



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SERVICIO DE DERMATOLOGIA, HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

***VERRUGAS CUTÁNEAS CAUSADAS POR VPH ASOCIADAS A
ALELOS DEL HLA DQ EN POBLACIÓN MEXICANA QUE ACUDE
A LA CONSULTA EXTERNA DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL
GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGIA

PRESENTA:

GRAZIA MARÍA SÁNCHEZ BARRIENTOS

DIRECTOR: DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE



MEXICO, D. F.

AGOSTO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Servicio de Dermatología y en el Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" bajo la dirección de la Dra. María Elisa Vega Memije y de la Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz.

Este trabajo de Tesis con No. PROT-06-37-2009, presentado por la alumna Grazia María Sánchez Barrientos se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dra. María Elisa Vega Memije, con fecha del 6 de agosto del 2009 para su impresión final.

Tutor principal

Dra. María Elisa Vega Memije

Co-Tutor

Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de enseñanza e Investigación.
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe del Servicio de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. María Elisa Vega Memije
Subdirectora de Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Verrugas cutáneas causadas por VPH asociadas a alelos del HLA DQ en población mexicana que acude a la consulta externa de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Colaboradores:

Nombre: **Dra. Cristina Itzamma García Corona**

Firma: _____

Nombre: **Dr. Julio Granados Arriola**

Firma: _____

Agradecimientos

A ti papi, que siempre me has dado tu apoyo y tu infinito amor y que sembraste en mi valores de lucha y superación que hoy dan su fruto. Eres mi vida, mi fortaleza y mi mayor ejemplo a seguir.

A mi mami que con su ternura y paz interna da tranquilidad a mi alma. Eres mi gran amiga, mi confidente. Gracias por los magníficos consejos que me brindas, consejos que sólo una MADRE puede dar y por impulsarme siempre a ser mejor.

A Pablo por ser mi amigo, mi compañero fiel, mi complice. Junto a ti todas mis luchas tiene un propósito y un sentido. Gracias por el amor y el apoyo que me brindas en todo momento. Simplemente gracias por creer en mi. Te amo.

A mi hermano un hombre de principios y convicciones, apasionado, que lucha por lo que quiere y de quien he aprendido que con voluntad y amor al trabajo todo se puede lograr.

A mis compañeros Ixchel, Adri, Lalo, Martita y Lore por brindarme su amistad y por que en estos tres años compartimos momentos de angustia, pero sobre todo la alegría de ver un sueño convertirse en realidad. Los llevo a todos en mi corazón. Nunca los olvidare.

A todos mis maestros por su paciencia y por todo el conocimiento que me brindaron y sobre todo por enseñarme a amar la dermatología.

A mi maestra, Dra. Vega, por ser un gran ser humano y extenderme la mano cuando más lo necesitaba. Por su incansable dedicación a la enseñanza y por su cariño. Es un enorme honor ser su alumna, mil gracias por todo.

A la Dra. Angélica Olivo, Dra. Cristina García y Dr. Julio Granados por su esfuerzo y colaboración en este proyecto ya que sin Uds. esto no hubiese sido posible.

A Rocío Jiménez Lucio y a Mercedes Piedad de León por su participación en la realización técnica de este trabajo. Gracias por su ayuda.

INDICE

<i>GLOSARIO</i>	9
<i>RELACION DE FIGURAS Y TABLAS</i>	10
<i>RESUMEN</i>	11
<i>Abstract</i>	12
1. INTRODUCCION	13
2. ANTECEDENTES	14
Características biológicas del VPH.	15
Patogénesis de la infección por VPH en piel	16
Polimorfismo de los genes del complejo principal de histocompatibilidad.	18
Marco de Referencia	21
3. JUSTIFICACION	24
4. HIPOTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo General.	25
5.2 Objetivos particulares.	25
6. MATERIAL Y METODOS	26
6.1. Tipo de Estudio	26
6.2. Ubicación Temporal y Espacial	26
6.3. Criterios de Selección de la Muestra	26
Criterios de Inclusión.	26
Criterios de exclusión.	27
Criterios de eliminación.	27

