I y *Hae* III, que permite la determinación, prácticamente inequívoca, de los papilomavirus presentes en muestras clínicas. El método propuesto para la identificación de los papilomavirus consiste en la realización de 2 digestiones del amplicón MY11-MY09 por separado, con la enzima *Rsa* I y con las enzimas *Alu* I + *Hae* III simultáneamente (figura 37).

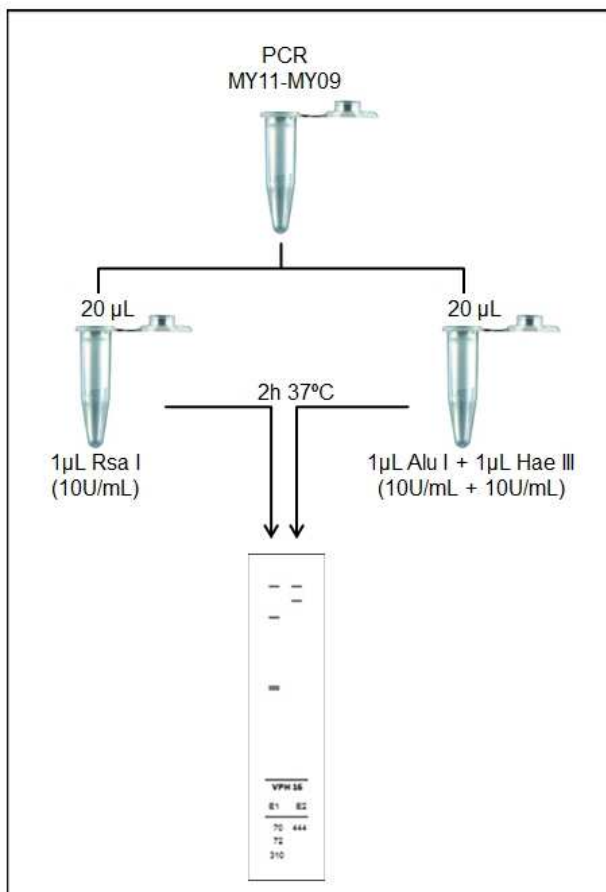
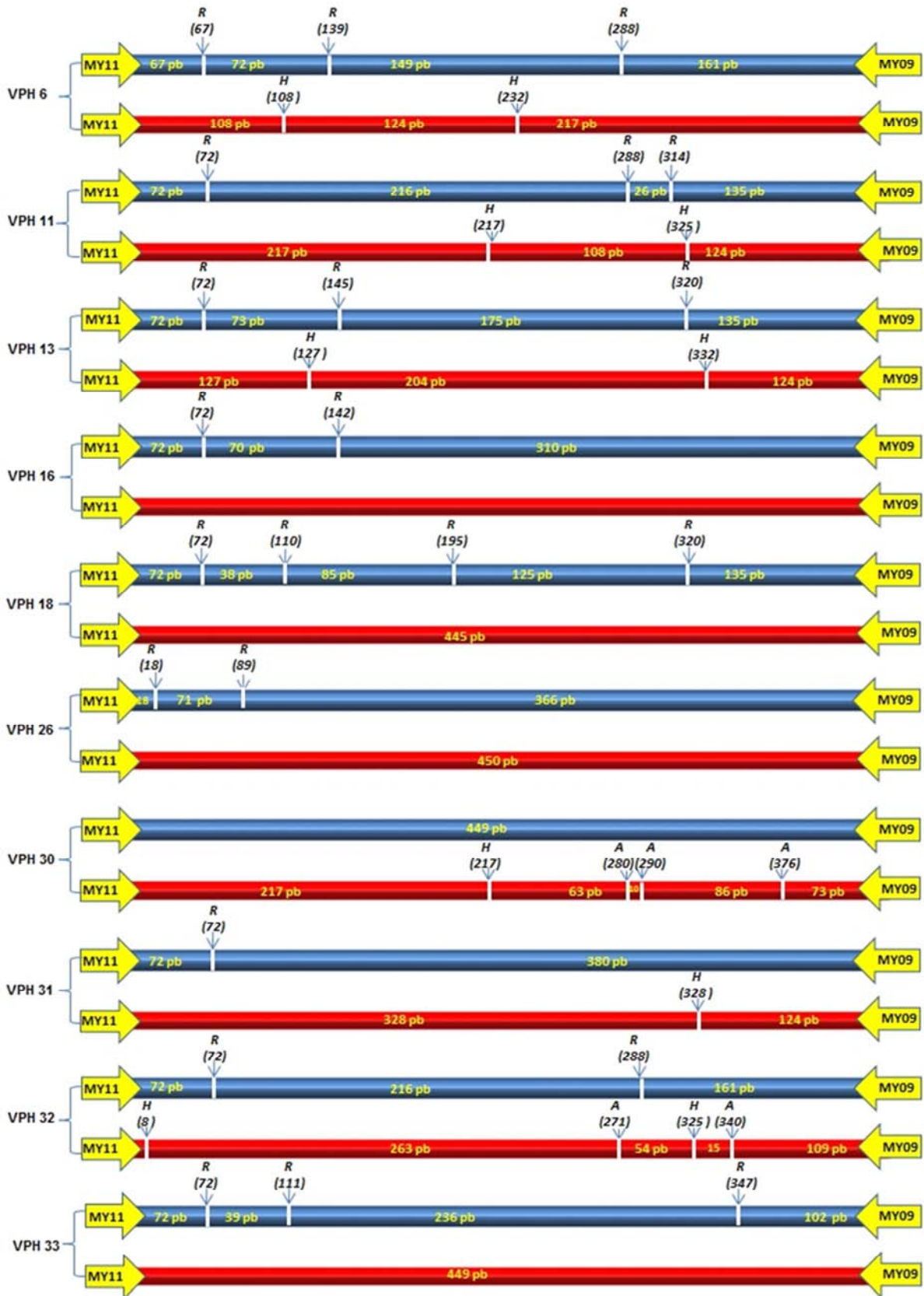
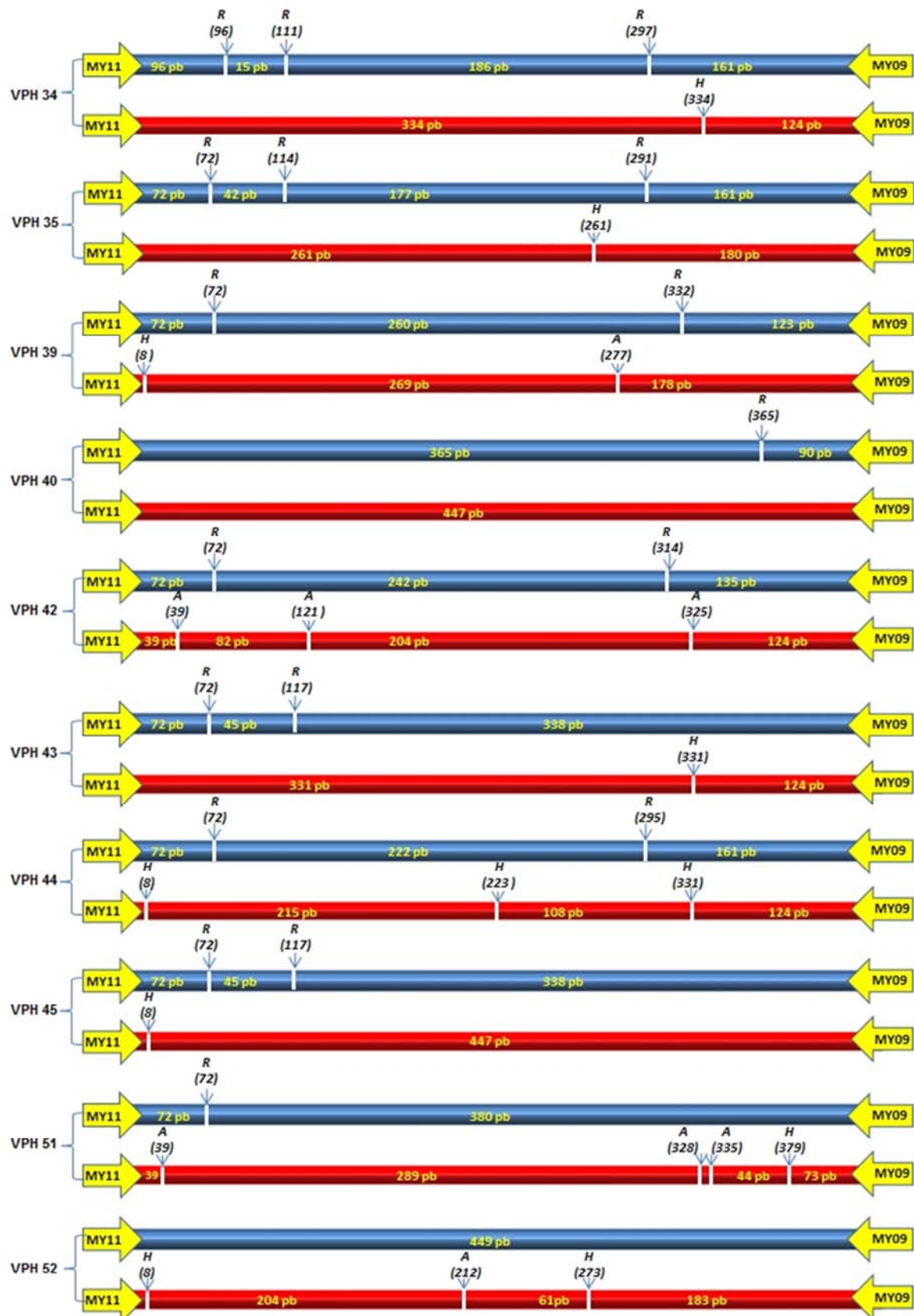
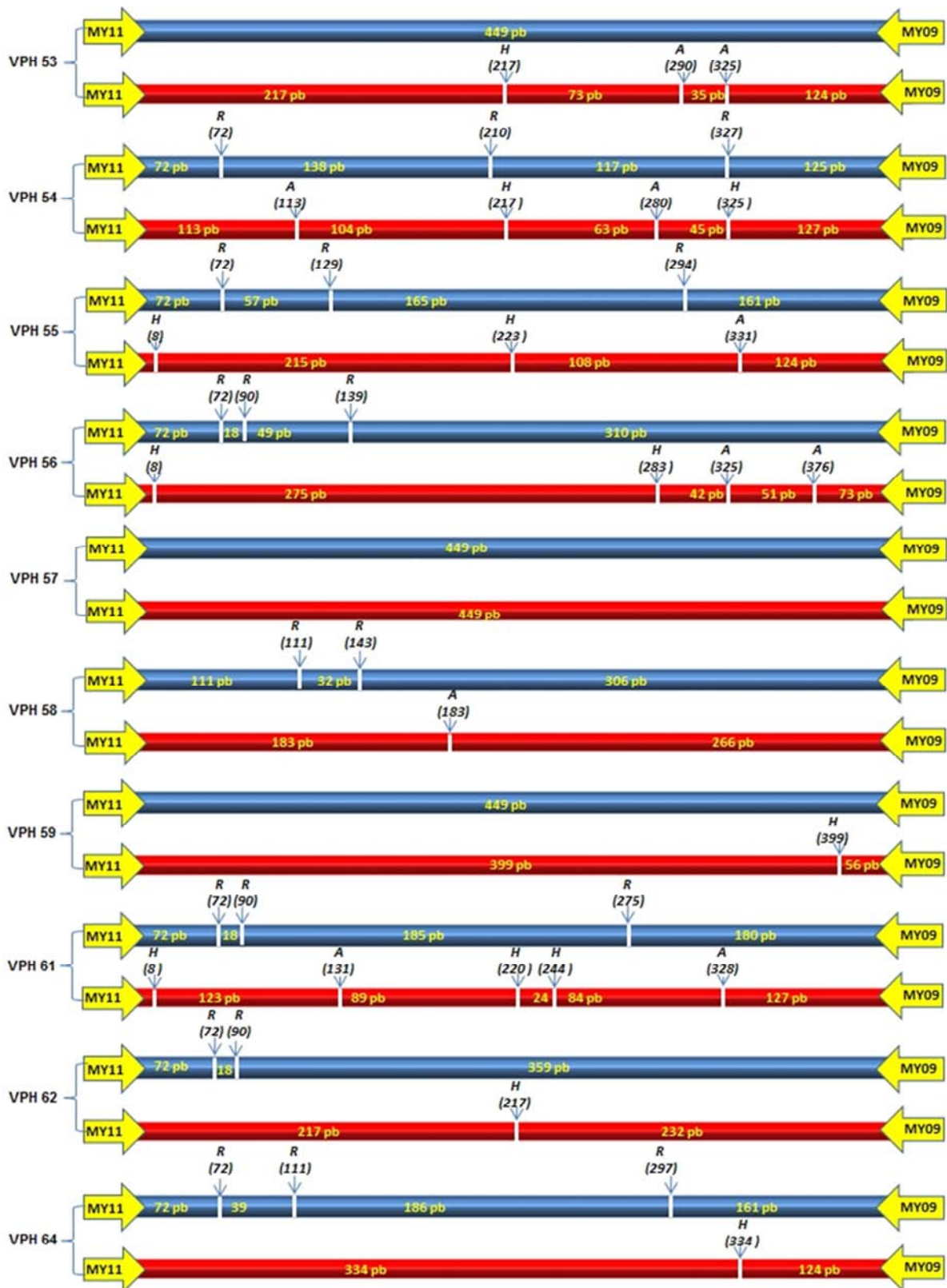
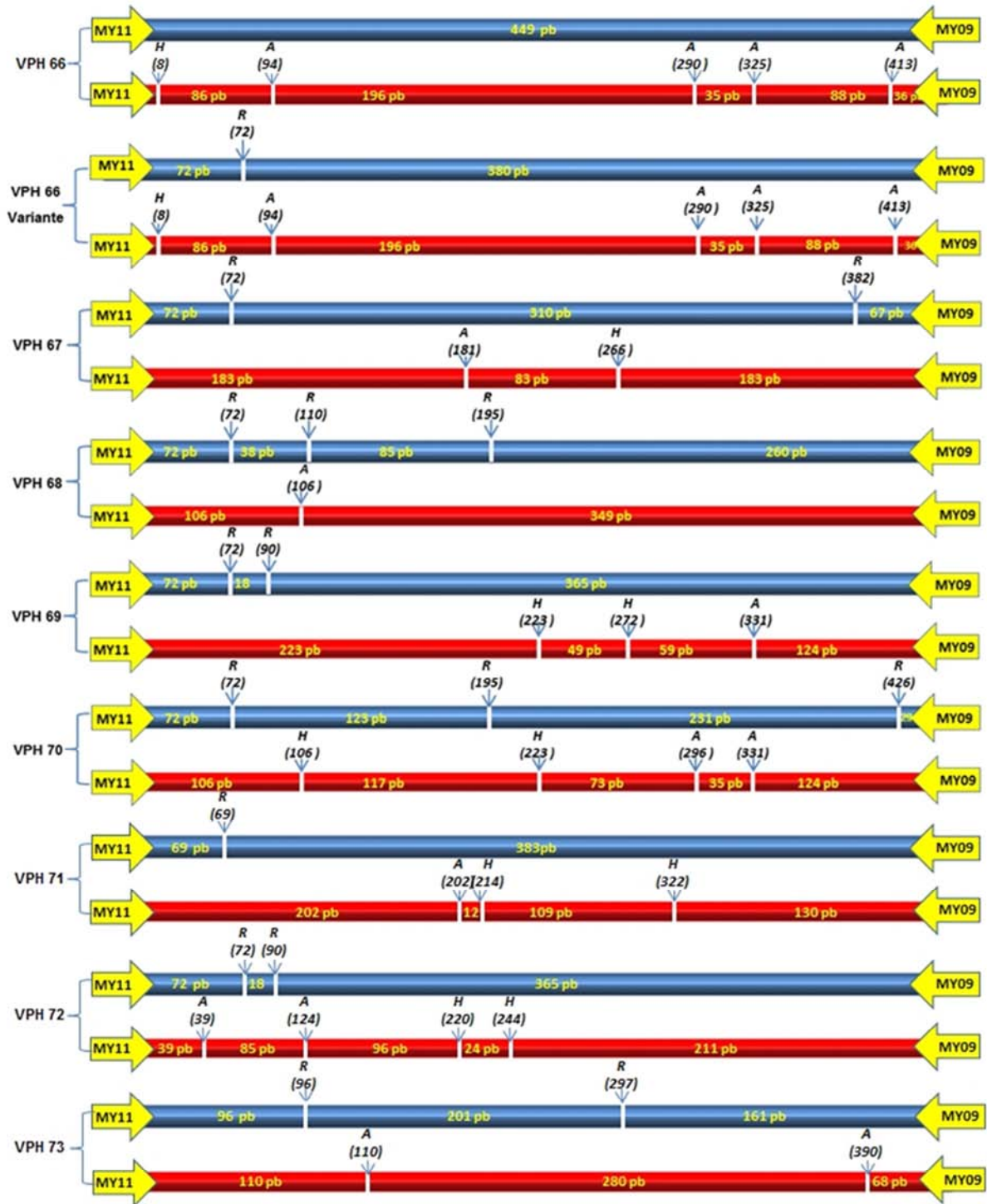


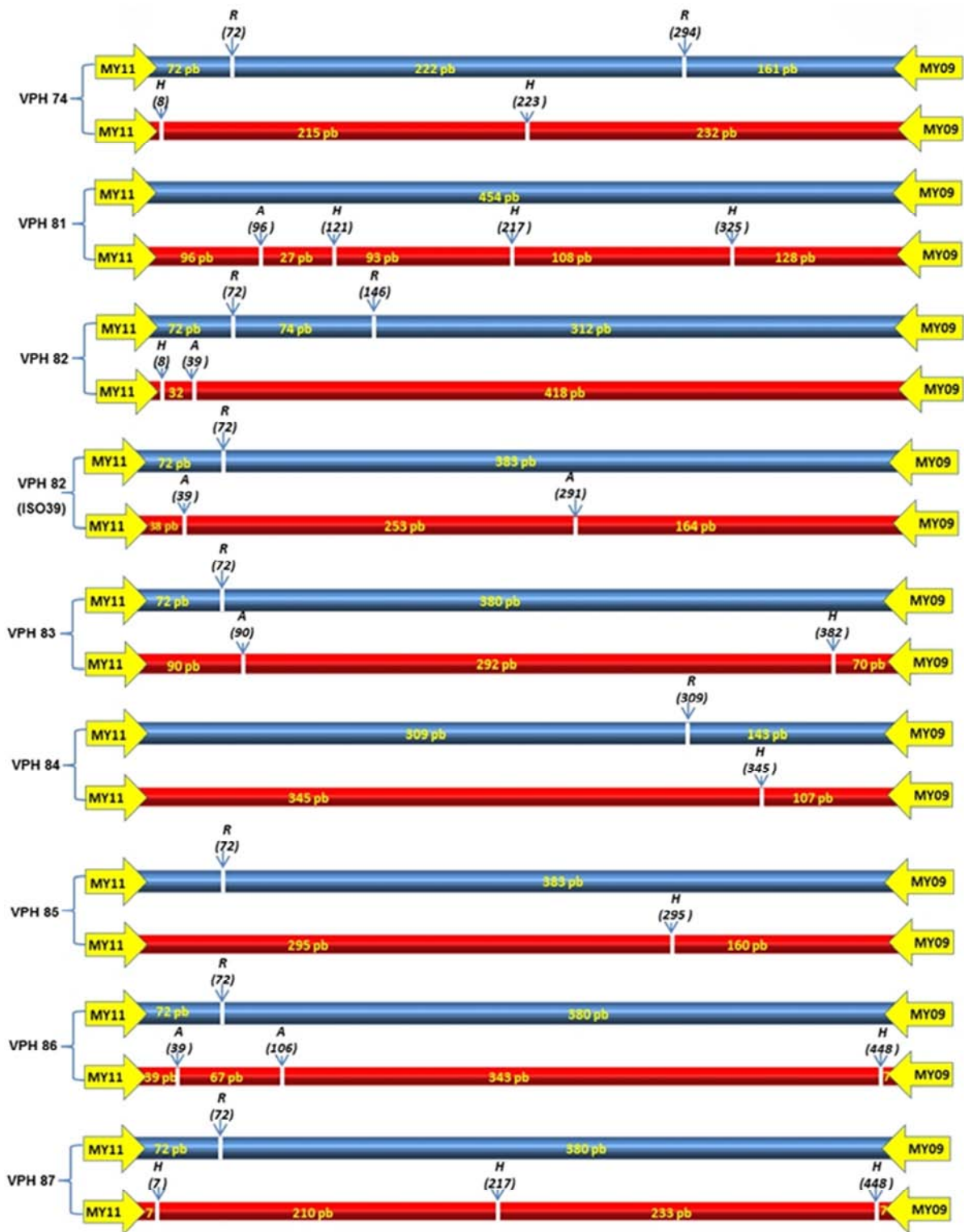
Figura 37. Esquema de las digestiones enzimáticas del fragmento MY11-MY09 llevadas a cabo para la identificación del genotipo de VPH presente en muestras clínicas mediante análisis del tamaño de los fragmentos de restricción.











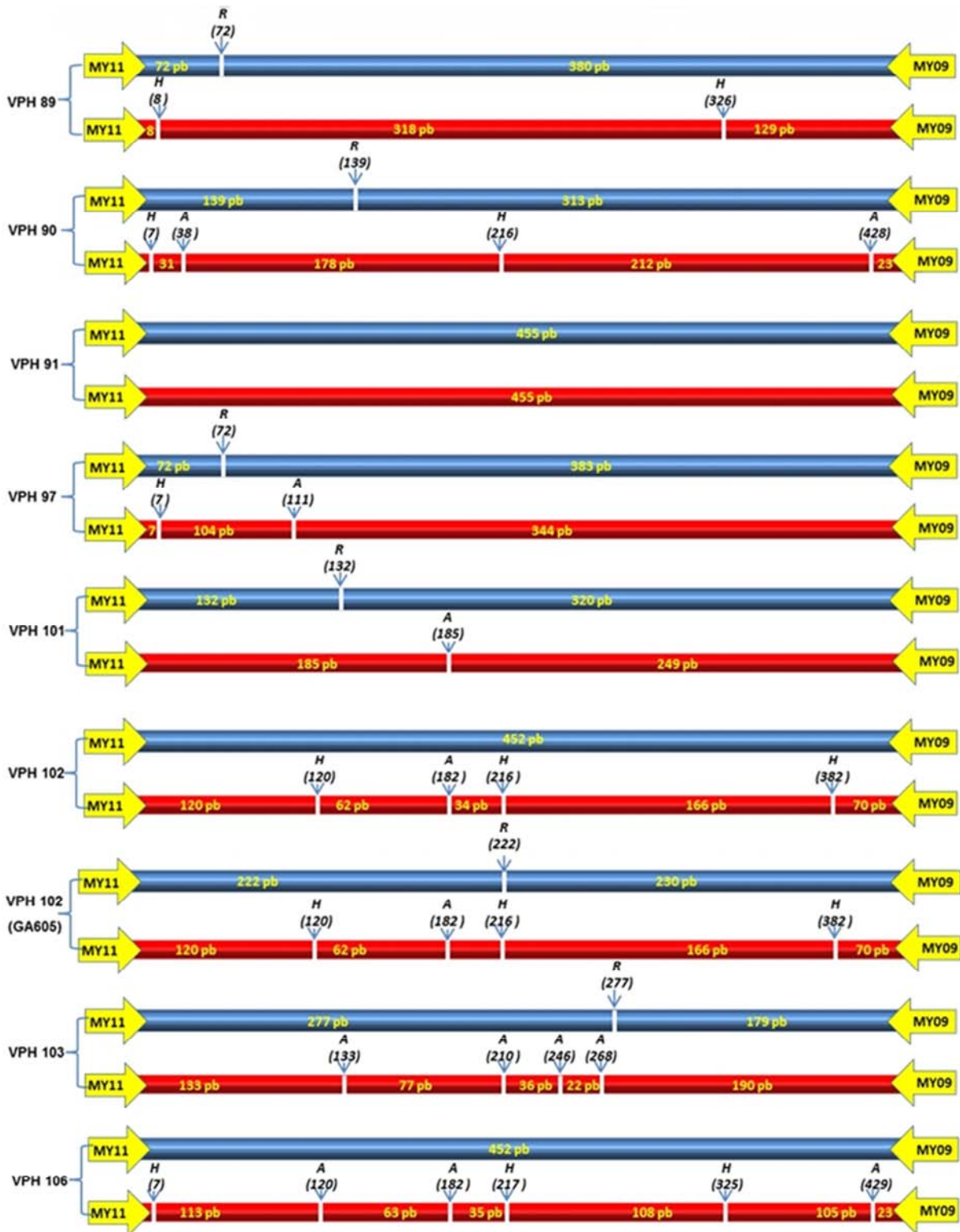


Figura 38. Sitios de restricción de las enzimas empleadas en el presente sistema en el amplicón MY11-MY09. Para cada tipo analizado se muestran entre paréntesis los sitios de corte de la digestión con *Rsa*I (barra azul) y de la digestión con *Alu*I + *Hae*III (barra roja). Los números en amarillo sobre la barra muestran los tamaños de los fragmentos resultantes.

1.4.2 Patrones de restricción del fragmento MY11/MY09 de los VPHs mucosotrópicos

Se han construido los patrones de restricción que se obtienen de las digestiones con *Rsa* I, y con *Alu* I + *Hae* III, del fragmento MY11-MY09 (figura 39). Estos patrones se han preparado a partir de los fragmentos de restricción que se obtienen al digerir el amplicón MY11-MY09 de los papilomavirus mucosotrópicos analizados (tabla 18).

Fragmentos de restricción de los papilomavirus mucosotrópicos					
VPH	Fragmentos restricción		VPH	Fragmentos restricción	
	<i>Rsa</i> I	<i>Alu</i> I + <i>Hae</i> III		<i>Rsa</i> I	<i>Alu</i> I + <i>Hae</i> III
18	38, 72, 85, 125, 135	455	33	39, 72, 102, 236	449
54	72, 117, 125, 138	45, 63, 104, 113, 127	42	72, 135, 242	39, 82, 124, 204
6	67, 72, 149, 161	108, 124, 217	68	38, 72, 85, 260	106, 349
55	57, 72, 161, 165	108, 124, 215	39	72, 123, 260	178, 269
13	72, 73, 135, 175	124, 127, 204	58	32, 111, 306	183, 266
35	42, 72, 161, 177	180, 261	56	18, 49, 72, 310	42, 51, 73, 275
61	18, 72, 180, 185	24, 84, 89, 123, 127	67	67, 72, 310	83, 183, 183
64	39, 72, 161, 186	124, 334	16	70, 72, 310	444
34	15, 96, 161, 186	124, 334	45	45, 72, 338	447
73	96, 161, 201	68, 110, 280	43	45, 72, 338	124, 331
11	26, 72, 135, 216	108, 124, 217	62	18, 72, 359	217, 232
32	72, 161, 216	15, 54, 109, 263	69	18, 72, 365	49, 59, 124, 223
74	72, 161, 222	215, 232	72	18, 72, 365	24, 39, 85, 96, 211
44	72, 161, 222	108, 124, 215	40	90, 365	447
70	29, 72, 123, 231	35, 73, 106, 117, 124	31	72, 380	124, 328
51	72, 380	39, 44, 73, 289	52	449	61, 183, 204
30	449	63, 73, 86, 217	53	449	35, 73, 124, 217
57	449	449	59	455	56, 399
66	449	35, 36, 86, 88, 196	89	72, 380	129, 318
83	72, 380	70, 90, 292	71	69, 383	109, 130, 202
86	72, 380	39, 67, 343	87	72, 380	210, 233
82 (ISO39)	72, 383	38, 164, 253	85	72, 383	160, 295
97	72, 383	104, 344	102	452	34, 62, 70, 120, 166
106	452	35, 63, 105, 108, 124	81	454	27, 93, 96, 108, 128
91	455	455	102 (GA605)	222, 230	34, 62, 70, 120, 166
103	179, 277	37, 78, 133, 190	84	143, 309	107, 345
82	72, 74, 312	32, 418	90	139, 313	23, 31, 178, 212
101	132, 320	185, 249	66 (Variante)	72, 380	35, 36, 86, 88, 196
26	18, 71, 366	450			

Tabla 18. Fragmentos de restricción que se obtienen a partir de la región comprendida entre los oligonucleótidos MY11 y MY09 de los diferentes papilomavirus analizados. Se han descartado los fragmentos menores a 18 pb.

1.4.3 Análisis de los fragmentos de restricción del producto de amplificación

MY11/MY09 con *Rsa* I

Se han realizado digestiones enzimáticas con *Rsa*I del producto de amplificación MY11-MY09 de muestras clínicas portadoras de uno o varios papilomavirus (figuras 40 y 41). Se ha comprobado la obtención de los fragmentos esperados de acuerdo con los mapas de restricción, por lo que se considera que esta enzima es adecuada para el uso previsto.

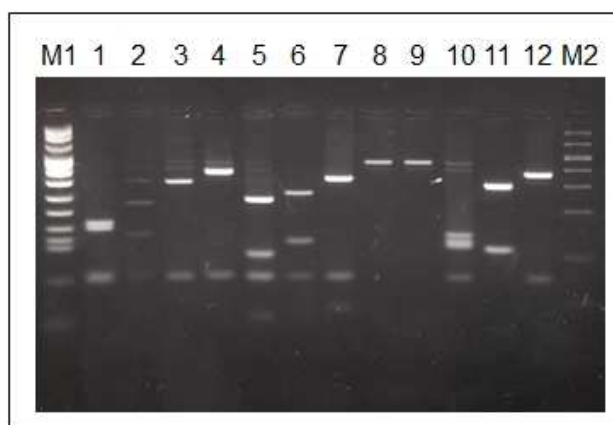


Figura 40. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos mediante digestión del producto de amplificación MY11/MY09 (450 pb) con la enzima *Rsa* I. Muestras portadoras de un sólo tipo de Papilomavirus (excepto carril 2). Carriles: M1: Marcador VIII de Roche; 1: VPH 6; 2: VPH 11 + 31; 3: VPH 16; 4: VPH 31; 5: VPH 33; 6: VPH 39; 7: VPH 45; 8: VPH 52; 9: VPH 53; 10: VPH 54; 11: VPH 58; 12: VPH 72; M2: Marcador en escalera (50, 100, 200, 300, 400, 500, 525, 750, 1000 pb). Gel de agarosa 3 % / BrEt.

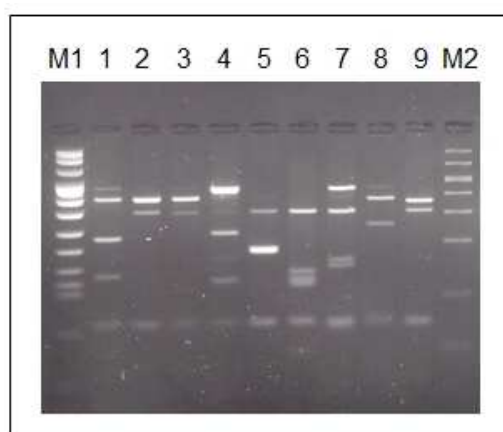


Figura 41. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos mediante digestión del producto de amplificación MY11/MY09 (450 pb) con la enzima *Rsa* I. Muestras portadoras de varios tipos de Papilomavirus. 1: VPH 11+ 31; 2: VPH 16+31; 3: VPH 58+31; 4: VPH 42+53; 5: VPH 61+16; 6: VPH 16+18; 7: VPH 6+16+53; 8: VPH 31+?; 9: VPH 16+?. M1: Marcador VIII de Roche. M2: Marcador en escalera (50, 100, 200, 300, 400, 500, 525, 750, 1000). Gel de agarosa 3 % / BrEt.

1.4.4 Análisis de los fragmentos de restricción del producto de amplificación MY11/MY09 con *Alu I* + *Hae III*

Se han realizado digestiones enzimáticas con *Alu I* + *Hae III* del producto de amplificación MY11-MY09 de muestras clínicas portadoras de uno o varios papilomavirus (figuras 42 y 43). Se ha comprobado la obtención de los fragmentos esperados de acuerdo con los mapas de restricción, por lo que se considera que estas enzimas son adecuadas para el uso previsto. Asimismo se ha comprobado que son compatibles para su uso simultáneo.

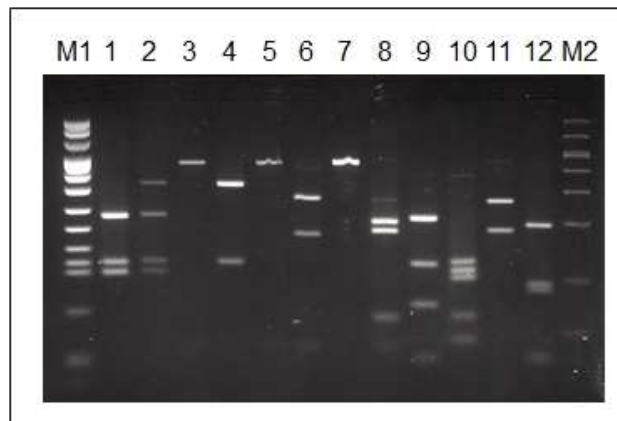


Figura 42. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos mediante digestión del producto de amplificación MY11/MY09 (450 pb) con las enzimas *Alu I* y *Hae III* simultáneamente. Muestras portadoras de un sólo tipo de Papilomavirus (excepto carril 2). Carriles: M1: Marcador VIII de Roche; 1: VPH 6; 2: VPH 11 + 31; 3: VPH 16; 4: VPH 31; 5: VPH 33; 6: VPH 39; 7: VPH 45; 8: VPH 52; 9: VPH 53; 10: VPH 54; 11: VPH 58; 12: VPH 72; M2: Marcador en escalera (50, 100, 200, 300, 400, 500, 525, 750, 1000 pb). Gel de agarosa 3 % / BrEt.

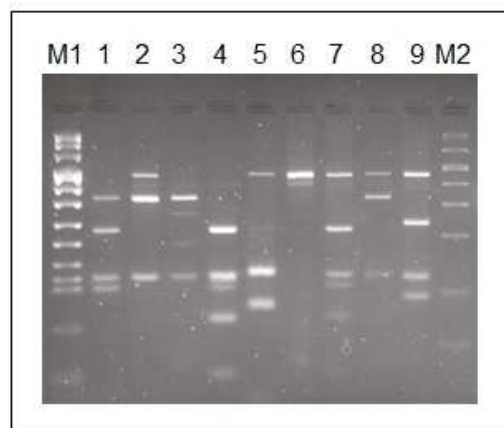


Figura 43. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el producto de amplificación MY11/MY09 (450 pb) con las enzimas *Alu I* y *Hae III* simultáneamente. Muestras portadoras de varios Papilomavirus. 1: VPH 11+31; 2: VPH 16+31; 3: VPH 58+31; 4: VPH 42+53; 5: VPH 61+16; 6: VPH 16+18; 7: VPH 6+16+53; 8: VPH 31+?; 9: VPH 16+?. M1: Marcador VIII de Roche. M2: Marcador en escalera (50, 100, 200, 300, 400, 500, 525, 750, 1000 pb). Gel de agarosa 3 % / BrEt.

1.5 Desarrollo de un sistema de control Interno de amplificación (Tecnología *CHIC*[®])

1.5.1 Diseño del control interno de amplificación

Previamente al uso del método de identificación de VPHs con muestras clínicas, se desarrolló e incorporó un sistema de control interno (CI) de amplificación para prevenir los falsos negativos. El sistema está basado en la utilización de una construcción artificial de ADN dúplex heterólogo como molde para la reacción del control interno. La construcción está formada por la secuencia comprendida entre los nucleótidos 16262-16805 de la región de unión al ATP (*ATP binding site*) del gen CFTR humano (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) relacionado con la fibrosis quística, flanqueada en ambos extremos por las secuencias de papilomavirus complementarias a los oligonucleótidos MY011 y MY09. El fragmento MY11-CFTR-MY09 tiene una longitud de 584 pb divididos en una región central de 544 pb del gen CFTR humano y los dos extremos complementarios a MY011 y MY09. Esta construcción sirve de molde en la reacción de amplificación de los papilomavirus utilizando los oligos MY11 y MY09. La región seleccionada del gen CFTR no presenta dianas de restricción para las enzimas *Rsa* I, *Hae* III ni *Alu* I, de forma que no interfiere en la identificación de los papilomavirus mediante RFLPs.

Tanto el método para obtener la construcción como el uso de la misma en la mezcla de amplificación han sido desarrollados exclusivamente para este trabajo. El método descrito a continuación recibe la denominación comercial registrada de "*Tecnología CHIC*" o "*CHIC technology*" de sus siglas en inglés (*Competitive Heterologous Internal Control*).

1.5.2 Obtención de la construcción MY11-CFTR-MY09 utilizada como molde para el CI

La construcción MY11-CFTR-MY09 se obtiene mediante PCR con lo que se evita recurrir a la tradicional clonación del fragmento. Para ello se ha utilizado el par de oligonucleótidos heterólogos MY09-FQ y MY11-FQ y como molde ADN genómico humano. La secuencia del oligonucleótido MY11-FQ está formada por la secuencia del oligonucleótido MY11 en el extremo 5' y una secuencia complementaria al gen CFTR en el extremo 3'. El oligonucleótido MY09-FQ está diseñado de forma análoga.

Una vez obtenido el amplicón, éste puede incluirse como un reactivo más en la mezcla de reacción utilizada para la detección de VPHs, y puede ser co-amplificado por los mismos oligonucleótidos MY11 y MY09 utilizados para la detección de VPHs. No es necesario añadir ningún reactivo adicional a la mezcla de PCR (oligonucleótidos, etc).

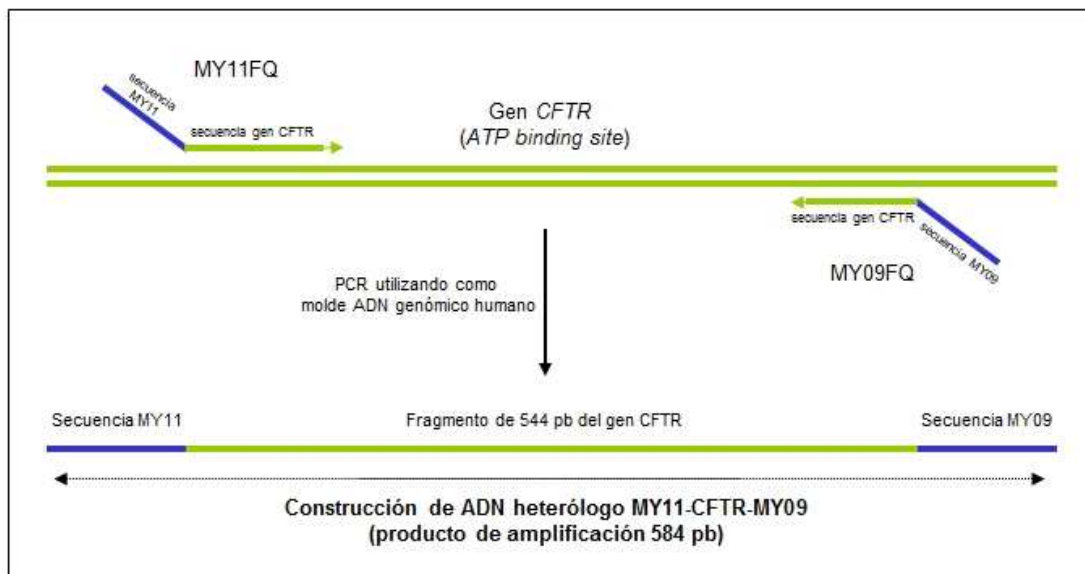


Figura 44. Esquema de la preparación mediante PCR de la construcción de ADN heterólogo utilizado como molde del control interno. Los oligonucleótidos MY11FQ y MY09FQ presentan en su extremo 5' las mismas secuencias que los oligonucleótidos MY11 y MY09, respectivamente, y en su extremo 3' secuencias complementarias al gen humano CFTR. El par de oligonucleótidos MY11FQ-MY09FQ pueden utilizarse como iniciadores para la amplificación de un fragmento del gen CFTR. El amplicón obtenido tiene un tamaño de 584 pb y consiste en una secuencia de 544 pb del gen CFTR humano, flanqueada en sus extremos por las secuencias víricas complementarias a los oligonucleótidos MY11 y MY09.

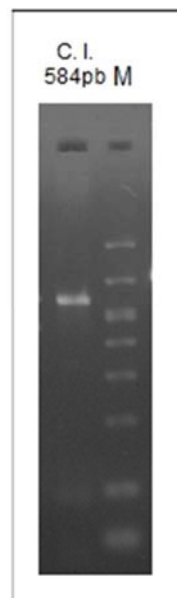


Figura 45. Análisis electroforético del producto de amplificación obtenido utilizando los oligonucleótidos heterólogos MY11FQ y MY09FQ, y como molde ADN genómico humano. El fragmento de 584 pb consiste en una secuencia de 544 pb del gen CFTR humano, flanqueada en sus extremos por las secuencias víricas complementarias a los oligonucleótidos MY11 y MY09. M, marcador de peso molecular Biomarker Low de Bioventures, Inc

1.5.3 Utilización del control interno de amplificación en la detección de papilomavirus

Se ha utilizado la construcción artificial de ADN heterólogo MY11-CFTR-MY09 como molde para el CI de amplificación, incluyéndola como un componente más en la mezcla de reacción. El producto de amplificación de 584 pb del CI debe aparecer en todas las reacciones, sean portadoras o no del virus. Las muestras negativas deben presentar sólo la banda de 584 pb del CI. Las muestras positivas deben presentar además la banda de 450 pb del ORF vírico L1. Los falsos negativos no presentarán la banda correspondiente al CI ni la del virus y por tanto pueden ser detectados.

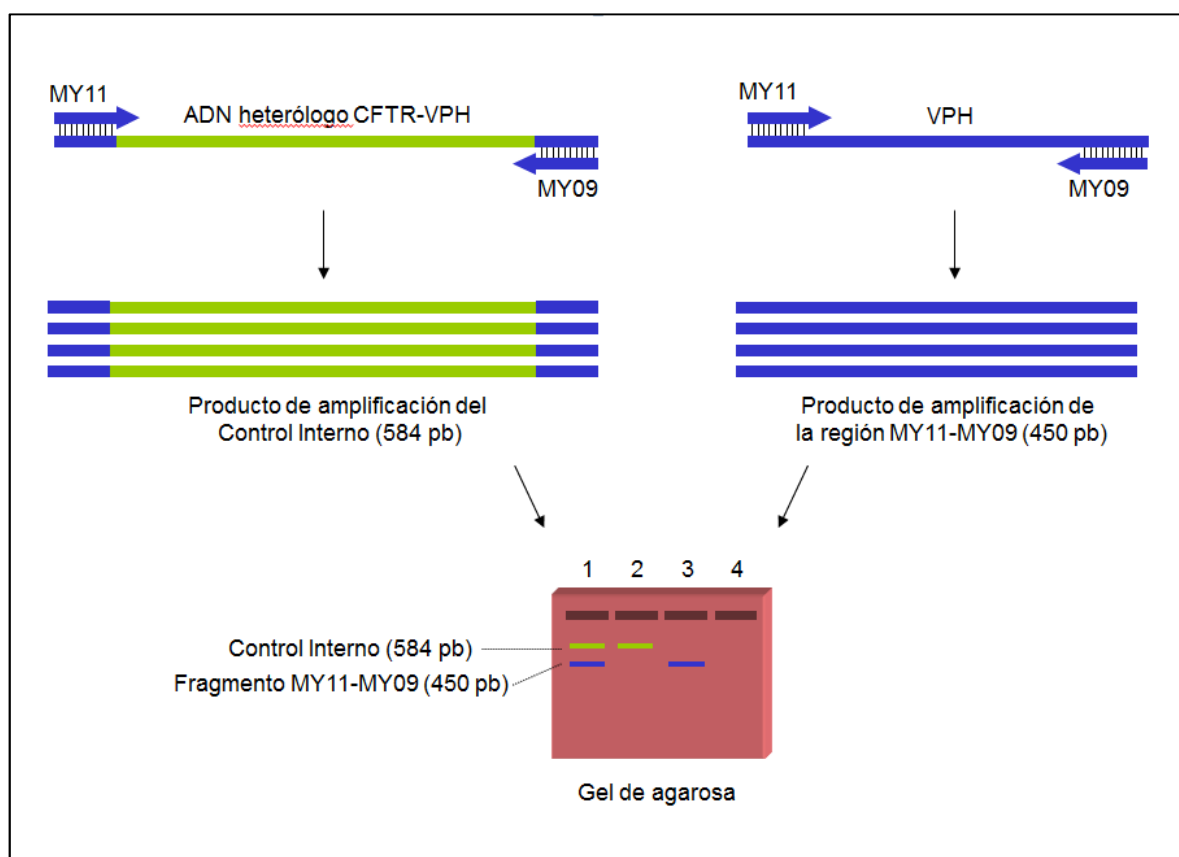


Figura 46. Esquema de la co-amplificación del fragmento específico de papilomavirus y del CI. Se ha representado de color verde las secuencias del gen CFTR humano y en color azul las secuencias de los Papilomavirus. En el gel de agarosa, el carril 1 representa una muestra positiva (se detectan ambas bandas); el carril 2 representa una muestra negativa (sólo se detecta la banda del CI); el carril 3 representa una muestra positiva en la que no se detecta la banda del CI (posible en casos de elevada carga viral) y el carril 4 representa una muestra inhibida.