6.4. Variables	28
6.5. Tamaño de la Muestra.	28
6.6. Métodos de Laboratorio	29
Extracción de DNA:	29
Cuantificación del DNA:	30
Amplificación del DNA:	30
Verificación de la amplificación:	31
Tipificación con sondas específicas de secuencia (SSOs):	31
Marcaje de los SSOs.	32
Prehibridación e hibridación de las membranas.	32
Quimioluminiscencia.	35
6.7. Análisis Estadístico	35
7. Resultados	36
<i>Pacientes</i>	40
<i>Controles</i>	40
8. DISCUSION	41
9. CONCLUSIONES	43
11. BIBLIOGRAFIA	44
12. ANEXOS	49
Anexo 1	50
Anexo 2	51
Cuestionario	52

GLOSARIO

VPH: Virus del Papiloma Humano.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

CMI: Inmunidad mediada por células.

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad

HLA: Antígeno de Leucocitos Humanos (MHC en el humano)

Haplotipos: Conjunto de genes ligados que se transmiten juntos

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

HEF: Hiperplasia epitelial focal

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SSP: Iniciadores específicos de secuencia

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNA: Ácido Ribonucleico

Taq polimerasa: Enzima termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, que es capaz de formar una cadena complementaria de DNA a partir de nucleótidos libres

TdT: Desoxittransferasa terminal

SSO: Oligonucleótidos específicos de secuencia

ddUTP-Dig: Didesoxiuracilo trifosfato-Digoxigenina

p: Probabilidad

pc: Probabilidad corregida, multiplicando el valor por el número de alelos presentes en la población estudiada

RM: Razón de Momios

FE: Factor etiológico

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.

Localización y organización del Complejo de HLA en el Cromosoma 6 ____ pag. 19

Figura 2.

Estructura de las moléculas del HLA clase I y II. _____ pag. 20

Cuadro 1.

Iniciadores utilizados para la amplificación de los loci HLA-clase II _____ pag. 33

CUADRO 2.

Condiciones usadas para la amplificación de los genes HLA-DQ _____ pag. 33

Cuadro 3.

Sondas Recomendadas Por El XII Taller Internacional De Histocompatibilidad
Para La Tipificación De Los Genes Clase II _____ pag. 34

Figura 3.

Presentación clínica de verrugas cutáneas _____ pag. 37

Cuadro 4.

Distribución de Alelos HLA-DQA1 y DQB1 en pacientes con verrugas
cutáneas y en controles _____ pag. 39

Cuadro 5.

Distribución de haplotipos _____ pag. 40

Cuadro 6.

Alelos y haplotipos que contribuyen en la susceptibilidad a desarrollar
verrugas planas _____ pag. 41

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus causante de verrugas en diferentes sitios de la piel y mucosas. En los últimos años se han llevado a cabo estudios que hablan acerca del papel que juega el complejo HLA (Human Leukocyte Antigens) en la protección contra este patógeno, sugiriendo que el locus relevante en la infección por este virus se localiza en la región HLA-DQ. El objetivo de este estudio fue identificar las frecuencias alélicas de los genes HLA-DQA1 y -DQB1 en pacientes mexicanos con verrugas cutáneas y compararlas con individuos sanos. Se reclutaron 32 pacientes con diagnóstico clínico de verrugas en piel, sin otra enfermedad concomitante y 314 controles aparentemente sanos. Para la tipificación molecular de los alelos, se amplificó el segundo exón de los loci HLA-DQA1 y -DQB1 y se utilizó el método de dot-blot e hibridación con sondas específicas de secuencia (SSO). Los resultados indican que la región HLA-DQ es relevante para el desarrollo de la enfermedad, encontrándose una asociación significativa con los alelos DQA1*030101 ($p=0.005$; $pc=0.03$) y DQB1*0302 ($p=0.004$; $pc=0.03$) y con el haplotipo DQA1*030101-DQB1*0302 ($p=0.004$). La Razón de Momios fue similar en las tres asociaciones, indicando que los individuos que presentan estos alelos o el haplotipo tienen 3 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad, que los que no los presentan. La fracción etiológica indica una contribución de más del 50% de estos genes con la enfermedad. La asociación del DQA1*030101 también se describió en alemanes, lo que sugiere que DQA1 es el principal gen de susceptibilidad en infecciones de piel por VPH.