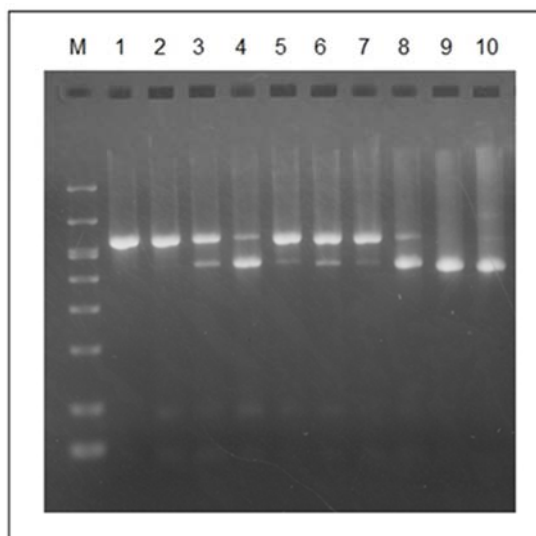


Figura 47. Análisis electroforético de los productos de amplificación de una serie de muestras portadoras y no portadoras de papilomavirus. Carriles: M, marcador de peso molecular Biomarker Low (Bioventures); 1 y 2: muestras no portadoras de papilomavirus (se amplifica sólo el producto de 584 pb del CI); 3-8, muestras portadoras de papilomavirus (se co-amplifican los productos de 450 pb correspondiente a papilomavirus y de 584 pb correspondiente al CI); 9 y 10, muestras portadoras de papilomavirus (se amplifica sólo el producto de 450 pb de papilomavirus). La ausencia de producto de amplificación del CI en los carriles 9 y 10 se debe a la competencia entre el ADN molde de los papilomavirus y del CI, probablemente debido a la elevada carga viral en la muestra.

1.5.4 Competencia entre el control interno y los VPHs: concentración óptima del CI

Tal y como se ha indicado, las reacciones de amplificación del CI y de VPH compiten por los mismos recursos de reacción. La presencia en la mezcla de reacción de una cantidad excesiva de la construcción MY11-CFTR-MY09 puede generar una inhibición de la amplificación del VPH presente en la muestra, especialmente en aquéllas con baja carga viral. Se han realizado ensayos de dilución límite para determinar la concentración mínima necesaria de la construcción artificial. Se pretende que ésta se encuentre en desventaja competitiva respecto al VPH, y que los recursos de reacción se empleen prioritariamente en la amplificación del ADN vírico, en detrimento del CI, de forma que la amplificación del CI no reste sensibilidad a la detección de VPHs.

Se han realizado amplificaciones a partir de muestras portadoras de VPH16, en presencia de diferentes concentraciones de la construcción MY11-CFTR-MY09. Se han utilizado diluciones seriadas del amplicón desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , y también en ausencia de éste. Cuando se utilizaron diluciones de 10^{-5} o más concentrado se obtuvo sólo el producto de amplificación del CI (584 pb). Cuando se utilizaron diluciones del fragmento VPH-CFTR de 10^{-6} y 10^{-7} , se obtuvieron los productos de amplificación tanto del CI. (584 pb) como de VPH16 (450 pb).

Cuando se utilizaron diluciones de 10^{-8} o más diluido, sólo se ha detectado el producto de amplificación de VPH (450 pb). Este resultado muestra la competencia entre el CI y VPH por los reactivos de PCR. A las diluciones más concentradas del CI sólo se detecta el producto de éste, mientras que a las más diluidas sólo se detecta el producto de papilomavirus. A las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-7} se co-amplifican ambos productos, por lo que se considera la dilución 10^{-7} la más adecuada para la preparación de la reacción.

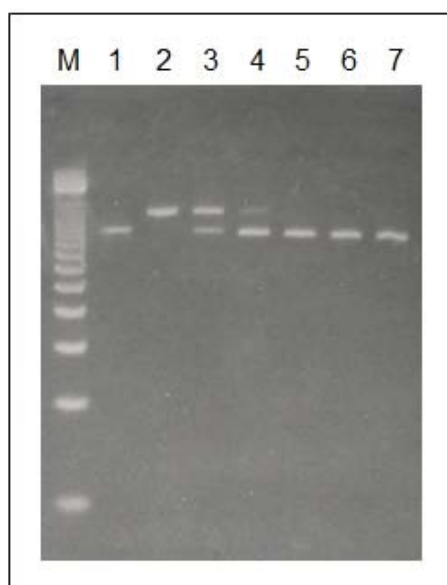
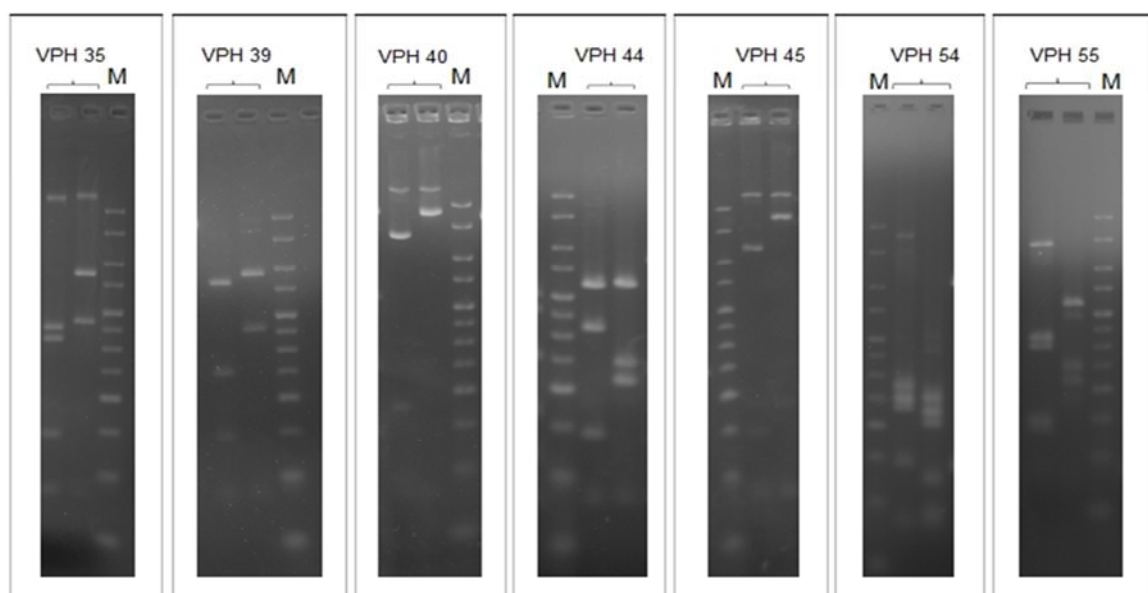
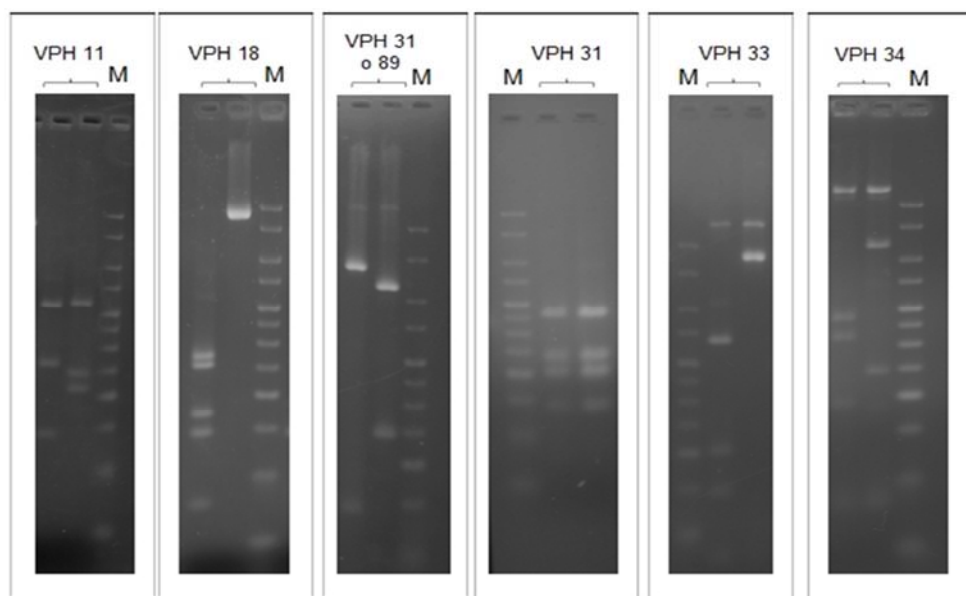
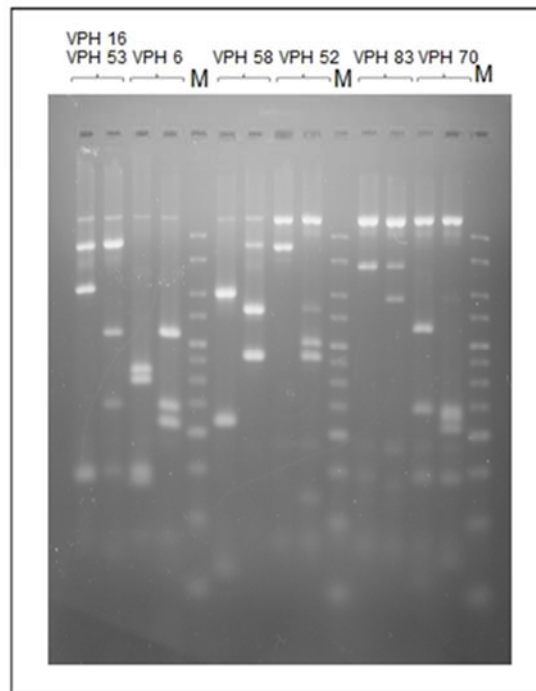


Figura 48. Análisis electroforético de los productos de amplificación de una muestra portadora de VPH 16 en presencia de una dilución seriada del control interno. Carriles: M: marcador de peso molecular en escalera de 100 pb; 1: sin CI; 2: dilución 10^{-5} del CI; 3: dilución 10^{-6} del CI; 4: dilución 10^{-7} del CI; 5: dilución 10^{-8} del CI; 6: dilución 10^{-9} del CI; 7: dilución 10^{-10} del CI. En ausencia del control interno sólo se obtiene la banda de 452 pb de la región MY11-MY09 del Papilomavirus 16 (carril 1). A diluciones superiores a 10^{-8} no se obtiene producto de amplificación del CI (carriles 5,6 y7).

1.6 Utilización del método para la identificación de VPHs en muestras clínicas

El conjunto del método desarrollado en el presente trabajo permite la detección e identificación de papilomavirus en muestras clínicas, así como la detección de los falsos negativos mediante un sistema de control interno de amplificación basado en la tecnología denominada CHIC (marca registrada). En las siguientes figuras se muestran los resultados de la visualización en gel de agarosa de la identificación de papilomavirus mucosotrópicos.



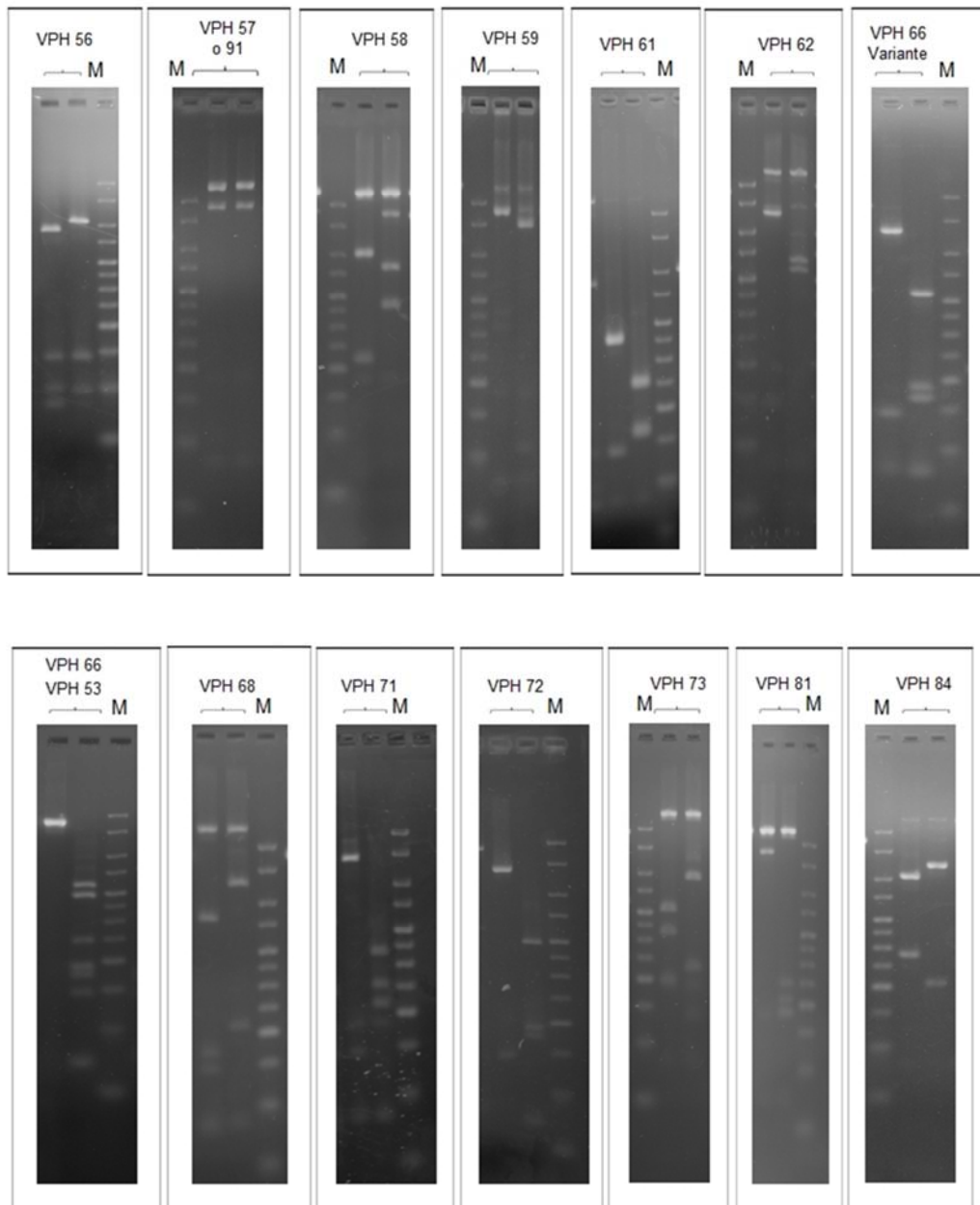


Figura 49. Análisis electroforético de las digestiones enzimáticas para la identificación de los diferentes genotipos víricos de acuerdo con el método descrito en el apartado 1.4.1 y la figura 37. Para cada papilomavirus se realizan dos digestiones simultáneas del fragmento MY11-MY09: la primera se realiza con *RsaI* y se carga en el carril izquierdo; la segunda se realiza con *AluI* + *HaeIII* y se carga en el carril derecho. Como puede observarse en algunos casos, el CI (584 pb) permanece en la parte alta del gel sin digerir, de forma que no interfiere con los fragmentos de restricción. MW: Hyperladder V (Bioline).

1.7 Sensibilidad, límite de detección y especificidad

Para calcular el límite de detección del presente método de detección de VPHs se ha utilizado el control positivo comercial *1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA (NIBSC code: 06/202)* portador de VPH 16 a una concentración de 10^4 UI/ μ L. Se prepararon 24 réplicas de diluciones seriadas de este control de acuerdo con el método descrito en apartado de materiales y métodos. Los resultados indicaron que el **límite de detección es de 50 UI/ μ L**. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Concentración VPH 16	VP	FN	Sensibilidad
10^4 UI/ μ L	23	1	95,8 %
10^3 UI/ μ L	24	24	100 %
10^2 UI/ μ L	23	1	95,8 %
5 x 10 UI/μL	23	24	95,8 %
2,5 x 10 UI/ μ L	13	24	54,2 %
10 UI/ μ L	18	6	75 %

Tabla 19. Resultados obtenidos para determinar el límite de detección del método de detección de VPHs. Se analizaron 20 réplicas de 5 diluciones preparadas a partir del control comercial de VPH16. Se detectó VPH en 23 de 24 réplicas (95,8 % de sensibilidad) en la dilución correspondiente a 50 UI/ μ L de VPH 16. VP: verdaderos positivos. FN: falsos negativos.

Para calcular la especificidad se analizaron 24 muestras negativas para VPH (obtenidas de la mucosa oral de individuos sanos). Ninguna de las 24 muestras dio un resultado positivo, lo que sugiere una **especificidad del 100%**.

1.8 Mercado CE-IVD, denominación comercial y uso comercial del método

El método descrito cumple los requisitos como reactivo para diagnóstico *in vitro*, de acuerdo con la Directiva europea 98/79/CE y los Reales decretos 1662/2000 y 1591/2009 que regulan la obtención del marcado CE-IVD. Está registrado en la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) con la denominación comercial *Papitype* (marca registrada) y número de registro RPS/469/2012 (fecha 05/2012). El sistema de control interno se ha registrado con la denominación comercial *CHIC technology (Competitive Heterologous Internal Control)*.

El método ha sido utilizado en varios laboratorios de analítica clínica asistencial, tanto mediante la utilización del conjunto de reactivos *Papitype*, como mediante técnica de preparación "casera" (*in house*). Desde su puesta en el mercado en el año 2003 hasta la fecha se han comercializado 115 unidades de *Papitype* (40 tests por unidad), lo que significa que ha permitido aproximadamente el procesamiento de 4.600 muestras clínicas. En su uso como técnica *in house* se estima que se han procesado unas 22.000 muestras clínicas con la utilización de este método desde sus primeras versiones en laboratorios asistenciales.

En total se estima que más de 26.000 muestras clínicas, mayoritariamente cervicales, han sido analizadas con este sistema, por lo que se puede considerar que ha sido uno de los métodos más utilizados en España durante la última década para el diagnóstico y la prevención del cáncer de cuello de útero y otras lesiones asociadas a los papilomavirus.

CAPÍTULO 2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE MUESTRAS CLÍNICAS (PERÍODO 2003-2010)

2.1 Muestras clínicas analizadas

Entre los años 2003 y 2010 se han realizado 9.734 ensayos con el presente sistema a partir de muestras genitales con diagnóstico previo de lesiones precancerosas, dudosas y condilomas, así como muestras post-tratamiento (conización, radioterapia, quimioterapia e histerectomías). Se procesaron 8556 muestras de mujeres (87,89 %) 238 muestras de hombres (2,46 %) y de 940 muestras no fue informado el sexo (9,66 %). Se ha podido identificar el origen de 7.438 muestras, que provenían de 3 comunidades autónomas: 2.327 muestras de Castilla la Mancha, 4.047 muestras de Canarias y 1.064 de la Comunidad Valenciana.

	NÚMERO	%
MUJERES	8.556	87,89 %
HOMBRES	238	2,46 %
INDETERMINADO	940	9,66 %
TOTAL	9734	100 %

Tabla 20. Total de muestras analizadas desde 2003 a 2010 con el presente sistema de identificación de VPHs.

2.2 Detección de papilomavirus en las muestras analizadas

Se detectó el ADN de VPHs en 3.341 muestras (34,32 %), 6.358 (65,32%) fueron negativas y 35 no pudieron ser valoradas debido a inhibición de la PCR. Entre las muestras positivas, 3.158 (94,52%) eran portadoras de un solo tipo de VPH, 176 (1,81 %) eran portadoras de 2 tipos de VPH y 7 (0,07 %) eran portadoras de 3 o más tipos de VPH (tabla 21).

	NÚMERO	%
TOTAL	9734	100 %
POSITIVAS	3.341	34,32 %
1 VPH	3.158	32,44 % (94,52 %)
2 VPHs	176	1,81 % (5,27 %)
> 3 VPHs	7	0,07 % (0,21 %)
NEGATIVAS	6.358	65,32 %

Tabla 21. Total de muestras analizadas con el presente sistema desde 2003 a 2010. Se indica el número total y el porcentaje de muestras negativas, positivas y no valorables, así como el número de papilomavirus detectados en las muestras positivas. En cursiva se indica el porcentaje de muestras portadoras de uno, dos o más de tres genotipos respecto al total de muestras positivas.

2.3 Distribución de los diferentes genotipos de papilomavirus

En las 3.341 muestras positivas, se han detectado en total 3.394 virus correspondientes a 39 genotipos diferentes de papilomavirus actualmente descritos. Se han detectado un total de 2.473 genotipos de alto riesgo (70,8 %), 789 genotipos de bajo riesgo (22,58 %) y 232 papilomavirus no identificados. El sistema de control interno de amplificación desarrollado en el presente trabajo ha permitido la detección de 35 muestras no valorables, debido a la inhibición de la reacción de amplificación. De no disponerse de este sistema, estas muestras hubieran sido consideradas negativas erróneamente.

Los cinco tipos más frecuentes en la población son VPH16, VPH53, VPH31, VPH66 y VPH58 (tabla 22). El VPH16 fue el tipo más prevalente, detectándose en 840 muestras (25,14%). Estos cinco genotipos corresponden a papilomavirus de alto riesgo. El papilomavirus de bajo riesgo más prevalente fue el VPH6 (7,51 %) seguido del VPH 61 (2,90 %).

En 232 muestras (6,94 %) se detectaron VPHs no identificados (232 en total), como virus único en 215 muestras, y combinado con otros sí identificados en el resto. En la mayoría de los casos la imposibilidad de identificar al virus se debió a la obtención de un débil producto de amplificación, que no permitió un análisis fiable del patrón de restricción ni identificarlo mediante secuenciación.

Por otro lado, se encontraron patrones atípicos que correspondían con variantes que presentaban mutaciones puntuales en los sitios de restricción. Estas variantes fueron identificadas mediante secuenciación y clasificadas estadísticamente dentro del tipo de referencia.

Cabe destacar que en dos casos se obtuvieron fragmentos de restricción cuyo patrón no coincidía con ninguno de los patrones teóricos, y que al ser identificados posteriormente mediante secuenciación fueron identificados como dos nuevos genotipos no descritos hasta el momento. Éstos fueron inicialmente identificados con las referencias A0383 y E1201 y el análisis de la secuencia de sus amplicones MY11-MY09 mostró cierta homología con VPH72 y VPH86 respectivamente. Su caracterización se describe en el capítulo siguiente.

VPH	NÚMERO	FRECUENCIA	VPH	NÚMERO	FRECUENCIA
VPH 6	251	7,51%	VPH 59	31	0,93%
VPH 11	68	2,04%	VPH 61	97	2,90%
VPH 16	840	25,14%	VPH 62	38	1,14%
VPH 18	128	3,83%	VPH 64	3	0,09%
VPH 31	254	7,60%	VPH 66	229	6,85%
VPH 32	4	0,12%	VPH 67	7	0,21%
VPH 33	122	3,65%	VPH 68	26	0,78%
VPH 34	12	0,36%	VPH 69	4	0,12%
VPH 35	16	0,48%	VPH 70	44	1,32%
VPH 39	36	1,08%	VPH 71	14	0,42%
VPH 40	7	0,21%	VPH 72	37	1,11%
HVP 44	5	0,15%	VPH 73	10	0,30%
VPH 45	46	1,38%	VPH 81	59	1,77%
VPH 51	1	0,03%	VPH 82	31	0,93%
VPH 52	95	2,84%	VPH 83	19	0,57%
VPH 53	284	8,50%	VPH 84	91	2,72%
VPH 54	34	1,02%	VPH 85	2	0,06%
VPH 55	3	0,09%	VPH 87	8	0,24%
VPH 56	85	2,54%	VPH 89	54	1,62%
VPH 58	212	6,35%	VPH IND	232	6,94%

Tabla 22. Frecuencia de muestras portadoras de cada tipo de papilomavirus mucosotrópico detectado en el periodo de tiempo comprendido entre 2003 y 2010 en muestras que provenían de diferentes centros de España. Dado que 183 muestras eran portadoras de más de un tipo vírico, el sumatorio de los porcentajes no corresponde con el 100 % de las muestras. En negrita se indican los datos referentes a los papilomavirus de alto riesgo.

2.4 Relación entre el tipo vírico y las lesiones en la mucosa genital femenina

Lesiones en la mucosa cervical femenina

Se conocían los datos clínicos de 872 muestras (del resto no se reportaron) de las que 870 correspondían a muestras genitales femeninas. De éstas, se ha detectado VPH en 368 (42,3 %), 494 (56,8 %) dieron un resultado negativo y 8 muestras no pudieron ser valoradas por inhibición en la reacción de amplificación. De las 368 muestras positivas, 23 presentaban co-infección por más de un tipo de papilomavirus. Las dos muestras de la mucosa genital masculina de las que se reportaron datos clínicos correspondían a condilomas de la región del balanoprepucial y ambas muestras dieron un resultado positivo en VPH 6.

Se han descartado las 23 muestras portadoras de más de un genotipo a fin de evitar que las coinfecciones debidas a tipos de bajo y alto riesgo sesgaran los resultados, así como las 8 muestras no valorables (tabla 23). En definitiva, el estudio se ha basado en 839 muestras (345 muestras positivas debidas a un único VPH + 494 muestras negativas).

MUESTRAS UTILIZADAS PARA ESTUDIAR LA RELACIÓN EL TIPO VÍRICO Y CLÍNICA	
MUESTRAS CON DATOS CLÍNICOS	872
MUJERES	870
HOMBRES	2
MUESTRAS POSITIVAS (INCLUYENDO COINFECCIONES)	368
NO VALORABLES (INHIBIDAS)	8
COINFECCIONES	23
MUESTRAS POSITIVAS (INFECCIONES SIMPLES)	345
NEGATIVAS	494

Tabla 23. Resumen de las muestras de mujeres utilizadas para estudiar la relación el tipo vírico y los datos clínicos de las mujeres con patología genital. En negrita se han señalado las 839 muestras incluidas en el estudio (345 positivas y 494 negativas).

Se ha estudiado la relación entre el tipo vírico y los datos clínicos aportados, clasificando las lesiones genitales femeninas en las siguientes categorías: ASCUS/AGUS, condiloma, LSIL, HSIL/AIS y muestras de seguimiento del tratamiento (conización, resección, radioterapia, quimioterapia o histerectomía). No se reportaron muestras de microcarcinoma o carcinoma invasor de cérvix (tablas 24, 25, 26 y 27).

DETECCIÓN DE VPH - CLINICA (SOLO MUJERES PORTADORAS DE UN ÚNICO GENOTIPO VÍRICO)											
	ASCUS/AGUS		CONDILOMA		LSIL		HSIL/AIS		POST-TRATAMIENTO		TOTAL
VPH POSITIVO	152	39,07%	14	66,67%	122	43,88%	49	52,13%	8	14,04%	345
VPH NEGATIVO	237	60,93%	7	33,33%	156	56,12%	45	47,87%	49	85,96%	494
TOTAL MUESTRAS	389		21		278		94		57		839

Tabla 24. Muestras positivas y negativas en relación a los datos clínicos conocidos.

RELACION VPH-CLINICA (MUJERES CON INFECCIONES POR UN ÚNICO GENOTIPO VÍRICO)											
	ASCUS/AGUS		CONDILOMA		LSIL		HSIL/AIS		POST-TRATAMIENTO		TOTAL
6	5	1,29%	3	14,29%	4	1,44%	0	0,00%	0	0,00%	12
11	1	0,26%	2	9,52%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	3
16	45	11,57%	1	4,76%	30	10,79%	19	20,21%	1	1,75%	96
18	5	1,29%	0	0,00%	4	1,44%	3	3,19%	0	0,00%	12
31	13	3,34%	1	4,76%	5	1,80%	4	4,26%	0	0,00%	23
33	7	1,80%	0	0,00%	3	1,08%	2	2,13%	0	0,00%	12
35	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	1,75%	1
39	2	0,51%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2
44	1	0,26%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1
45	6	1,54%	0	0,00%	5	1,80%	5	5,32%	0	0,00%	16
52	2	0,51%	0	0,00%	7	2,52%	1	1,06%	0	0,00%	10
53	12	3,08%	1	4,76%	4	1,44%	3	3,19%	0	0,00%	20
54	3	0,77%	0	0,00%	4	1,44%	0	0,00%	0	0,00%	7
56	6	1,54%	0	0,00%	7	2,52%	0	0,00%	0	0,00%	13
58	9	2,31%	3	14,29%	9	3,24%	2	2,13%	0	0,00%	23
59	1	0,26%	0	0,00%	3	1,08%	0	0,00%	1	1,75%	5
61	5	1,29%	1	4,76%	3	1,08%	0	0,00%	0	0,00%	9
62	2	0,51%	0	0,00%	0	0,00%	1	1,06%	0	0,00%	3
66	6	1,54%	1	4,76%	11	3,96%	3	3,19%	1	1,75%	22
67	1	0,26%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1
68	3	0,77%	0	0,00%	1	0,36%	1	1,06%	0	0,00%	5
70	4	1,03%	0	0,00%	2	0,72%	0	0,00%	0	0,00%	6
71	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0
72	3	0,77%	0	0,00%	3	1,08%	0	0,00%	1	1,75%	7
81	4	1,03%	0	0,00%	3	1,08%	0	0,00%	0	0,00%	7
82	0	0,00%	0	0,00%	1	0,36%	1	1,06%	0	0,00%	2
83	1	0,26%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	1,75%	2
84	1	0,26%	0	0,00%	3	1,08%	0	0,00%	0	0,00%	4
89	0	0,00%	0	0,00%	2	0,72%	3	3,19%	0	0,00%	5
IND	4	1,03%	1	4,76%	8	2,88%	1	1,06%	2	3,51%	16
ND	237	60,93%	7	33,33%	156	56,12%	45	47,87%	49	85,96%	494
	389	100,00%	21	100,00%	278	100,00%	94	100,00%	57	100,00%	839

Tabla 25. Frecuencia de los diferentes tipos de papilomavirus dependiendo de los datos clínicos conocidos. Los porcentajes están expresados en relación al tipo de lesión.

En las 839 muestras seleccionadas, se detectó el virus en el 40% aproximadamente de las muestras dudosas (ASCUS/AGUS) y de bajo riesgo (LSIL) así como en algo más del 50% de las muestras con lesión de alto grado. Tan sólo el 14,04 % de las muestras post-tratamiento fueron positivas, mientras que el 66,67 % de los condilomas dieron resultado positivo.

Se observa una gran diversidad de genotipos tanto en las lesiones dudosas como en las de alto y bajo grado. En las muestras con lesiones de bajo grado (LSIL y condilomas) y las dudosas (ASCUS/AGUS) consideradas conjuntamente, se detectan 26 genotipos distintos en un total de 288 muestras. En estas muestras se ha detectado un papilomavirus de alto riesgo en el 76,74 % de las muestras.

Las lesiones de alto grado (HSIL) y las tomas post-tratamiento presentan conjuntamente 17 genotipos distintos en 57 muestras. En estas lesiones se ha detectado un papilomavirus de alto riesgo en un 84,21 % de las muestras. Si se consideran exclusivamente las lesiones de alto grado, el 89,80 % está asociado a VPH de alto riesgo.

RELACION VPH - CLINICA (SOLO MUJERES PORTADORAS DE 1 HPV)											
	ASCUS/AGUS		CONDILOMA		LSIL		HSIL/AIS		POST-TRATAMIENTO		TOTAL
VPH POSITIVO	152	100,00%	14	100,00%	122	100,00%	49	100,00%	8	100,00%	345
VPH BAJO RIESGO	26	17,11%	6	42,86%	22	18,03%	4	8,16%	2	25,00%	60
VPH ALTO RIESGO	122	80,26%	7	50,00%	92	75,41%	44	89,80%	4	50,00%	269
INDETERMINADO	4	2,63%	1	7,14%	8	6,56%	1	2,04%	2	25,00%	16

Tabla 26. Frecuencia de los papilomavirus de alto y los de bajo riesgo, en relación a los datos clínicos conocidos.

RELACION VPH - CLINICA (SOLO MUJERES PORTADORAS DE 1 HPV)						
	LESIONES DE BAJO GRADO Y DUDODAS			HSIL/AIS + POST-TRATAMIENTO		TOTAL
VPH POSITIVO	288			100,00%		345
VPH BAJO RIESGO	54			18,75%		60
VPH ALTO RIESGO	221			76,74%		269
INDETERMINADO	13			4,51%		16

Tabla 27. Frecuencia de los papilomavirus de alto y los de bajo riesgo, en relación a los datos clínicos conocidos, agrupando las lesiones de bajo riesgo y las dudosas por un lado, y las de alto riesgo y post-tratamiento por otro. Los porcentajes están expresados en relación al tipo de lesión.

2.5 Relación entre los papilomavirus y la edad en las mujeres

Se disponía del dato de la edad en 3.340 muestras de las 8.556 muestras procesadas de la mucosa genital femenina. Las muestras procedían de mujeres con edades comprendidas entre los 4 y los 82 años (tabla 28). El mayor número de muestras se concentra en el tramo de edad comprendido entre 20 y 39 años: 2.213 muestras (66,6 %).

Se detectó papilomavirus en 1253 muestras, mientras que 2087 fueron negativas. El sistema de control interno permitió la detección de 17 muestras no valorables por inhibición de la reacción de amplificación.

Se observa que la mayor prevalencia de la infección se produce entre 20 y 34 años (61,1 % de las muestras) siendo el tramo de edad de 20-24 años es el de mayor prevalencia (22,73 %). La mayor frecuencia (20,14 %) de genotipos de bajo riesgo se ha detectado en el tramo de edad de 15-19 años. Este porcentaje disminuye significativamente en los tramos de edad posteriores, aunque vuelve a incrementarse en el tramo de mujeres mayores de 60 años.

EDAD	MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS VPH	
< 15	2	1	0,08%
15-19	144	70	5,66%
20-24	568	281	22,73%
25-29	569	257	20,79%
30-34	564	217	17,56%
35-39	512	163	13,19%
40-44	430	115	9,30%
45-49	303	71	5,74%
50-54	123	27	2,18%
55-59	65	21	1,70%
>60	43	13	1,05%
	3323	1236	100,00%

Tabla 28. Relación entre la detección de papilomavirus y la edad.

EDAD	MUESTRAS	POSITIVO (ALTO RIESGO)		POSITIVO (BAJO RIESGO)		POSITIVO INDETERMINADO		NEGATIVO		NO VALORABLE	
< 15	2	1	50,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	50,00%	0	0,00%
15-19	144	50	34,72%	29	20,14%	4	2,78%	74	51,39%	0	0,00%
20-24	569	231	40,60%	62	10,90%	10	1,76%	287	50,44%	1	0,18%
25-29	570	217	38,07%	45	7,89%	7	1,23%	312	54,74%	1	0,18%
30-34	566	182	32,16%	39	6,89%	4	0,71%	347	61,31%	2	0,35%
35-39	516	130	25,19%	32	6,20%	6	1,16%	349	67,64%	4	0,78%
40-44	432	97	22,45%	23	5,32%	5	1,16%	315	72,92%	2	0,46%
45-49	308	62	20,13%	8	2,60%	6	1,95%	232	75,32%	5	1,62%
50-54	124	25	20,16%	2	1,61%	2	1,61%	96	77,42%	1	0,81%
55-59	65	18	27,69%	3	4,62%	2	3,08%	44	67,69%	0	0,00%
>60	44	6	13,64%	6	13,64%	2	4,55%	30	68,18%	1	2,27%

Tabla 29. Distribución de tipos de papilomavirus en función de la edad de las muestras. Los porcentajes están calculados dentro del mismo tramo de edad. Debido a las co-infecciones la suma de las muestras positivas es superior al número de muestras analizadas que han dado un resultado positivo.

CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE DOS NUEVAS VARIANTES DE PAPILOMAVIRUS

3.1. Identificación de un nuevo papilomavirus (variante A0383)

3.1.1 Caso clínico

Se realizó una toma cervical a una paciente de 46 años para un estudio citológico rutinario en el año 2003. El análisis de las células cervicales mediante la tinción de Papanicolau mostró una lesión intraepitelial cervical de alto grado (HSIL). Algunas semanas más tarde se realizó una segunda toma cervical para detectar y tipar papilomavirus mediante el protocolo descrito en el presente trabajo. Las tomas cervicales se realizaron en el Hospital de la Marina Alta de Denia. En el laboratorio la muestra fue identificada con el número de referencia A0383.

3.1.2 Análisis de la muestra con referencia A0383 con el método descrito

Se ha utilizado el método de identificación de papilomavirus humanos descrito anteriormente para determinar el tipo vírico presente en la muestra clínica identificada con la referencia A0383. Se obtuvo una banda de 450 pb aproximadamente, correspondiente a la región del gen L1 de papilomavirus comprendida entre los oligonucleótidos MY11 y MY09, indicando la presencia de Papilomavirus en la muestra (resultado no mostrado). El análisis de restricción mostró patrones de restricción no coincidente con los esperados (carriles 6 y 7 del gel representado en la figura 50), lo que sugirió que la muestra podía ser portadora de una variante atípica de papilomavirus. La secuenciación parcial del amplicón y su análisis mediante el algoritmo BLAST mostró que el aislado A0383 presentaba máxima similitud con el VPH72.

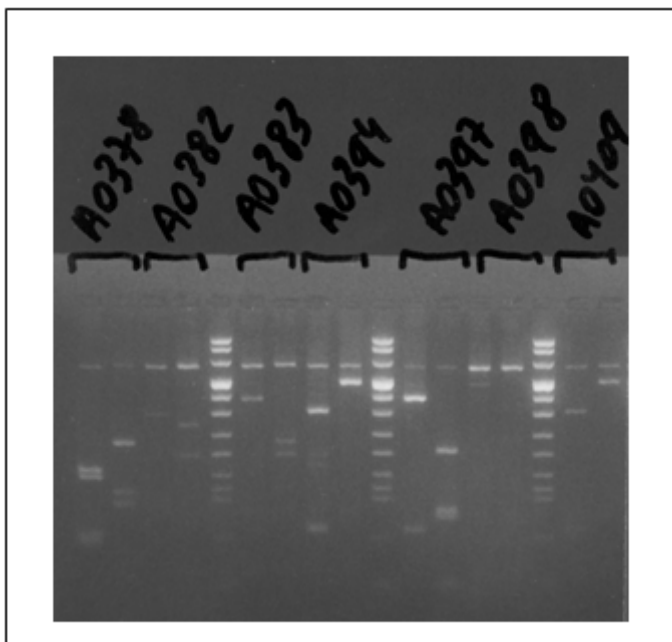


Figura 50. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el producto de amplificación MY11-MY09 de la serie original que incluyó la muestra A0383. Carriles: 1-2: muestra A0378 (portadora de VPH 6); 3-4: muestra A0382 (VPH 58); 5: marcador de peso molecular; 6-7: muestra con referencia A0383 (VPH indeterminado debido a un patrón de bandas no reconocido); 8-9: muestra A0394 (VPH16); 10: marcador de peso molecular; 11-12: muestra A0397 (VPH 72); 13-14: muestra A0398 (VPH indeterminado debido al escaso producto de amplificación); 15: marcador de peso molecular; 16-18: muestra A0409 (VPH 16). Marcador de peso molecular: *Marker VIII* de Roche. Gel de agarosa al 3% / BrEt.

3.1.3 Estudio de la variante A0383 mediante secuenciación

1) Obtención de fragmentos solapados del genoma de A0383 mediante PCR

Se han realizado ampliaciones por PCR que han permitido obtener fragmentos solapados del genoma vírico que han sido secuenciados individualmente. Para la amplificación de regiones de la variante A0383, se han diseñado oligonucleótidos iniciadores homólogos a la secuencia MY11-MY09 del nuevo aislado (obtenida previamente) y a la secuencia del VPH72, por ser el tipo filogenéticamente más cercano. Mediante la composición de sus secuencias se ha podido recomponer la secuencia completa del genoma de la variante A0383.

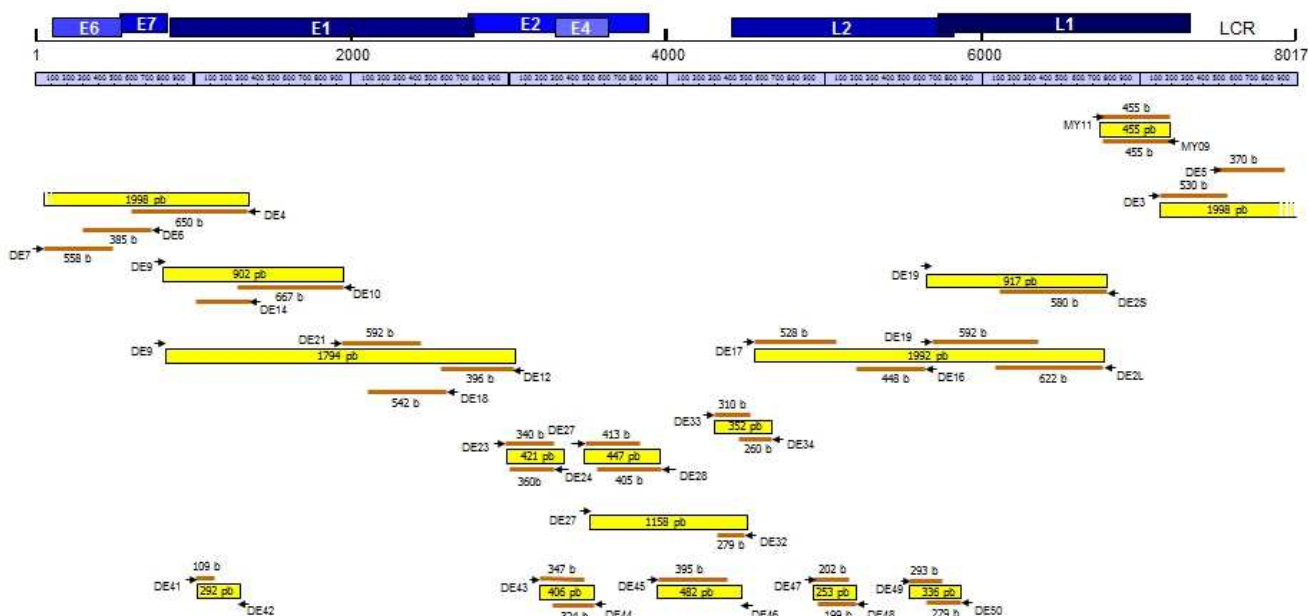


Figura 51: Esquema de la amplificación y secuenciación del genoma completo de la nueva variante A0383. El esquema muestra la posición aproximada de los 46 oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación o secuenciación (flechas), los 17 fragmentos amplificados (barras amarillas) y las secuencias parciales obtenidas a partir de estos (líneas rojas) a partir de los fragmentos amplificados. La secuencia completa del genoma vírico se puede construir mediante la composición de las secuencias parciales. Los fragmentos enmarcados con el recuadro rojo son los que estaban pendientes de caracterizar. En la parte superior, mediante barras azules, están representados los 7 ORFs que componen el genoma vírico así como las regiones reguladoras.

2) Secuencia completa de la variante A0383

A continuación se muestra la secuencia completa de la variante A0383. En azul se indica la secuencia del ORF L1.

```

GTTAATAACAATCCCATATATAAAAAGTATAAAGACACCGAAAACGGTCCGACCCGACATAGGTACATATAAAAAAGAACTGTGTGTTTCAGCAAAATCAGCAATGCATAGTGGACCGTACAAAACCT
ACCAATATCTTCCTGCTGTGCAAGGATTCGGAGGTGGACCTGGAGGATTTACGGCTTACCTGCATATTTTGCAAAAATGAATTAACAACAGAGGAAGTGCATGTGTTTGCAGAAAAGGAGCTTCG
CATTGTGTGGAGGCAGACTGGCCATTTGGAGTTTGGCCACCTTGCCCTGGCAAGAGAAGCTAAAGTGAGGGAGTACGACATTTGGAGTAATTCGTGCTACGGACCACAGTGGAAACAGAAAACAG
GAACATCATAGCAAGCTATATATAAAGTGCATGTGTGCTACACACCTTAAAGTATCAGGAAAAGGAATATCAAGTACAGGAATATATTCACCTTTCACCTAATTTCTGGACAGTGGATGGGA
AGGTGCTGCCATTTAGAGGGGATGCACGGGCCAGTGGCAACATAAAGGACATTTCTCCAGAAATTTCCCAATGTGGTTGACCTGGCATTGACAGTGTAGACAGCTCAGAGTCA
GAGTCAGAGGATGATAGGGACGGTGTGCATGAGCAGCAACCTGTAGAACAAGCAGCAGCGCTACAGGGTGGTTACTACCTGTGCATCTGCTGGTGTCCAGTGGCGGTGACAGTGCAGTGCAG
AGACGCAGACTGAAGGTGCTACAACAGCTACTGCTGGACACTTGTCCATAGTGTCCGTGCTGCCATAAAGGACATGGCCGACTGCGAAGGTACAGAAAAGCGGGGCGGGGTGATGCTGT
GGATCGCGGGGGGATGTTTATAGTTAGAGCCGTAGTGGAGCGAACCACAGGTTACAGGAGTCTAGTGTAGGACGAAAATTTGTAGGACACAGGTGAAGATTTGGTAGACTTCATAGACA
CTAGACGTCAGGGGACGGGAGGAGTGGCGTTAGAGCTGTTCGTGCAACAAAATGCACGGGATGACGCTGCAGCGTGCAGGCCCCAAAACGAAAGTATACATGTAGCCAGCAAGCAGCTCG
TGTGTCTTTGGTAGATAGTAACTAAGTCCCGGACTGGATGCCATAAGTATACCGCGGGGACACGACAGGGCTAGGAGACGGCTTTTGACCAAGACAGTGGCTATGGCCATACGCAAGTGAAGA
TATTGGAGCATCAGAGAGTGGATATGGGGGGTACACAGCATACGGAGGGGGGGGGCCCTGCACAGGAAGAGAAGAGGAGCGCTGGGGGGGGGATGTTGAGGCACAGCTAGTGCACAAA
CACAGCAACCGCAGGAGGGGGCGCAGCTGCTAGAAAATTTAAGGTAGTAATTTGCGTAACACATTTACTGCATAAATTTAAGAGCTATTTGGACTAGCATTTGGGGATATAGTAAGACAA
TTTAAAAAGTACAAGTCAACATGCGGGGATTTGGTAATATGTGCATTTGGAGTATATCATTTCAGTGGCAGAGGCAGTAAAAAGCTTAAATTCACACCCATGTGCCTGTATGCACATATACAATACA
GACATGTAACGGGGATGGTAATTTCAATGCTGGTGGCTTTAAATGTGGCAAAAGTAGGGAGACAGTGGCACACAGCATGGGCAGCTGCTGAACATACCGGAAAAGCAGATGCTTATTGAAC
CACCAAAAATTAGAAGTGCACCATGTGCCCTATATTGGTATAGAACAGCAATGGGAAATGGCAGCGAAGTGTATGGGGAAACCCAGAAATGGATAGTAAGACAACAGTGTGGGGCATGCAATG
CAAGAAAACAGTTTAGCCCTTCCACATAGTACAATGGGCATATGACAAATGATATAACAGATGAGAGCGAGCTAGCATACGAATATGCATTTGCTAGGAAATGAAGACCAAAACCGCAGCAGCAT
TTTAGCAAGCAACTGGCCAGGCAAGTATATTAAGGATGCAATTAATGTAGTGGCAAGTATAGCATGTGACACAGTGGCAGCAGCAGCATATGACACAGTAAAGGGGCGCAAGGTTG
CAGATACAGGTGACTGGAGACCAATAGTAAAATATTAGATATCAAAGGGTAGAATTTGTACCCTTCATGGTGCATTAAGGCAATTTTAAAGGGATACCCAAAAGAGCTGTATGGTATTTT
TATGGACCAAGTGCACCGGGAAGTCATATTTTGCATGAGTTTACTAACTACTAGGGGGCGAGTAATTTCTTATGTAACCGCAGGAAGCCATTTTGGTTATCGCCACTGGTAGACGCAAA
AGTGGGATTTGTAGACATGCAACATATCCGTGCTGGCAATATATTGATACATACCTAAGAACAATGCTGGACGAAATGCATAAGCATAGACAGAAAACATAGGAACCTGACACAGCTGAAGT
GTCCACCGTAAATGATAACAACAAATATAAATCCATAGATGATCCGTCTTAAAATACCTGCACAGCAGAAATGGTGGTGTAGGTTTATGAATAAGTGCACATTAAGAGCACAGCGGATCCG
GTGATTTCCCTAAATACGAAAATTTGGAATCATTTTCCAAAGGCTTTGGCCAGTATAGAGGGACAGCAGAACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGGAACTACTAGCCAGCCGTT
TAGATGCGTGGCAGGAAATTTGCTAGACCTTTATGAAAAAGATAGCGACAGCTCATGACCAAAATTTGCAATTTGGCACTATGTGCGCTGGAACTGCAATTTATATAAGGCACGTCAAGCA
GGACTACTCATGTAGGCGCAGCGGTTGTTACCAACACTTAGTGTACAAAAGGGCAAGCAGCTAGGCAATTTGAAGTGCACCTGGCAGCTGCAAAAACAGTGAATTTTCGATGAAC
ATGGACATTACAGACCACTCAGTGAATGTGGAAATGCGCAACCCAGGACGGTGTGGAAAGAAAAGGACCCACAATAACACTTAAATTTGATGTGAGGACCTAAAAGCAGTGGGATGTAA
GCTGGGGTGGATTTATGTGCAAGCAGAGGATGAACAGTGTATAAGGTGCAAGGACAAGTGCATATGACGGCTATATTAATGAATTTGAAGGGCACAACAGATTTATGTGACATTTGCA
CAGGAAGCCCTAAAATATGGGACACAAAACAAATGGGAGGTTGGTGGGGAAGCAGAGTAAATTAAGCAACTGGCCCTCTGTATCTAGCACCCAGGACCGTGCCAGAAATACCCCTGTGCTG
AATGCTGGGGGACTGCCAGACCCACCAAAACCCACCGCTCCACACAGTGTCTGGGGCCCGCCAGGACTCCTCTCAGTGCAGGGCGCGCTGTGAAGCGCATAGAACGCTTCCACAGCAGCT
TGCAGCAGCAGCCGACACCAGCAACAGGACCCCTTCGGACAACGTACTGTGCTATCCAGTGGGTCAACAGTAACTGTAAACGCGCGCAGCACCAGGGGACAACAGTAACCGTTACAGTGCA
CCCTGAATACATTTGAAGGTGATGCCAATAAATAAAGTGCCTTAGGTATAGACTTCGCAACTCAGTGCCTAATCTGTTTGAAGCAACTCCACATGCCATTTGGCCCTGTGGGGTAAATC
ACAAAATGTGCATTTGTAAACAATATGGTATAGTTGATACAGACCAAGCTAAGCAATTTCTAGATCTGTAAACCAATTCAAAAGGTATACAAAGCTGTGGGGCTATAGCAATGTTATGTAAA
CCATAGCTAATGTGTAATAGTGAACATGCCTGTACAGTGAACACTTTGAGCCAACTATTGACGCTACACCCATACCTGCAATATGGTGAAGCAATAACCAATCCCTGGATCTCTGTGTG
TTGATATGTGGTGGTGAATGTGCTTGTACTGCTTATTTTTCGGCTTCCCTATCTTCCTCACTGCTGCTTTTTGGTGTTTTTTGTGTAATATATCTAGGATTTGTGGCATATATTT
TGCAGGATTTGGGTACATAGAGTAACAGTAGTACAACAGCCATATACATGCTGCTATAGTGTAAATAGTGTTCCTGTGATCTTTGTGTGCGCTATGTATCCCTGTAGGCAATGAGTATCCA
TTAAGTGTAGTAGACTGATAAATGGTATTTGTTTTGTTTTGGTGTATAAATTTGTTCAGTGTGTTATACAGGTTGCTACAATAACCCACCCATTTGTGCATTCCTACCCCAATTA
CTACAGTGCACAAATTTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
CTGCAAAACAGCAGGTACTTCCCCCCAGATGCTATTCCTAAGGTGGAGGTGACACATTTGCTGATAGATTTTTGAAAGTGGCCAGTTTTAGGAGTCTTTTTTTGGTGGATTGGGAATAGGCACAG
GCTCTGGCACTGGGGTGCAGGAGATGTTGCTATAGGTACCAGCCCTCCACTGTTGGATATAGGCCCCACTACACGCCACCTGTTGTATTTAGGCCCTGGGGGCTGGCGACCCCTTC
ATAGTTACCCCTGTGGAGGAATCCAGTGTGGAGTCCGGTGTACTATTCCCAATTTTACTGGATCTGATGGATTTGAAATTTACCACATCCCTACTACCACCCCTGCAGTTTGTAGACATTC
ACCAGTGGTACTTCTGTGCAATTTAGTGTAGTACTTACTAATCCCTTATTTACTGCACTTCTATTTGAAACCTCCACAGCCCGGGGACCTTTCCAGCCCATGATTTACCAGCAACCCA
CATCTGGGTCTCAGCTTTGAGGAAATACCTATGCAACAGTTTGCACAGCAGTGGTGGTACTGGCACTGGCAACCCATAGCAGTACCCCATGCTGTTGTGCTGGCTGCCTGCACAGCCCGCCTA
CGATTTGATAGCAAGCTAATCAGCAGTTAAGGTGTGACCCCTGCATTTTGTCCCGCCGCTCCCTTATTACTTATGACAACTCTGTGTATGATGCAGGAAACCAATATCTTTAGGCA
TCCTAGTATATATACCCCCAGATCCCTGACTTTTGGATATATTTTACATAGGCTCCCTTACAGCCCGCCAGGTAACGTTACGGTTAGCAGGTTAGGGTACCGTGCACCTTTGGCGTA
CTCGTAGTGGCAACCGCATTTGTGCTCGATACACTTTTATCAGGACATAGTCCCATTCCTCTGCACAAATGAAATGCATCCATAAACCCCTTGGCGAGCCAAACATAACATATGACATT
TATGCTGACCCCGATACATGGGACCCCGCGCGCACCTTCCCTGCTCCATCATTTGCAAGTCCCTCCATATCTGCGGCTCTCTGTGTTTTGCGCAAGTATGACAATGTTACTGTTCCGTT
GTCCACAGGGCTAACATTCCTGCATCATCGGCCCTGACATAGATTTGCTTGTGACCCGCTCCTGTACCCACAGTTCCTCATGTACCATCTACACATCCCTCATCTGTTTATGTGGACGGCT
CTGACTTTTATTTGTTGCTGCATACATATTTTTTCCATAAAAACGTTAAAGCTGACCCCTTCTTTTGCAGATGGCTTTGTGGCGGCTGGTACGGGCAAGGTATACCTGCCTCCCACTCCTGT
TTCTAAGGTTATCAGTACTGATCGCTATGTCCCAAGCACAACCTCTTATTTATTTAGTGGGACTTCCCGCTACTAAGTGTAGGACACCCCTTACTATAACATACCTGTCAACGGGCGAGGTAATAA
AAACCGCGTTCCTAAGGTTTCAGGTTTCAGTACAGGGTTTTAGAGTAAAGCTTCTGTATCCCAATAAATTTGCATTTACTGATGGCCTTTATACAATCCAGATACGGAACGAATGGTATGG
CCCTGTCCGGCGTTGAGGTTGGTAGGGGTACAGCCACTTTGGTGTGGCAGCAGTGGTCCACCCCTGTATAATCGCTGGATGACACTGAAAACACATCTTTACTTTGTGGCTGCATAACTGACAG
CCGGCAAGTGTTCGTTGACTACAAGACACAGTGTCTTATGTAGGGGTGATGGCTCCCATTTGAGGCAATTTGGGCTAAGGGCACTGGCTTACCCCTGCTCCTCCAGCAGGCTG
GCCCCCTTTGGAATTTAAGAATTTCAACCATAGAGGATGGTACATGGTGAACAGGCTATGGGCTATGGATTTTGTGCACTGCAGGAAAATAGATCTGAGGTGCCCTTTGGATATTTGTACT
ACTACTGCAAAATATCCTGATTTTGCAAATGGCTGCTGAACCATACGGTATTTGTATGTTTTTGTGTTGCGCAGAGAACAATGTTTGCACGCCACTTTTTTAATAGGCAGGGCACCATGGG
CGAGGAACCTACCAACCAATTTATATCTTCAAGGTGCCCTGATAGCGACAGCGTACACCTGGTAGTATATTTATCTCCACTCCAGTGGCTCTAGGTGCCCTGATTTCCCAATGTTTTA
ATAAGCCCTATTGGCTGCAGCGGCCCATGATAAGAATGGCATTTGTTGGTTAATAGCTTTTTGTAACCTGTGTAGATACCACTCGGAGTACTAATGTAACATCTGTACTGCCAGAGTCC
TCTGTAAGTGAATAAAGTCTTCCAAGTTTCGTAATATCTTCGCCACCCAGGAAATTTGATTTGCAGTTTATATTTCAACTTTGTAATAATTCATCTAATCTGAAATCATGGCTACTTGC
CAATATGAATAAAGCCCTTATAGATGACTGGAATTTCCGTGTGGTGCCTCCTCCCTACACAGTTTAGAGGATACCTATAGGTTTTTGCAGTCCCGTGCATTACCTGTCAAAAAGGGGGCTGCCA
CCCTCCGGCTAAGGAAGATCCATATGCTAACCCTATCCCTTTGGAAGTGGGATCTTAAAGGACAAGTTTTCAACTGACTGGATCAGTTTCCCTTAGGGCCAAAATTTTTATGCAAAACAGTGGCT
AGGTCTGTTTCAGTGTACGCAAAACGTTGCTGCCCTGTCTGGCTCTACTCAGCCCCACCCCTACAAAACGTAAGGAGGCAAAAAGTAACTGTACTAGTAAATGTGTGGTGTATGTGTACAAT
GCATGCATGTGTATGTTTTCTGCTGTGTTTTAAATGTATATGTTTGCATGTCCTTTGATGGCCCGCTGCCCTATGTTGTATATATGGAATGTAGTGTAAATGTTTTGTGCATTAAT
AAAGTGTGTGTGATGTGTATGTGTGCGGTGCACCCCTGTGAGTAAGTGTGTGTTTTGTTGTGTCTGCAACATTTGACCACTTCCCTGTGGTTTTGTGTACCTTTGTCTAATTTTACATTTCC
TCCATCTGTGTTCCGACCGTTTTGGTATCCCGCTTTTGAATTTCTCCATTTTGTGTTCCGACCTTTTCCGTTCCCGCTTTTCCGTTCCGTCGGCTCCGCTGCACATTTTCATACAACATA
TGAGTTTTTATCCCAACCTCTGTTTTAAACAACCTTTGATTTCCACACCTGGGTGCTGCGCAGAGTTCTGGACATGCATATGCAAAAACATGCTTTTAGGCACATGATTTTGTGCTGAC
TACTTTCTCTAATTTGCTAGTTTGGCTACCGTACTAGGTGTTGTGGCCAAAGTGTCTCCTGCAACTATAGGCAATGCCCCTTACAACAAGTAAAACATTTCTAATCCGGTCCGCTCCCATGTG
TCATCTTTTTTATAAT

```

3) Descripción de las regiones del genoma vírico

Se ha estudiado la secuencia del genoma completo de la variante A0383 con el fin de

caracterizar sus ORFs. Para ello se ha estudiado como referencia la secuencia del genoma del VPH72 y la posición de los ORFs en la misma. Cada ORF está delimitado por un codón de inicio de traducción (ATG) y un codón de finalización de la traducción (TAA, TAG y TGA).

ORF	VPH72		A0383	
	Posición	Tamaño (pb)	Posición	Tamaño (pb)
E6	102-548	446	102-548	446
E7	524-826	302	524-823	299
E1A	832-2142	1310	829-2139	1310
E1B	2142-2783	641	2140-2787	647
E2	2719-3873	1154	2749-3885	1136
E4	3311-3631	320	3314-3632	318
L2	4409-5809	1400	4445-5846	1401
L1	5703-7307	1604	5740-7341	1601

Tabla 30. Tamaño y posición de los ORFs del VPH72 y la variante A0383.

4) Análisis de similitud con otros tipos víricos

Se comprobó que el producto de amplificación MY11-MY09 del VPH A0383 tiene una longitud de 455 pb, de los cuáles 20 nt corresponden a la secuencia complementaria a MY11, 20 nt a la secuencia complementaria a MY09, y 415 nt a la secuencia comprendida entre ambos. En un primer análisis de la secuencia de este fragmento MY11-MY09 mediante el algoritmo BLAST, se observó que el aislado A0383 presentaba máxima similitud con los tipos VPH72 (89%), VPH61 (81%) y VPH62 (79%).

El análisis mediante BLAST de la secuencia completa del ORF L1 mostró la máxima similitud con el tipo VPH72 (89 %).

TIPO	GRUPO	SIMILITUD (%)							
		GENOMA	L1	E6	E7	E1	E2	E4	L2
VPH72	A3	88	89	84	88	89	88	87	86
VPH61	A3	81	81	83	84	82	82	80	75
VPH62	A3	77*	79*	70	76	77	75	76*	75
VPH102	A3	76	76	67	-	75	77	76	84
VPH83	A3	73	76	71	-	73	74	74	71
VPH114	A3	75	75	-	69	75	73	71	80
VPH84	A3	88	77	69	-	75	73	69	86

Tabla 31. Similitud de la variante A0383 con los papilomavirus más próximos. Los asteriscos indican que el porcentaje de similitud se ha producido con secuencias parciales de esos ORFs (aproximadamente el 80% del gen).

5) Estudio filogenético de la variante A0383

Con el objetivo de confirmar la adscripción de la variante A0383 al grupo A3, se realizó un estudio filogenético mediante comparación de la secuencia del ORF L1 de dicho aislado con la del resto de los tipos de VPHs mucosotrópicos. Para ello, se realizó un alineamiento mediante el algoritmo *ClustalX* (Thompson *et al.*, 1994) y posteriormente se creó un árbol filogenético usando el programa *TreeView* (University of Glasgow). El alineamiento se construye en 3 fases: primero compara las secuencias por pares, después calcula las matrices de distancia y crea grupos de secuencias y finalmente crea un árbol guía (dendograma). El árbol creado con el método *Neighbour Joining* se muestra en la figura 52. Como puede observarse, el aislado A0383 queda incluido dentro del grupo Alpha-3 junto a los tipos 61, 72, 62, 81, 83, 102, etc. (de Villiers *et. al.*, 2004), formado por VPHs de bajo riesgo.

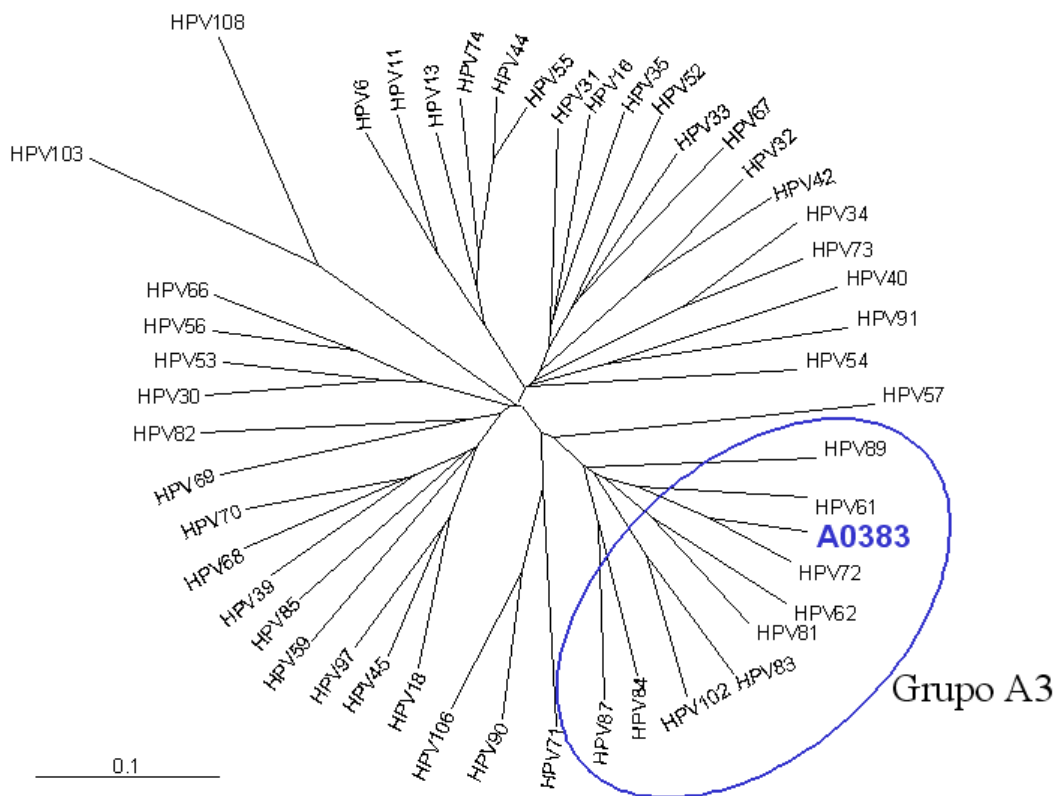


Figura 52. Árbol filogenético de la variante A0383 junto a 48 papilomavirus mucosotrópicos ya caracterizados obtenido gracias al programa *TreeView*.

3.2 Identificación de un nuevo papilomavirus (variante E1201)

3.2.1 Caso clínico

Se realizó una toma cervical a una paciente de 47 años para un estudio citológico rutinario en el año 2007. El análisis de las células cervicales mediante la tinción de Papanicolau mostró una lesión intraepitelial cervical de bajo grado (LSIL). En los estudios citológicos posteriores la lesión remitió espontáneamente y el tejido normalizó. Las tomas cervicales se realizaron en el Hospital Virgen de la Luz de Cuenca. En el laboratorio la muestra fue identificada como E1201.

3.2.2 Análisis de la muestra con referencia E1201 con el método descrito

De igual manera que en la muestra con referencia A0383, el método de identificación de papilomavirus generó un patrón de restricción que sugería que la muestra E1201 podría ser portadora de una variante atípica. La secuenciación del fragmento MY11-MY09 y su análisis mediante el algoritmo BLAST mostró que el aislado E1201 presentaba máxima similitud al VPH86, con una identidad de secuencia del 89%.

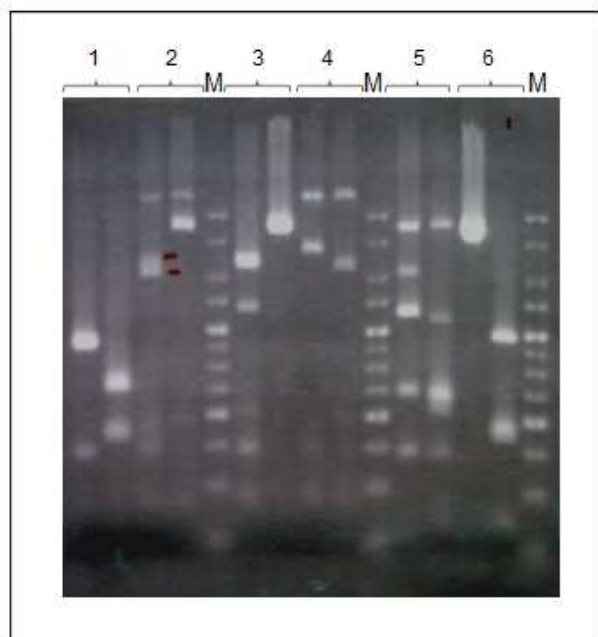


Figura 53. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el fragmento de ADN amplificado con la pareja de oligonucleótidos MY11/MY09. **Muestra 1:** Control positivo. **Muestra 2:** muestra de referencia E1190 (portadora de los VPH 16 + 45). **Carril M:** marcador de peso molecular: *HipperLadder V* de *Bioline* (500, 400, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 y 25 pb). **Muestra 3:** muestra con referencia E1194 (portadora de los VPH 33+45). **Muestra 4:** muestra de la variante *E1201*. **Muestra 5:** muestra con referencia E1203 (portadora de los VPH 16+53+70). **Muestra 6:** muestra con referencia E1204 (portadora del VPH 66). Gel de agarosa al 3%.

3.2.3 Estudio de la variante E1201 mediante secuenciación

1) Obtención de fragmentos solapados del genoma de E1201 mediante PCR

Se han realizado amplificaciones por PCR que han permitido obtener fragmentos solapados del genoma vírico que han sido secuenciados individualmente. Para la amplificación de regiones de la variante E1201, se han diseñado oligonucleótidos iniciadores homólogos a la secuencia MY11-MY09 del nuevo aislado (obtenida previamente) y a la secuencia del VPH86, por ser en principio el tipo filogenéticamente más cercano. Mediante la composición de sus secuencias se ha podido recomponer la secuencia completa del genoma de la variante A0383.

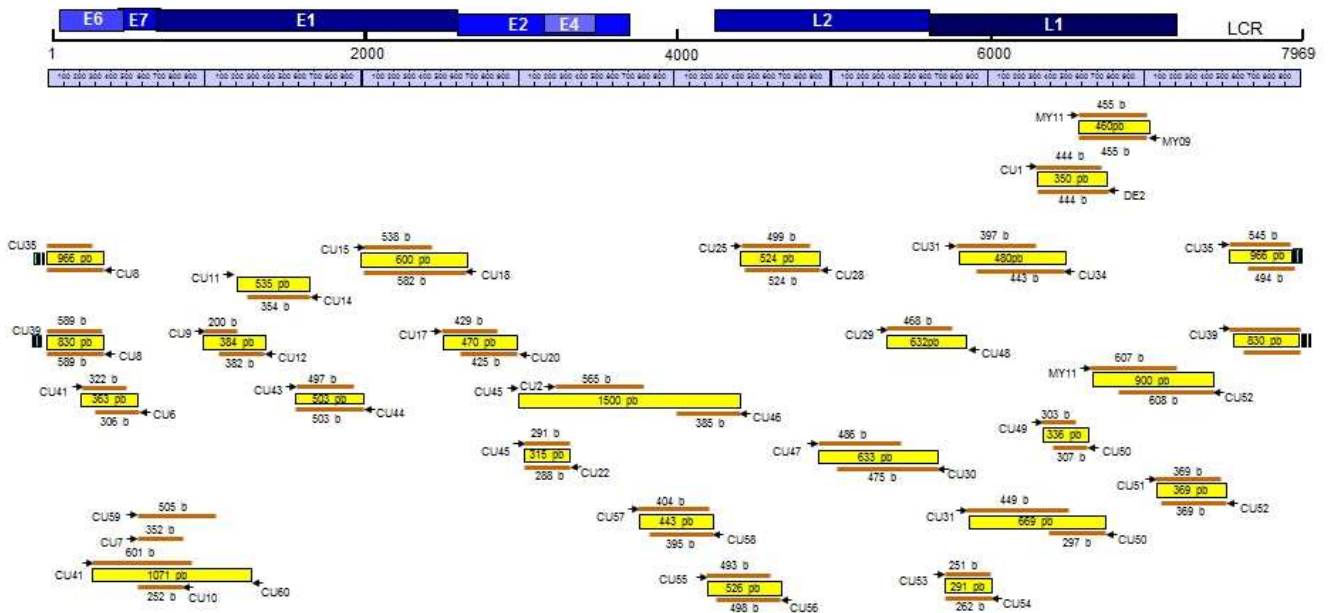


Figura 54. Esquema de la amplificación y secuenciación del genoma completo de la nueva variante E1201. El esquema muestra la posición aproximada de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación o secuenciación (flechas), los fragmentos amplificados (barras amarillas) y las secuencias parciales obtenidas a partir de estos (líneas rojas) a partir de los fragmentos amplificados. La secuencia completa del genoma vírico se pudo construir mediante la composición de las secuencias parciales. En la parte superior, mediante barras azules, están representados los 7 ORFs que componen el genoma vírico así como las regiones reguladoras.

3) Descripción de las regiones del genoma vírico

Se ha estudiado la secuencia del genoma completo de la variante E1201 con el fin de caracterizar sus ORFs. Para ello se ha estudiado como referencia la secuencia del genoma del VPH86 y la posición de los ORFs en la misma. Cada ORF está delimitado por un codón de inicio de traducción (ATG) y un codón de finalización de la traducción (TAA, TAG y TGA).

ORF	VPH86		E1201	
	Posición	Tamaño (pb)	Posición	Tamaño (pb)
E6	1-447	447	1-444	444
E7	423-707	284	420-711	290
E1	709-2667	1958	713-2674	1961
E2	2609-3733	1124	2616-3737	1121
E4	3174-3500	326	3181-3505	323
L2	4241-5677	1436	4245-5669	1424
L1	5655-7172	1517	5646-7174	1529

Tabla 32. Tamaño y posición de los ORFs del VPH86 y la variante E1201.

4) Análisis de similitud con otros tipos víricos

Con el fin de conocer la relación entre el aislado E1201 con diferentes Papilomavirus, se comparó la secuencia nucleotídica con las de los VPHs más próximos (tabla 33). La comparación mostró una homología superior al 82% con los VPH86, VPH87, VPH114 pertenecientes al grupo 3 de los *Alphapapilomavirus*.

TIPO	GRUPO	SIMILITUD (%)							
		GENOMA	L1	E6	E7	E1	E2	E4	L2
VPH86	A3	94	92	94	97	95	94	92	94
VPH87	A3	87	84	82	93	88	86*	84	84
VPH114	A3	82	80	78	86	85	80*	74	98*
VPH84	A3	82	80	78	86	84	82*	80	98*

Tabla 33. Similitud (%) de la variante E1201 con los virus del papiloma más próximos. Los asteriscos indican que el porcentaje de similitud dado no se ha producido con el total de la longitud de la secuencia problema, en este caso con aproximadamente el 80% del gen.

5) Estudio filogenético de la variante E1201

Con el objetivo de confirmar la adscripción de la variante E1201 al grupo A3, se realizó un estudio filogenético mediante comparación de la secuencia del ORF L1 de dicho aislado con la del resto de los tipos de VPHs mucosotrópicos. Mediante el mismo análisis que el realizado anteriormente para la variante A0383, se observó que el aislado E1201 queda incluido dentro del grupo Alpha-3 junto a los tipos 61, 72, 86, 71, 87, etc. (de Villiers et. al., 2004), formado por VPHs de bajo riesgo.

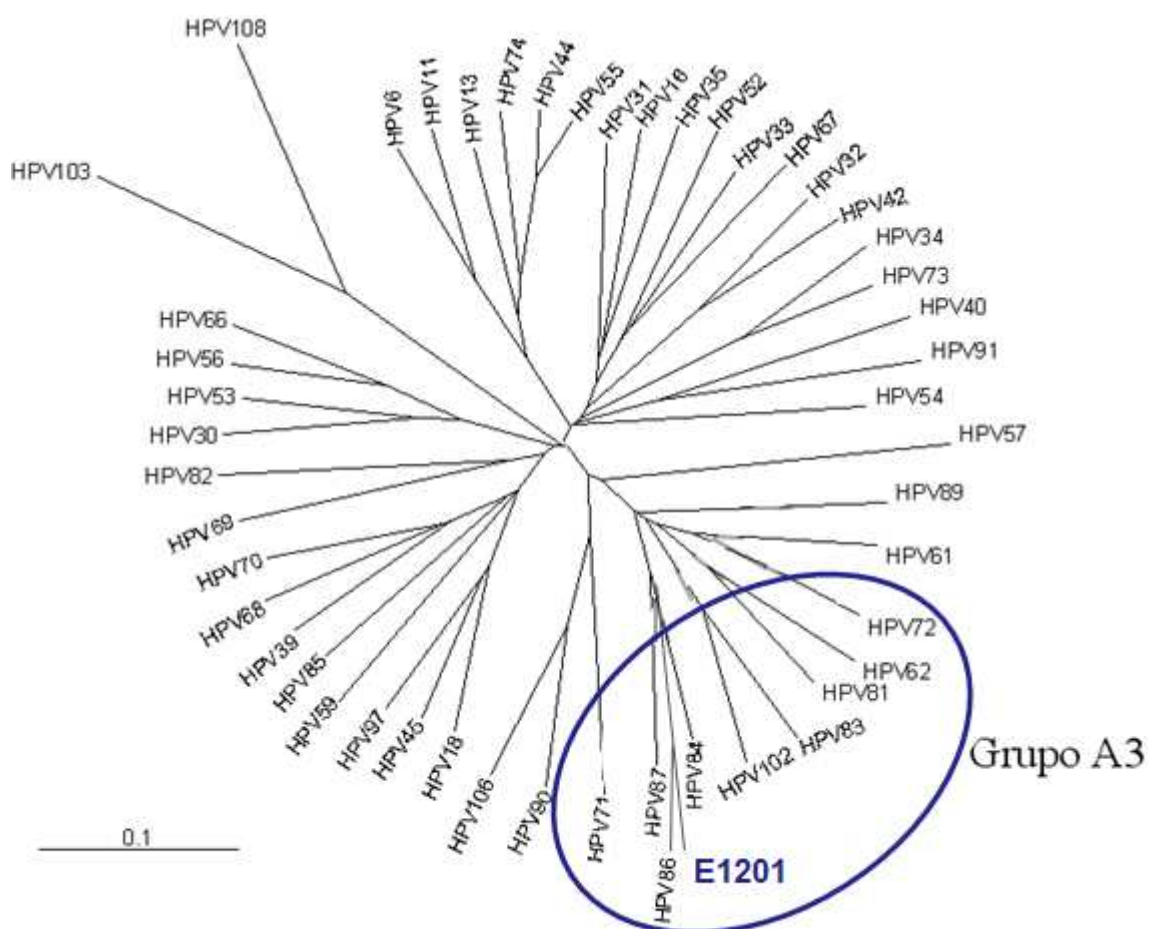


Figura 55. Árbol filogenético de la variante E1201 junto a 49 papilomavirus mucosotrópicos ya caracterizados obtenido gracias al programa TreeView. Como puede observarse el aislado E1201 queda dentro del grupo 3 del género Alpha-Papilomavirus junto a los tipos 86, 84, 87, 102... (de Villiers et. al., 2004). La clasificación en este grupo sugiere que se trata de un subtipo de bajo potencial oncogénico (Masanori et al., 2001). Los datos obtenidos coinciden con los datos clínicos conocidos, ya que se comprobó en estudios posteriores que el tejido cervical de la paciente se normalizó y el virus se eliminó del tejido espontáneamente.

Discusión

1 Desarrollo de un nuevo sistema de detección e identificación papilomavirus

1.1 Motivación para el desarrollo de un método de identificación de papilomavirus

El cáncer de cuello de útero es una enfermedad que afecta a millones de mujeres en todo el mundo y provoca miles de muertes al año. La enfermedad cursa subclínicamente, sin sintomatología aparente, pero es de fácil tratamiento si es diagnosticada a tiempo. Cuando aparecen las primeras manifestaciones clínicas, normalmente una metrorragia post-coital, las lesiones ya se encuentran en un estado muy avanzado, los tratamientos deben ser bastante más agresivos y el índice de supervivencia a 5 años es considerablemente menor respecto a las lesiones detectadas precozmente. La progresión de las lesiones, desde las formas benignas al carcinoma invasor puede producirse en un período de tiempo variable, desde unos pocos meses a algunos años.

Actualmente, la detección precoz del cáncer de cuello de útero se realiza mediante el estudio de citologías genitales exfoliativas por tinción de Papanicolau. La naturaleza de la progresión de las lesiones hace aconsejable la realización de revisiones rutinarias en la población femenina general. El diagnóstico citológico ha conseguido reducir drásticamente el número de muertes por cáncer cervical, especialmente en los países desarrollados.

Pese a su indudable utilidad, y a que es una de las técnicas diagnósticas que más vidas ha salvado en la historia de la humanidad, el test de Papanicolau presenta algunas limitaciones. No permite distinguir el potencial evolutivo de las lesiones de bajo grado o dudosas, ya que tanto las que remiten espontáneamente como las que pueden evolucionar a carcinoma invasor presentan morfologías celulares similares en sus etapas iniciales. Asimismo, algunas preparaciones celulares pueden ser mal interpretadas debido a procesos inflamatorios de diversa naturaleza, al sistema de preparación del frotis, o a la subjetividad propia del médico anatomopatólogo que realiza el diagnóstico.

El método de Papanicolau tiene una alta especificidad (relación entre el resultado y la patología). Sin embargo presenta una baja sensibilidad ya que no permite detectar las portadoras asintomáticas. En el curso natural de la infección, el contacto con el virus precede al desarrollo de la lesión. Existe un período ventana en el cuál la lesión es asintomática, pero el virus está presente en la mucosa genital. La detección de VPH permite prevenir la lesión antes de que aparezca, especialmente en los casos de contactos sexuales dudosos o cuando ya se han detectado lesiones en el compañero sexual.

La relación entre la infección por papilomavirus y el cáncer ha sido demostrada en numerosos estudios durante las dos últimas décadas. Los datos acumulados indican que la asociación es de tipo causal y que los papilomavirus son los únicos agentes etiológicos

necesarios para el desarrollo de las lesiones, al margen de otros cofactores de cada individuo que también pueden ser determinantes.

Entre los factores víricos que inciden en el desarrollo de la neoplasia, el tipo vírico es el más importante. El principal factor de riesgo para el desarrollo de las neoplasias cervicales es la infección por papilomavirus de alto riesgo. La mayoría de las lesiones debidas a papilomavirus de bajo riesgo remiten espontáneamente, mientras que prácticamente todas las lesiones de alto grado están asociadas a papilomavirus de alto riesgo. De esta forma, la detección de papilomavirus de alto potencial oncogénico permite considerar que una lesión precursora puede evolucionar rápidamente hacia un carcinoma invasor de cérvix. Asimismo, dentro de los papilomavirus de alto riesgo, cada tipo vírico tiene un riesgo relativo específico. Algunos tipos presentan un riesgo relativo casi 10 veces superior a otros. De esta forma, la identificación precisa del papilomavirus causante de la infección es un dato importante para estimar el potencial evolutivo de las lesiones. La identificación del tipo vírico aporta mayor información que la discriminación genérica entre papilomavirus de alto y bajo riesgo.

Otro aspecto que hace conveniente la identificación de los papilomavirus es la utilización de las vacunas profilácticas actualmente disponibles: *Gardasil*[®] (Merck Sharp & Dohme Corp. [®]) y *Cervarix*[®] (Glaxo Smith Kline [®]). Estas dos vacunas son específicas de los tipos de alto riesgo 16 y 18, y en el caso de Gardasil además protege contra los tipos de bajo riesgo 6 y 11, asociados a condilomas. Adicionalmente, ambas presentan una protección parcial frente a otros papilomavirus filogenéticamente emparentados a los anteriores. El hecho de que estas vacunas confieran protección sólo frente a determinados tipos, hace indispensable disponer de sistemas de identificación de papilomavirus. Esto es indispensable en las lesiones presentes en mujeres vacunadas con objeto de estimar la eficacia de la vacunación, así como en los casos en los que el compañero sexual presenta una lesión y es necesario conocer el grado de protección.

Por estos motivos, la detección e identificación de los papilomavirus es una importante herramienta para diagnosticar precozmente y determinar el potencial evolutivo de las lesiones cervicales. En este trabajo, se presenta un método para la detección y la identificación de los papilomavirus mucosotrópicos, que puede ser usado en la práctica clínica, ya que cumple los requisitos necesarios para su uso en el laboratorio de rutina.

1.2 Utilización de una PCR consenso para la detección de papilomavirus

La estrategia más utilizada para la detección e identificación de papilomavirus mediante PCR se basa en la amplificación de regiones más o menos conservadas del genoma vírico. Muchos autores se han basado en las similitudes de secuencia de los ORFs L1, E6, E7 y E1 de los diferentes papilomavirus (Manos *et al*, 1989; Gregoire *et al*, 1989; Fujinaga *et al*, 1991;

Snijders *et al*, 1991; Evander *et al*, 1992; Contorni y Leoncini, 1993; Pizzighella *et al*, 1993; Shamanin *et al*, 1994; Zheng *et al*, 1995).

En el presente trabajo, se realizó un alineamiento de las secuencias de los genomas completos de los tipos de VPHs mucosotrópicos representativos de las especies más frecuentes. Se determinó que el ORF L1 es la región más conservada del genoma por lo que se consideró que es una región óptima para el desarrollo de un método de detección genérico. Dentro del ORF L1, se observó que existían varias regiones adecuadas para el diseño de oligonucleótidos genéricos, y entre ellas las secuencias homólogas a los oligonucleótidos MY11 y MY09 (Manos *et al*, 1989) por lo que se consideró que éstas podían ser utilizados para la detección del conjunto de los papilomavirus mucosotrópicos. No obstante, éstos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias de los VPHs 6, 11, 16, 18 y 33 (únicos tipos totalmente caracterizados de los 20 Papilomavirus genitales descritos hasta ese momento).

En el presente trabajo se estudió la validez teórica como iniciadores de la PCR para la amplificación del conjunto de VPHs mucotrópicos, incluyendo las especies descritas más recientemente. Para ello se analizó la homología de las secuencias diana de MY11 y MY09 con el fin de comprobar su validez para una detección de amplio espectro, de acuerdo con la aproximación teórica sugerida por Zheng *et al*, 1995 (85 % de similitud entre el oligonucleótido y su diana). Se estimó que estos oligonucleótidos permiten detectar todas las especies de papilomavirus mucosotrópicos, a excepción de Alpha-14, Gamma-6 y Gamma-8, si bien los resultados prácticos demuestran que el tipo 71 (Alpha-14) ha sido detectado en 15 muestras lo que indica que estos cebadores son adecuados para la detección al menos de este genotipo.

Algunos autores cuestionan la utilización de los oligonucleótidos MY11 y MY09. Bernard *et al* (1994) en base a un estudio teórico, indica que estos oligonucleótidos no resultan adecuados para la amplificación de los tipos mucosotrópicos 30 y 43, así como los cutáneos 2, 3, 7, 10, 27, 28 y 29. Por otro lado, de acuerdo con el criterio anteriormente expuesto (85 % de similitud entre el oligonucleótido y su diana) no deberían detectarse los tipos 30, 34, 42, 43, 51, 54, 56 y 74. No obstante, los tipos 42 y 54 sí se han detectado en muestras clínicas en el presente trabajo, lo que pone de manifiesto la arbitrariedad del criterio anterior. Todas las posibles excepciones se deben a la incapacidad del oligonucleótido MY09 de hibridar con algunos tipos víricos.

En el transcurso de este trabajo, se diseñaron otros oligonucleótidos genéricos a partir de secuencias parcialmente conservadas del ORF L1, combinándolos en ocasiones con MY11 y MY09. Éstos ensayos ofrecieron resultados irregulares al ser usados como iniciadores de la PCR por lo que se descartó su utilización en un método de detección (resultados no presentados). De forma global, la pareja de oligonucleótidos MY11-MY09 ofrecieron el mejor

resultado aún a costa de renunciar a la detección de algunos tipos víricos, si bien pertenecientes a las especies Alpha-14, Gamma-6 y Gamma-8, de menor relevancia clínica, al tratarse de virus de bajo riesgo, y epidemiológica.

1.3 Genotipado mediante el análisis de fragmentos de restricción (RFLPs)

Uno de los objetivos planteados fue el desarrollo de un sistema de tipado de amplio espectro, inequívoco, robusto y de fácil implementación en el laboratorio clínico. Aunque el método de referencia para el genotipado vírico es la secuenciación del ADN, esta técnica no es de aplicación en el laboratorio de rutina, debido al alto coste y al requerimiento de manipulación. Como método de tipado alternativo a la secuenciación se optó por el análisis de *Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción* (RFLPs de *Restriction Fragment Length Polymorphism*). A continuación se indican las principales ventajas e inconvenientes del uso de este método:

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Manipulación inferior a la secuenciación	Manipulación superior a la de otros métodos modernos (p.e. PCR a tiempo real)
Especificidad comparable a la secuenciación	Menor sensibilidad debida al uso del gel de agarosa
Robustez (debido a la alta especificidad de las endonucleasas por sus sitios de restricción)	Polimorfismos en las dianas de restricción
Costes	Requiere personal cualificado (dificultad para la interpretación los patrones de restricción)
Fácil implementación en sistemas sanitarios de países en vías de desarrollo	Aceptación decreciente en los laboratorios modernos

Tabla 34. Ventajas e inconvenientes de la utilización del análisis de los fragmentos de restricción como método de identificación de papilomavirus.

En el presente trabajo se realizó un meticuloso estudio teórico de enzimas de restricción y de los tampones de digestión en los cuáles tenían máximo rendimiento. Para elegir las enzimas incluidas en el estudio teórico previo, se establecieron una serie de consideraciones:

1) Compatibilidad entre los tampones de restricción y el tampón de PCR

Esta condición se impuso con el objetivo de que las enzimas finalmente seleccionados fueran activos en el tampón de PCR, de manera que las digestiones pudieran realizarse directamente en la mezcla de la reacción de amplificación, simplificando todo el proceso.

Los tampones de restricción disponen normalmente de 4 componentes: un agente tamponante (Tris-HCl o Tris-acetato), un agente salino (NaCl, KCl, CH₃COOK), un cofactor para la enzima (MgCl₂) y algún estabilizante de la enzima (BSA, DTT, β-mercaptoetanol, gelatina, detergentes, etc). El tampón de PCR consta de los mismos componentes que los tampones de restricción, si bien las condiciones óptimas para la actividad de la Taq polimerasa determinan que el pH y la fuerza iónica deban mantenerse dentro de unos márgenes muy estrechos.

Con la intención de conseguir la máxima compatibilidad entre los tampones de PCR y la digestión con enzimas de restricción, se consideró adecuado utilizar la Taq polimerasa comercializada por *Roche Applied Science* (referencias indicadas en el apartado de materiales y métodos) y su tampón de reacción correspondiente (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,005% Brij-35TM y pH 8,3). Este tampón es de baja fuerza iónica, y su pH medio-alto es adecuado para muchas enzimas de restricción.

Una vez seleccionados la Taq polimerasa y el tampón correspondiente, se valoraron las enzimas de restricción cuyos tampones de digestión óptimos tenían una composición similar al primero. También se incluyeron aquellas enzimas que no requieren condiciones demasiado estrictas, a pesar de que sus tampones óptimos respectivos no tenían composiciones similares al tampón de PCR mencionado anteriormente. En la tabla 34 se muestran las enzimas de restricción seleccionados en aplicación de este criterio.

2) Temperatura óptima de digestión

La mayoría de las enzimas de restricción presentan su actividad máxima a 37 °C. Sin embargo, ciertas enzimas tienen diferentes temperaturas óptimas (25-65 °C). En el caso de las digestiones múltiples, las enzimas que intervienen deben tener la misma temperatura óptima. Con el fin evitar incompatibilidades por esta causa, se descartaron las enzimas con temperaturas óptimas diferentes a 37 °C: *Apa* I, *Bcl* I, *Bsi* YI, *Bsm* I, *Bst* XI, *Sfi* I y *Tru* 9I.

3) Pérdida de especificidad de las endonucleasas en condiciones "no óptimas"

Determinadas endonucleasas pierden o "relajan" su especificidad en el reconocimiento de su diana cuando la reacción no se realiza en las condiciones óptimas. Esta característica también se conoce como "actividad *Star*". Se da especialmente en condiciones de baja fuerza iónica (<25mM), pH alto (>pH 8), cantidad de enzima excesiva (>100 unidades/μg ADN), excesiva cantidad de glicerol (>5% glicerol), presencia de disolventes orgánicos (DMSO, etanol, etc) o sustitución del catión Mg²⁺ por otro catión divalente (Mn²⁺, Cu²⁺, etc.). Se descartaron para

este estudio las enzimas que pueden presentar esta característica: *EcoRV*, *HindIII*, *HinfI*, *PvuII* y *XmnI*.

<i>AflII</i>	<i>AluI</i>	<i>Alw26I</i>	<i>ApaI</i>	<i>Alw44I</i>	<i>AvaII</i>	<i>AvaI</i>	<i>AvrII</i>	<i>BbsI</i>	<i>BbvI</i>
<i>BclI</i>	<i>BfrI</i>	<i>BglII</i>	<i>BsaBI</i>	<i>BsaJI</i>	<i>BsaOI</i>	<i>BsaWI</i>	<i>BsiEI</i>	<i>BsiXI</i>	<i>BsmI</i>
<i>BsoFI</i>	<i>BspI286</i>	<i>BsrBI</i>	<i>BsrDI</i>	<i>BsrFI</i>	<i>BsrGI</i>	<i>BstNI</i>	<i>BstOI</i>	<i>BstUI</i>	<i>BstXI</i>
<i>CfoI</i>	<i>ClaI</i>	<i>Csp45I</i>	<i>DpnI</i>	<i>DraI</i>	<i>EcoICRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>FokI</i>	<i>HaeII</i>	<i>HaeIII</i>
<i>HhaI</i>	<i>HpaII</i>	<i>HinPII</i>	<i>HincII</i>	<i>HindII</i>	<i>HindIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>KasI</i>	<i>MboI</i>	<i>MboII</i>
<i>MnI</i>	<i>MsaAI</i>	<i>MseI</i>	<i>MslI</i>	<i>MspI</i>	<i>MunI</i>	<i>MvnI</i>	<i>NciI</i>	<i>NheI</i>	<i>NspI</i>
<i>PvuII</i>	<i>RsaI</i>	<i>SacII</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>Sau96I</i>	<i>SfiI</i>	<i>SfiII</i>	<i>SnaBI</i>	<i>SpeI</i>	<i>SphI</i>
<i>StuI</i>	<i>Tfu9I</i>	<i>Tth111I</i>	<i>XbaI</i>	<i>XcmI</i>	<i>XhoI</i>	<i>XhoII</i>	<i>XmaI</i>	<i>XmnI</i>	

Tabla 35. Enzimas de restricción pre-seleccionadas para ser utilizadas en el método de genotipado de papilomavirus mediante RFLPs. De entre las enzimas compatibles con el tampón de PCR (todas las mostradas en la tabla) se excluyeron las que tenían temperaturas óptimas de digestión diferentes a 37 °C (tachadas en azul) y las que pueden presentar actividad *star* (tachadas en rojo).

1.4 Construcción de los mapas y patrones de restricción del fragmento MY11/MY09

A partir de las endonucleasas de restricción pre-seleccionadas, se construyeron y analizaron los mapas de restricción del fragmento MY11/MY09 de los papilomavirus mucosotrópicos. Cada mapa de restricción se estudió individualmente, con objeto de determinar las enzimas apropiadas para facilitar su identificación. Se siguieron los siguientes criterios para la selección de las enzimas:

- Menos de 5 dianas de restricción dentro del fragmento MY11-MY09 con objeto de no generar fragmentos demasiado pequeños, difíciles de visualizar en geles de agarosa.
- Dianas de restricción en zonas no conservadas
- Dianas de restricción presentes en el mayor número posible de papilomavirus.

Se estudiaron los mapas y patrones de restricción que se obtienen mediante digestiones simples y múltiples con las enzimas que cumplían los requisitos anteriores. Como resultado de este estudio teórico se estableció una combinación de dos digestiones simultáneas con las enzimas *RsaI* y *AluI*+*HaeIII* que permite el genotipado de los papilomavirus mucosotrópicos con un alto grado de discriminación. La enzima *RsaI* digiere el fragmento MY11-MY09 de la mayoría de los genotipos, y en distintas posiciones. Permite discriminar algunos VPHs directamente (tipos 18, 54, 6, 55, 13, 68 y 40) sin necesidad de evaluar la segunda digestión. En cambio tiene el inconveniente de presentar una diana conservada en la mayoría de los genotipos, que genera un fragmento de 72 pb aproximadamente. Las enzimas *AluI* y *HaeIII* presentan dianas en muchos genotipos y generan fragmentos complementarios, por lo que son adecuados para su uso simultáneo.

1.5 Control interno de amplificación

1.5.1 Utilidad del control interno de amplificación en la detección de papilomavirus

Se han descrito posibles causas que generan falsos negativos en las técnicas de detección de agentes víricos. En las técnicas de detección de papilomavirus, la causa principal es la presencia de hemoglobina y mucopolisacáridos en la mezcla de amplificación. La hemoglobina impregna el escobillón cervical debido a pequeñas lesiones que el ginecólogo realiza cuando efectúa la toma. Debe considerarse que la primera manifestación clínica del cáncer cervical es la metrorragia y que los tejidos con lesiones son más proclives al sangrado. La presencia de mucopolisacáridos en la muestra es muy común debido a la propia naturaleza de la toma. En ocasiones el método utilizado para la purificación de ácidos nucleicos no elimina completamente estos componentes, de forma que pueden actuar como inhibidores de la PCR.

Para evitar los falsos negativos, es indispensable utilizar un sistema de control interno (CI) de amplificación que generen un producto de amplificación distinguible del que se obtiene a partir de los papilomavirus. En las muestras negativas, la ausencia de amplificación en el CI indica que se ha producido una inhibición de la PCR, y por tanto el resultado no es válido.

El método descrito incluye un sistema de CI que utiliza como molde una construcción artificial de ADN heterólogo obtenida mediante PCR, introducida directamente en la mezcla de amplificación. Este sistema ha permitido detectar gran cantidad de falsos negativos debidos a la inhibición de la PCR, en las 9734 muestras estudiadas en el período 2003-2010. La mayoría de las muestras que inicialmente presentaron inhibición fueron re-procesadas utilizando un sistema de purificación de ADN que permite obtener un ADN de mayor pureza, y finalmente muchas pudieron ser analizadas e informadas. No obstante, en 35 muestras no se consiguió eliminar la inhibición, por lo que fueron informadas como “no valorables” y se recomendó la realización de una nueva toma. El sistema de control interno implementado ha demostrado su utilidad en la detección de la inhibición de la PCR en las muestras clínicas analizadas.

1.5.2 Utilización de ADN exógeno vs ADN genómico humano como molde para el CI

Tal y como se ha indicado en el apartado de Introducción, hay varios parámetros a considerar en la implementación del CI: composición del molde, procedencia del mismo, concentración y etapa en la que se introduce. La elección de las opciones disponibles para cada uno de estos parámetros determina la estrategia del control interno.

La utilización de ADN de origen exógeno, tales como plásmidos, ADN de fagos o oligonucleótidos sintéticos, se contraponen al uso del ADN genómico humano presente en la muestra. Un gen tradicionalmente utilizado es el de la beta-globina humana. Esta estrategia permite verificar el proceso de purificación de ácidos nucleicos, ya que la detección del producto de amplificación del CI indica que se ha purificado correctamente el ADN humano. Sin embargo, cada método de obtención de ácidos nucleicos tiene un rendimiento específico, por lo que no es posible controlar la cantidad del mismo que se co-purifica junto al patógeno. Esto determina que el ADN humano que es co-amplificado pueda encontrarse en exceso o en defecto en la mezcla de amplificación. En el primer caso, puede dar lugar a la amplificación preferente del CI y a la utilización excesiva de los recursos de reacción, y por tanto a una pérdida de sensibilidad en la detección del patógeno por un efecto de competición. En caso de defecto, puede dar lugar a la no detección del CI, y por tanto a considerar la muestra como "no valorable", interpretándose que hay una "inhibición" inexistente.

Los sistemas basados en ADN de origen exógeno evitan este problema, ya que la cantidad del mismo está controlada. Esta circunstancia es muy importante en los métodos de detección del ADN de papilomavirus, ya que en las tomas cervicales la cantidad de células obtenidas es variable y en consecuencia la cantidad de ADN humano purificado.

1.5.3 Introducción del ADN exógeno en la mezcla de amplificación vs protocolo de purificación de ADN de la muestra

Los componentes del CI (ADN exógeno y sus cebadores) pueden introducirse durante la purificación del ADN o directamente en la mezcla de PCR. La opción más utilizada en los métodos comerciales es añadir el ADN molde en las primeras etapas de la purificación, habitualmente en el tampón de lisis de proteínas, y los cebadores en la mezcla de reacción. Así se consigue verificar la purificación del ADN de forma análoga a la utilización de ADN humano de la muestra.

De la misma forma, esta estrategia tiene el inconveniente de que no permite controlar la cantidad de ADN molde que finalmente alcanza la PCR, y por tanto la posible competencia con el patógeno por los recursos de reacción. Esta circunstancia es importante en los métodos comerciales que no incluyen un sistema de purificación propio, tales como los productos comercializados por compañías como *Cepheid* (excepto la línea *GeneXpert*), *Fast-track*, *Seegene*, *Progenie molecular*, etc. También afecta a los métodos artesanales o *in house*.

La introducción del molde del CI directamente en la mezcla de PCR permite ajustar con precisión la cantidad del mismo, de forma que se evita la competencia en desventaja para el patógeno, lo que paradójicamente puede generar un falso negativo en las muestras con baja carga viral.

1.5.4 Utilización de un ADN exógeno “heterólogo competitivo” vs ADN exógeno “estándar” como molde del CI

Las construcciones artificiales habitualmente utilizadas como molde del CI, generalmente plásmidos, pueden utilizarse sin modificaciones (sin insertos) en cuyo caso, la mezcla de amplificación deberá incorporar el propio plásmido como molde y unos cebadores específicos. En cambio, es posible diseñar construcciones que comparten los cebadores con el patógeno, aunque el producto obtenido sea distinto en tamaño y secuencia al del patógeno. Esta estrategia comporta ventajas adicionales:

1) No es necesario añadir oligonucleótidos específicos del CI (ya que son los mismos que los del patógeno). El único componente que se introduce en la PCR es la propia construcción artificial, lo que supone un ahorro en reactivos y una simplificación de la mezcla de reacción.

2) Se incrementa la competencia entre el molde del CI y el patógeno por los recursos de reacción ya que deben compartir los cebadores, además del resto de reactivos. Esta circunstancia puede ser aprovechada para minimizar la potencial merma de sensibilidad que supone dedicar recursos de reacción a la amplificación del CI. Para ello, la amplificación del CI debe gestionarse en condiciones de desventaja competitiva, utilizando concentraciones críticas del molde del CI y utilizando condiciones de reacción que favorezcan la detección del patógeno en detrimento del CI.

Cabe destacar que en muchas ocasiones la inhibición de la PCR no es completa sino parcial, y no impide detectar el patógeno aunque suponga una merma en la sensibilidad. El fenómeno de la competencia CI-patógeno permite monitorizar el grado de inhibición de la muestra en el caso de las inhibiciones parciales, ya que la cantidad de producto de amplificación correspondiente al CI que se visualiza en el gel de agarosa es un indicador relativo de la presencia de inhibiciones (figura 48).

La utilización de un CI competitivo permite también prevenir la generación de productos inespecíficos, tal y como puede observarse si se comparan las figuras 35, 46 y 47 (la primera sin CI y las segundas con CI). Los cebadores MY11 y MY09 amplifican al menos ocho regiones del ADN genómico humano (secuencias con números de acceso AJ831569-AJ831576; resultados no publicados) generando en ocasiones productos de tamaño similar al de los VPHs. Esta característica puede favorecer la generación de falsos positivos, que sin embargo

puede evitarse con el uso del CI. La adición del control interno, canaliza los excedentes de reactivos no utilizados en el caso de las muestras negativas, de forma que se evita la formación de los productos inespecíficos y eventualmente ayuda a evitar la generación de falsos positivos.

1.5.5 Obtención del molde para el CI mediante PCR vs clonación

La obtención de un molde plasmídico para el CI a menudo implica la clonación de un inserto heterólogo en un vector de clonaje (Deer et al, 2010). Esta estrategia implica preparar construcciones específicas para cada patógeno mediante el laborioso proceso de clonación. Esto significa varios días de trabajo en el laboratorio y unos considerables costes de reactivos y mano de obra.

La estrategia de CI propuesta en el presente trabajo consiste en la obtención de un amplicón formado por ADN heterólogo. Para ello se ha utilizado el par de oligonucleótidos heterólogos MY09-FQ y MY11-FQ y como molde ADN genómico humano. Tal y como se describe en los resultados, la secuencia del oligonucleótido MY11-FQ está formada por la secuencia del oligonucleótido MY11 en el extremo 5' y una secuencia complementaria al gen CFTR en el extremo 3'. El oligonucleótido MY09-FQ está diseñado de forma análoga.

La principal ventaja de este sistema es la facilidad y rapidez en el diseño y la obtención del molde para el CI, frente a la utilización de plásmidos o fagos que supone al menos realizar cultivos bacterianos para obtenerlos, y en el caso de que se precise una construcción de ADN específica recurrir a la clonación del fragmento.

La construcción MY11-CFTR-MY09 se obtiene directamente mediante PCR. Una vez obtenido el amplicón, éste puede incluirse como un reactivo más en la mezcla reacción utilizada para la detección de VPHs, y puede ser co-amplificado por los cebadores MY11 y MY09. La reacción de amplificación para la obtención del amplicón MY11-CFTR-MY09 debe realizarse una sola vez, ya que el producto obtenido debe utilizarse diluido y es suficiente para realizar del orden de 10^9 reacciones de detección de papilomavirus. Esto se traduce en una importantísima reducción de costes, ya que sólo es preciso adquirir los oligonucleótidos heterólogos MY11-FQ y MY09-FQ, que presumiblemente sólo van a ser utilizados una vez, y la realización de una única reacción de PCR. Dados los precios actuales, los materiales necesarios no superan los 20 euros. En la mezcla de amplificación para la detección del patógeno no es necesario añadir ningún componente adicional, tan sólo el amplicón del CI, que se co-amplificará junto al patógeno utilizando los mismo cebadores MY11 y MY09 utilizados para la detección de VPHs.

Una ventaja adicional de esta estrategia es que la mezcla de amplificación incorpora la mínima cantidad de componentes. Tan sólo se introduce el amplicón MY11-CFTR-MY09 y en una dilución 10^{-8} 10^{-9} aproximadamente (dependiendo del rendimiento del PCR original). Este hecho permite incluir otros componentes, tales como cebadores para la detección de otros patógenos, sin saturar la mezcla de amplificación y facilitando la puesta a punto de reacciones con multiplexado.

El inconveniente principal de esta estrategia es la necesidad de ajustar con precisión la concentración del amplicón heterólogo MY11-CFTR-MY09 en la mezcla de reacción. Dado que la PCR preparativa para la síntesis del amplicón rinde una enorme cantidad de producto, su utilización directa en la PCR para la detección del patógeno absorbe todos los recursos de reacción (la eventual concentración del patógeno es incomparablemente menor que la del amplicón). Por esto es necesario realizar un ajuste preciso de la concentración del molde del CI hasta su límite de detección. En la práctica es conveniente realizarlo en cada lote de producción, siguiendo el mismo procedimiento que se indica en el apartado 1.5.4.

En definitiva se puede considerar que la estrategia propuesta es un sistema práctico y sencillo de implementar un control interno de amplificación competitivo heterólogo en una reacción de PCR. Permite prevenir eficazmente los falsos negativos monitorizando relativamente el grado de inhibición, y ajustar las condiciones de reacción para evitar la competencia en desventaja para el virus. Asimismo, permite prevenir la generación de falsos positivos debidos a la amplificación inespecífica de secuencias humanas.

1.5.6 Identificación de papilomavirus utilizando el control interno de amplificación

La secuencia del producto de amplificación del CI no presenta ninguna de las dianas de restricción de las enzimas *Rsa* I, *Alu* I y *Hae* III, utilizados en el método de tipado, de forma que no interfiere en la interpretación de los patrones de restricción.

1.6 Valoración de la vigencia del método descrito

Se han publicado innumerables métodos para la detección e identificación de papilomavirus, que combinan la amplificación por PCR del fragmento MY11-MY09 con el genotipado mediante el análisis de los fragmentos de restricción (*RFLPs*). Manos *et al* (1989) diseñaron este par de oligonucleótidos y describieron un método de tipado basado en una digestión simultánea con 6 enzimas de restricción. Este protocolo permite discriminar entre 20 Papilomavirus mucosotrópicos. Aunque el sistema de tipado queda actualmente muy obsoleto, la principal aportación de estos autores es el gran acierto en el diseño de estos oligonucleótidos cuyo uso está ampliamente extendido.

En la actualidad, esta estrategia es ampliamente utilizada en los laboratorios asistenciales, especialmente en técnicas artesanales o *in house* (Santiago *et al*, 2006; Nobre *et al*, 2008; Bianchi *et al*, 2013; Figueiredo *et al*, 2013; Chen *et al*, 2013; de Almeida *et al*, 2014). Santiago *et al* (2006) proponen un sistema basado en el amplicón MY11-MY09 y la digestión con la enzima HpyCH4V únicamente. Nobre *et al* (2008) muestra un sistema basado en la digestión del producto consenso MY11-MY09 con las enzimas *Pst*I, *Hae*III, *Dde*I y *Rsa*I y el análisis electroforético en gel de poliacrilamida. En definitiva su uso está muy extendido tanto con fines diagnósticos como epidemiológicos.

Respecto a los productos comerciales, en la actualidad existen gran cantidad de productos que continúan utilizando los oligonucleótidos MY11/MY09 (o las variantes PGMY11/PGMY09) para la detección de los papilomavirus. En cambio, la técnica de RFLPs es cada vez menos utilizada en este ámbito, al contrario de lo que sucede con el uso artesanal o *in house*, y ha sido desplazada por técnicas de hibridación como *dot-blot* o *arrays*.

Actualmente el único sistema comercial disponible basado en RFLPs es *Papitype* (*Progenie molecular*, Valencia; España). Este producto permite la identificación de la mayoría de los papilomavirus mucosotrópicos, siendo el reactivo comercial de mayor espectro. Si bien es cierto que actualmente se han descrito más de 200 genotipos de papilomavirus, la mayoría de los nuevos tipos descritos representan un porcentaje muy pequeño de las muestras estudiadas en la práctica clínica. Por otro lado, este fenómeno afecta todavía en mayor medida a los sistemas basados en hibridación genómica. *Papitype* presenta una especificidad sólo superada por la secuenciación.

2. Resultados obtenidos en el estudio de muestras clínicas (período 2003-2010)

2.1 Estadísticas obtenidas con la utilización del sistema descrito en el presente trabajo

El estudio realizado ha contado con 9.734 muestras clínicas, una cifra estadísticamente significativa. Los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos en otros estudios que parten de poblaciones de muestras similares utilizando el *Linear array* (Roche) basado en un *dot-blot* reverso: Figueiredo *et al* (2013), Aliaga *et al* (2014) obtienen entre 28-45% de positivos.

Los resultados obtenidos muestran una baja frecuencia de muestras portadoras de co-infecciones, en comparación con otros estudios. Cabe destacar que el número de co-infecciones depende del método utilizado. Mientras que los sistemas basados en hibridación genómica permiten detectar fácilmente las co-infecciones, los sistemas basados en secuenciación y/o análisis electroforético son menos eficaces para este propósito.

Respecto a la distribución de los diferentes genotipos, los resultados indican que existe una gran diversidad de genotipos en las muestras precursoras de cáncer cervical. El tipo más frecuentemente detectado es el VPH 16 (25,14 %) seguido de VPH53, VPH31, VPH66 y VPH58. Los datos obtenidos son similares a los que se han descrito en la bibliografía cuando se utilizan sistemas de amplio espectro, como secuenciación o arrays (Pista *et al*, 2011; Bonde *et al*, 2014).

2.2 Relación entre el tipo vírico y la gravedad de la lesión

Al intentar relacionar la gravedad de la lesión con el tipo vírico, se ha encontrado la dificultad de que tan sólo 870 (8,94 %) muestras de mujeres aportaban datos clínicos. No obstante este número es suficientemente significativo para extraer algunas conclusiones. Previamente se eliminaron las muestras con resultado negativo, no valorable y aquellas que eran portadoras de más de un tipo vírico.

Aproximadamente el 40 % de las citologías dudosas (ASCUS/AGUS) son portadoras de VPHs, de forma similar a las muestras con un diagnóstico claro de LSIL. Este dato coincide en innumerables estudios, en los que se detecta VPH en un alto porcentaje de las muestras con citología dudosa. Esto pone de manifiesto que una buena parte de estas muestras corresponden en realidad a lesiones precursoras y podría indicar una deficiente calificación de estas lesiones, que deberían haber sido clasificadas como lesiones de bajo grado. Al mismo tiempo se pone de manifiesto la utilidad de los métodos de detección de papilomavirus para discriminar entre las lesiones precursoras de otro tipo de muestras.

El método utilizado ha permitido detectar una gran diversidad de genotipos tanto en las lesiones dudosas como en las de alto y bajo grado (29 genotipos de referencia y dos nuevas variantes posteriormente caracterizadas). Los estudios basados en técnicas de identificación menos específicas ofrecen una menor distribución, ya que algunos tipos de menor relevancia clínica no están representados en algunos métodos comerciales.

Se han agrupado las muestras clasificadas LSIL, condilomas y dudosas (ASCUS/AGUS) por un lado, y por el otro las HSIL y las tomas post-tratamiento (considerando que estas últimas provienen de lesiones de alto grado o carcinomas tratados). En ambos grupos se han detectado muchos más tipos de alto riesgo que de bajo riesgo. En el primer grupo se ha detectado un papilomavirus de alto riesgo en el 76,74 % de las muestras, poniendo de manifiesto la importancia de la identificación del genotipo en las lesiones precancerosas y dudosas, incluso en sus etapas iniciales.

En el segundo grupo se han detectado 17 genotipos en 57 muestras. En estas lesiones se ha detectado un papilomavirus de alto riesgo en un 84,21 % de las muestras (89,80 % si se consideran exclusivamente las lesiones de alto grado) evidenciando la mayor relación entre estos genotipos y la gravedad de la lesión. No obstante también se han detectado los genotipos de bajo riesgo VPH 62 (1 muestra) y VPH89 (3 muestras) en muestras de alto grado. Esto podría explicarse por una inmunosupresión o inmunodeficiencia no informadas, o bien por una co-infección con un VPH de algo riesgo que no ha sido detectado. No obstante cabe destacar que tres casos clínicos se relacionan al VPH89 lo que sugiere que este virus clasificado junto a otros VPHs de bajo riesgo en la especie Alpha-3 presenta un riesgo específico mayor a lo esperado.

La clasificación de los tipos 53, 66 y 82 como papilomavirus de alto riesgo ha generado cierta controversia e incluso en ocasiones han llegado a ser considerados papilomavirus de bajo riesgo. La OMS considera que deben ser considerados virus de alto riesgo aunque se encuentran frecuentemente en lesiones benignas. Muñoz (2003) considera que el VPH82 debe ser considerado de alto riesgo, mientras que VPH53 y VPH66 de "probable" de alto riesgo. En cambio Schiffman *et al.* (2009) indican que los tipos 53 y 66 rara vez se relacionan con cáncer en infecciones simples y proponen reclasificarlos. En el presente trabajo se han detectado estos tres genotipos como único virus en lesiones de alto grado, lo que sugiere que sería correcto mantener la clasificación de estos tres genotipos en la categoría de alto riesgo.

Otro dato relevante es que tan sólo el 14,04 % de las muestras post-tratamiento fueron positivas, poniendo de manifiesto la eficacia de los mismos en la eliminación del virus y la poca recurrencia de la infección.

2.3 Relación entre los papilomavirus y la edad

Se disponía del dato de la edad en 3.340 muestras de mujeres. El mayor número de muestras se concentra en el tramo de edad comprendido entre 20 y 39 años: 2.213 muestras (66,6 %) coincidiendo con la etapa de la vida de mayor actividad sexual. Las dos muestras de menor edad pertenecían a niñas de 4 y 11 años. Se desconoce el origen de la infección en estas dos niñas, aunque puede tratarse de infección perinatal (especialmente en la menor de ellas) así como de abusos sexuales, ya que la infección accidental es poco probable en el caso de los papilomavirus.

El tramo de edad con mayor prevalencia de la infección es el de 20-24 (22,73 % de los casos), un resultado equivalente al obtenido en otros estudios (Pista *et al*, 2011). Dado que en el tramo inmediatamente anterior (15-19 años) la prevalencia del virus es tan sólo del 5,66 % y que posteriormente desciende, esto sugiere que la adquisición de la infección se produce de forma muy acentuada durante los primeros años de actividad sexual y que la mayoría de las infecciones revierten espontáneamente (tabla 29). Este dato coincide con el hecho de que es la etapa de la vida en que las mujeres mantienen contactos sexuales con mayor número de compañeros sexuales. Por otro lado, esta observación coincide con el hecho de que en el tramo de 15-19 años se observa el mayor porcentaje de genotipos de bajo riesgo (20,14 %). Podría concluirse que las infecciones debidas a papilomavirus de bajo riesgo tendrían un componente "juvenil" mientras que en etapas posteriores de la vida, se detectarían genotipos de alto riesgo en mayor porcentaje. Esto podría explicarse en base a la persistencia vírica que experimentan los genotipos de alto riesgo.

Por último destacar que el tramo de edad 50-54 años es el de menor prevalencia de la infección (el 77,42 % de las muestras son negativas en esta franja de edad) para aumentar ligeramente en mujeres de 55 años o más. Esta observación puede explicarse como una consecuencia de la disminución de la eficacia del sistema inmune con la edad, o tal vez en cambios en las actitud sexual de las mujeres o sus compañeros sexuales a partir de esta edad.

3. Caracterización de dos nuevos aislados

La gran heterogeneidad de los papilomavirus implica una importante complejidad taxonómica que actualmente está regulada por el *International HPV Reference Center*, con sede en el instituto Karolinska (Estocolmo). Este organismo se encarga de clasificar las nuevas variantes descritas y asignarles un taxon. Para ello exige como requisito indispensable el depósito de los nuevos genotipos, previa clonación en un vector de clonaje. Este hecho supone una exigencia técnica no siempre fácil de cumplir, especialmente en el caso de aquéllas muestras con baja carga viral o que han remitido espontáneamente y de las que no es posible obtener una nueva muestra.

La variante A0383 presenta la máxima similitud con el tipo VPH72 (89 % en la región L1) por lo que debe incluirse en la especie Alpha-3, formada por los genotipos 61, 62, 72, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 102, 114, 125, y que tiene como referencia el VPH61. De acuerdo con los criterios actuales este tipo podría haber sido considerado un nuevo tipo. Para ello, se iniciaron labores de clonaje pero no se consiguieron resultados satisfactorios (resultados no mostrados) por lo que finalmente se desistió ante la poca disponibilidad de muestra. Más recientemente se describió el genotipo VPH72b, que presenta un 82 % de similitud con el aislado A0383. Esta circunstancia sugiere que la variante descrita finalmente podría ser considerada un nuevo subtipo del VPH72. Dado que este genotipo no ha sido registrado a pesar del tiempo transcurrido desde la toma (año 2003), puede considerarse que se trata de una extraña variante endémica de nuestro entorno geográfico.

Respecto a la variante E1201, ésta presenta máxima similitud con el VPH86, con la que difiere en un 8 % en la secuencia de nucleótidos del ORF L1. De acuerdo con los criterios actuales, esta variante debería ser considerada un subtipo del tipo 86 y por tanto también estaría incluida en la especie Alpha-3, lo que sugiere que se trata de un virus de bajo potencial oncogénico. En ambos casos la posible consideración de estas variantes como virus de bajo potencial oncogénico coincide con los datos clínicos disponibles, ya que en estudios posteriores el tejido cervical de las pacientes se normalizó espontáneamente y el virus fue eliminado en sucesivas pruebas.

El estudio de estos genomas contribuye al conocimiento de la diversidad genómica de los papilomavirus.

Conclusiones

- 1 El sistema de detección e identificación de los papilomavirus humanos mucosotrópicos desarrollado en el presente trabajo es adecuado para el análisis de muestras clínicas de rutina.
- 2 El sistema de control interno desarrollado permite descartar los falsos negativos debidos a inhibiciones de la reacción de amplificación, sin que esto suponga una merma en la sensibilidad del sistema. Asimismo es un sistema sencillo, práctico y de bajo coste para su utilización en el laboratorio. Es aplicable a otros patógenos y puede ser utilizado también en PCR a tiempo real.
- 3 El estudio de 9734 muestras de epitelio genital femenino analizadas en el período 2003-2010 ha permitido obtener datos estadísticos significativos en referencia a la distribución de genotipos en las poblaciones analizadas, la relación de los diferentes genotipos víricos con la gravedad de la lesión y la prevalencia de la infección por edades.
- 4 Las infecciones debidas a papilomavirus de bajo riesgo tendrían un componente "juvenil" mientras que en etapas posteriores de la vida, se detectarían en mayor porcentaje genotipos de alto riesgo, lo que podría explicarse en base a la persistencia vírica que experimentan estos últimos.
- 5 El sistema de detección e identificación de los papilomavirus humanos mucosotrópicos ha permitido identificar dos aislados atípicos no descritos hasta el momento.
- 6 El aislado denominado A0383 presenta un 89% de similitud en la región L1 con el papilomavirus filogenéticamente más cercano, el VPH 72, y un 92 % con el subtipo 72b, por lo que debe ser considerado un nuevo subtipo del VPH72.
- 7 El aislado denominado E1201 presenta un 89% de similitud en la región L1 con el papilomavirus filogenéticamente más cercano, el VPH 86, por lo que debe ser considerado un nuevo subtipo de éste.

Bibliografía

- **A J van den Brule, C J Meijer, V Bakels, P Kenemans, and J M Walboomers.** Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990 Dec; 28(12): 2739–2743.
- **Aliaga F, Benassar A, Jaén D, Ruiz M.** Estudio comparativo de nuevas metodologías para la detección de los diferentes genotipos del virus del papilloma humano. Congreso SEIMC 2014 Valencia. Poster 505.
- **Arroyo JD.** Papilomavirus humanos, cáncer cervical y vacunación. *Virología.* 2010; 13.
- **Baseman JG, Koutsky LA.** The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* Volume 32, Supplement, March 2005, Pages 16–24.
- **Bernard, H.-U., Chan, S.-Y. , Delius, H. (1994).** Evolution of papillomaviruses. In *Human Pathogenic Papillomaviruses*, pp. 33±54. Edited by H. zur Hausen. CTMI 186. Heidelberg : Springer Verlag.
- **Bessetti.** An Introduction to PCR Inhibitors. Promega corporation. 2007.
- **Bianchi S, Frati ER, Panatto D, Martinelli M, Amicizia D, Zotti CM, Martinese M, Bonanni P, Boccalini S, Coppola RC, Masia G, Meloni A, Castiglia P, Piana A, Gasparini R, Tanzi E.** Detection and genotyping of human papillomavirus in urine samples from unvaccinated male and female adolescents in Italy. *PLoS One.* 2013 Nov 8;8(11)
- **Bonde J, Rebolj M, Ejegod DM, Preisler S, Lynge E, Rygaard C.** HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using CLART HPV2 human papillomavirus genotype microarray system. *BMC Infect Dis.* 2014 Jul 26;14:413
- **Bosch FX, Qiao YL, Castellsagué X.** The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* (2006) 94 (Supplement 1), S8-S21.
- **Bosch FX, de Sanjosé S.** The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease Markers* 23 (2007) 213–227.
- **Burk R, Ho G, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R.** Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infectious Diseases.* 1996; 174: 679-689.
- **Castellsagué X., de Sanjosé S., Aguado T., Louie K.S., Bruni L., Muñoz J., Diaz M., Irwin K., Gacic M., Beauvais O., Albero G., Ferrer E., Byrne S., Bosch F.X.** HPV and Cervical Cancer in the World 2007 Report. *Vaccine* 25S (2007) C1–C26.
- **Chakrabarti R, Schutt CE.** The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene.* 2001 Aug 22;274(1-2):293-8.
- **Chen L, Watanabe K, Haruyama T, Kobayashi N.** Simple and rapid human papillomavirus genotyping method by restriction fragment length polymorphism analysis with two restriction enzymes. *J Med Virol.* 2013 Jul;85(7):1229-34
- **Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group.** Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8.

- **Contorni M, Leoncini P.** Typing of human papillomavirus DNAs by restriction endonuclease mapping of the PCR products. *J Virol Methods.* 1993; 41: 29-36.
- **Coutlée F, Rouleau D, Ferenczy A, Franco E.** The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005;16(2):83-91.
- **Delgado E, Adelantado JM, Quílez M, Llauradó A, Bellart J y Del Solar J.** Licenciatura Ginecología. Serie manuales clínicos para licenciatura y residencia. Ed Salvat. 1990.
- **de Almeida FG, Machado AP, Fernandes CE, Ferreira AT, Padovani CT, Tozetti IA.** Molecular epidemiology of the human papillomavirus infection in self-collected samples from young women. *J Med Virol.* 2014 Feb;86(2):266-71.
- **de Sanjosé y García.** 4a Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. 2006.
- **de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. See comment in PubMed Commons below *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453-9.
- **de Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJ, Snijders P.** The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* April 1995 vol. 76 no. 4 1057-1062.
- **Devereux J, Haeberli P, Smithies O.** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 1984 Jan 11;12(1 Pt 1):387-95.
- **de Villiers EM.** Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994; 186: 1-12.
- **de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004 Jun 20;324(1):17-27.
- **Documento de consenso SEGO.** Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. La infección por papilomavirus. 2002.
- **Documento de consenso SEGO.** Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Vacunas profilácticas frente al VPH 2008.
- **Dyson N, Howley PM, Münger K y Harlow E.** The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989; 243: 934-937
- **Edeibiri AA.** Cervical intraepithelial neoplasia: The role of age at first coitus in its etiology. *J Rep Med.* 1990; 25: 255-259.
- **Edelman , Fox A, Alderman E, Neal W, Shapiro A, et al.** Cervical papanicolau smear abnormalities and Chlamydia trachomatis in sexually active adolescent females. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2000; 13 (2): 65-73
- **Evander M, Wadell G.** A general primer pair for amplification and detection of genital human papillomavirus types. *J Virol Methods.* 1991; 31: 239-250.
- **Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M.** Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 4810-4814.
- **Figueiredo Alves RR, Turchi MD, Santos LE, Guimarães EM, Garcia MM, Seixas MS, Villa LL, Costa MC, Moreira MA, Alves Mde F.** Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human

papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiânia, Brazil: a community-based study. *BMC Public Health*. 2013 Nov 4;13:1041

- **Finch JI, Klug A.** The structure of viruses of the papillomavirus type III. Structure of rabbit papilloma virus. *J Mol Biol*. 1965; 13: 1-12.
- **Franco EL.** Epidemiology of anogenital warts and cancer. En: Crum CP, Lorincz AT, editors. *Human Papillomavirus*. New York: Saunders. 1996; 597-623.
- **Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K.** Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol*. 1991; 72: 1039-1044.
- **Genetics Computer Group.** Wisconsin USA. Program manual of the GCG package, version 7.
- **Gostout B, et al.** Cervical cancer in older women: a molecular analysis of human papillomavirus types, HLA types and p53 mutations. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 179: 56-61.
- **Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ.** Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):357-61.
- **Gregoire L, Arella M, Campione-Picardo, Lancaster WD.** Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 2660-2665.
- **Hans-Ulrich B, Robert D, Chen Z, van Doorslaerb K, zur Hausen H, de Villiers EM.** Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* Volume 401, Issue 1, 25 May 2010, Pages 70–79.
- **Jacques Ferlay, Hai-Rim Shin, Freddie Bray, David Forman, Colin Mathers, Donald Maxwell Parkin.** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.
- **Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM.** Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol*. 1995 Apr;33(4):901-5.
- **Jiang HL, Zhu HH, Zhou LF, Chen F, Chen Z.** Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. *J Med Microbiol*. 2006 Jun;55(Pt 6):715-20.
- **Kennedy, S et al., 2011:** "Stabilize Taq Polymerase and may also suppress the formation of secondary template structure. 0.1-1% Triton X-100, Tween-20 or NP-40 may increase yield but may also increase non-specific amplification." *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*, 2011.
- **Kjaer S, de Villiers EM, Dahl C, Engholm G, Bock JE, Vertergaard BF, Lyng E, Jensen OM.** Case-control study of risk factors for cervical neoplasia in Denmark. Role of the "male factor" in women with one lifetime sexual partner. *Int J Cancer*. 1991; 48 (1): 39-44.
- **Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al.** Cohort study of risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 associated with cervical papillomavirus infection. *New Eng J Med*. 1992; 327 (18): 1272-1278.
- **Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, Syrjänen KJ, Gyllensten UB, Syrjänen SM;** NIS Study Group. Prevalence of the most common high-risk HPV genotypes among women in three new independent states of the former Soviet Union. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6): 771-81.

- **Lorincz AT, Reid R; Bennett J, Greenberg M, Lancaster W, Kurman R.** Human Papillomavirus Infection of the Cervix: Relative Risk Associations of 15 Common Anogenital Types. *Obstet Gynecol.* 1992; 79: 328-337
- **Luque AE, Demeter LM, Reichman RC.** Association of human papillomavirus infection and disease with magnitude of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA plasma level among women with HIV-1 infection. *J Infectious Diseases.* 1999; 179(6): 1409-1409
- **Manos M, Ting Y, Wright K, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM.** The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital papillomaviruses. *Cancer cells.* 1989; 209-214.
- **Manos M, Ting Y.** Detection and typing of genital human papillomaviruses. En: *PCR protocols: A guide to methods and applications.* Academic Press. 1990.
- **Masanori T, Robert D. Burk.** Complete nucleotide sequence and analysis of a novel human papillomavirus (HPV 84) genome cloned by an overlapping PCR method. *Virology* 02/2001; 279(1):109-15. DOI: 10.1006/viro.2000.0716
- **Meijer CJ, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, et al.** HPV typing and testing in gynaecological pathology: has the time come. *Histopathology.* 1998; 33 (1): 83-86.
- **Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, Risse EK, van Diest PJ, Bleker OP, Helmerhorst T, Schipper ME, Meijer CJ, Walboomers JM.** Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer.* 1993 Apr 1;53(6):919-23
- **Modis Y, Trus BL, Harrison SC.** Atomic model of the human papillomavirus capsid. *EMBO J.* 2002 Sep 16;21(18):4754-62.
- **Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, et al.** The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatrics.* 1998; 132: 227-284.
- **Muñoz, et al.** Epidemiological classification of Human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *HPV Today, New Eng J Med.* 2003; 348 (6): 518-527.
- **New England Biolabs.** Catalog.
- **Ninove L, Nougairède A, Gazin C, Thirion L, Delogu I, Zandotti C, Charrel RN, De Lamballerie X.** RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. *PLoS One.* 2011 Feb 9; 6(2):e16142.
- **Nobre RJ, de Almeida LP, Martins TC.** Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol.* 2008 May;42(1):13-21.
- **Parkin DM, Bray F.** Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine Volume 24, Supplement 3,* 21 August 2006, Pages S11–S25.
- **Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O.** Prevalence of human papillomavirus infection in women in Portugal: the CLEOPATRE Portugal study. *CLEOPATRE Portugal Study Group. Int J Gynecol Cancer.* 2011 Aug;21(6):1150-8
- **Pizzighella S, Rasso M, Piacentini I, Maschera B, Palú G.** Polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme typing as an accurate and simple way to detect and identify human papillomaviruses. *J Med Microbiol.* 1993; 39: 33-38.
- **Puig-Tintoré LM et al.** Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Progresos de Obstetricia y ginecología, nº49 suplemento 2:5-62* (noviembre, 2006).

- **Rivas L.** Virus de papiloma humano y cáncer de cuello de útero. *Revista médica de costa rica y centroamerica* LXIX (601) 129-132, 2012.
- **Santiago E, Camacho L, Junquera ML, Vázquez F.** Full HPV typing by a single restriction enzyme. *J Clin Virol.* 2006 Sep;37(1):38-46. Epub 2006 Jul 24.
- **Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ y Howley PM.** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990; 63: 1129-1136.
- **Schneider A, Kirchmayr R, De Villiers EM, Gissmann L.** Subclinical human papillomavirus infections in male sexual partners of female carriers. *J Urol.* 1988; 140 (6): 1431-1434.
- **Schneider A.** Pathogenesis of genital HPV infection. *Genitourinary Medicine.* 1993; 69: 165-173.
- **Shah K.** Human papillomaviruses and anogenital cancers. *N Engl J Med.* 1997; 337 (19): 1336-1344.
- **Shamanin V, Delius H, de Villiers EM.** Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. *J Gen Virol.* 1994; 75: 1149-1156.
- **Shidara, Suzuki, Hara y Nakajima.** Lack of synergistic association between human papillomavirus and *ras* gene point mutation in laryngeal carcinomas. *The Laryngoscope.* Volume 104, Issue 8, pages 1008–1012, August 1994.
- **Shiffman MH, Brinton LA.** The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer.* 1995; 76 Suppl: 1888-1901.
- **Schiffman, Gary Clifford, Franco M Buonaguro.** Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer* 2009, 4:8
- **Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM.** Degenerate primers based on highly conserved regions of amino acid sequence in papillomaviruses can be used in a generalized polymerase chain reaction to detect productive human papillomavirus infection. *J Gen Virol.* 1991; 72: 2781-2786.
- **Solomon D, Davey D, Kurman R, et al.** The 1988 Bethesda System 2001: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287: 2114-2119.
- **Temmenman M, Tyndall MW, Kidula N, et al.** Risk factors for human papillomavirus and cervical precancerous lesions, and the role of concurrent HIV-1 infection. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics.* 1999; 65(2). 171-181.
- **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
- **Trottier H, Franco EL.** The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* Volume 24, Supplement 1, 30 March 2006, Pages S4–S15
- **Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD.** Phylogenetic classification of human papillomavirus: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol.* 1992; 72: 2653-2660.
- **Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop, DHL, Calisher CH, Carsten, EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo M.A, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB** (2002) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses.* Academic Press New-York, San Diego.
- **Varela L, Queiro T.** Detección de los oncogenes Hpv E6/E7 para el diagnóstico precoz de cáncer de

cuello de útero. 2010.

- **Vernick JP y Steigmen CK.** The HPV DNA virus hybrid capture assay: what is it and where do we go from here? www.mlo-on-line.com. Marzo 2003.
- **von Krogh G, Rylander E.** Genitoanal papilloma virus infection. 1ª edición. Conpharm AB. Sweden. 1989.
- **Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG.** Histología Funcional. Editorial JIMS. Segunda edición. 1987.
- **Ying H, Jing F, Fanghui Z, Youlin Q, Yali H.** High-risk HPV nucleic acid detection kit—the *care*HPV test –a new detection method for screening. Scientific Reports Article number: 4704, April 2014
- **Zheng PS, Li SR, Iwasaka T, Song J, Cui MH, Sugimori H.** Simultaneous detection by consensus multiplex PCR of high- and low-risk and other types of human papillomavirus in clinical samples. Gynecol Oncol. 1995; 58: 179-183.
- **zur Hausen H.** Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2000 May 3;92(9):690-8.