Abstract

The human papilloma virus (HPV) is a virus responsible for warts in different parts of the skin and mucosa. In recent years there have been studies that talk about the role the Human Leucocyte Antigen (HLA) system plays in the protection against this pathogen, suggesting that the main loci for this disease is located in the HLA- DQ region. The main objective of this study is to identify the allele frequencies of HLA-DQA1 and DQB1 in the Mexican population with common warts and compare it to healthy individuals. Thirty two patients with the diagnosis of common warts and no systemic disease were recruited and compared with 314 healthy individuals. For the molecular typing of the alleles the second exon of the loci HLA-DQA1 and HLA-DQB1 were amplified using a dot-blot method and hybridization of sequence specific probes. The results obtained indicate that the HLA-DQ region is relevant for the development of the disease, having a significant association with DQA1*030101 ($p=0.005$; $pc=0.03$) and DQB1*0302 ($p=0.004$; $pc=0.03$) alleles and DQA1*030101-DQB1*0302 ($p=0.004$) haplotype. Odds ratio was similar in the three associations, indicating that the individuals with these alleles and haplotype have three times greater risk of developing the disease than the people who do not present them. Etiologic fraction indicates a contribution higher than 50% of these genes to the disease. The association of DQA1*030101 was also described in Germans, suggesting that DQA1 is the main gene of susceptibility in skin infections due to HPV.

1. INTRODUCCION

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus DNA de doble cadena capaz de provocar infecciones en piel y en mucosas. En piel es causante de verrugas que clínicamente pueden ser clasificadas según su morfología y localización en vulgares, planas o plantares.

El sistema de HLA juega un papel crítico en la defensa del organismo contra este agente patógeno. En el caso de las verrugas cutáneas, varios estudios han revelado que la susceptibilidad genética está localizada en los alelos del HLA clase II. En lo que corresponde a México, existen dos estudios en los cuales se identificaron las frecuencias alélicas de HLA-DR en pacientes con verrugas cutáneas y enfermedad de Heck. Por otro lado, se ha reportado que existe una asociación entre algunos alelos del HLA-DQA1 y -DQB1 con verrugas cutáneas inducidas por el VPH, lo que permite pensar que la presencia elevada de estos alelos aumenta el riesgo de adquirir esta infección, pero esta susceptibilidad genética en la población mexicana no ha sido aun explorada, por lo que sería importante determinar si existe alguna asociación del HLA-DQA1 y -DQB1 con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. La realización de este trabajo nos permitirá conocer cuales son los alelos y haplotipos más importantes en esta infección y si esta asociación coincide con la reportada en otras poblaciones con características similares a la nuestra.

2. ANTECEDENTES

Las verrugas cutáneas son proliferaciones benignas de la piel y mucosas que resultan de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), se consideran tumores epidérmicos benignos y aunque su presentación en la población general es muy frecuente su transmisión es limitada. El curso clínico de la infección se caracteriza por lesiones de superficie anfractuosa poco elevadas, se clasifican de acuerdo a su morfología y localización en: planas, vulgares, plantares o acuminadas. Los subtipos del VPH correlacionan con el tipo de verruga; por ejemplo, los subtipos de 2 y 4 lo hacen con verrugas vulgares, el 1 y 2 con verrugas planas, el 3 y 10 con verrugas plantares y el 75 y 77 lo hacen con pacientes inmunosuprimidos con transplante renal (1). Es una de las 10 dermatosis más frecuentes en México, en el Hospital General de México se encuentra entre las cinco primeras enfermedades de la piel en 10,000 consultas pediátricas (2). En el Departamento de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" se observa una prevalencia del 3.6% anual (no publicado), similar a lo reportado en San Francisco donde varía del 35% a 5% (3). En Alemania la prevalencia en la población escolar es del 7.2% y en Estados Unidos se encuentra una incidencia del 10% con predominio en niños y adultos jóvenes, misma que disminuye notablemente durante la vejez (4). Con respecto a la relación hombre-mujer lo reportado va de 0.8 a 0.9 (5,6).

El contagio del VPH probablemente depende de diversos factores, donde se incluye la localización de la lesión, cantidad del virus, grado y naturaleza del contacto, principalmente el estado inmunológico específico en contra del VPH del individuo expuesto. Los Pacientes con deficiencia de la inmunidad mediada por células (CMI) son particularmente susceptibles a la infección por el VPH, como los pacientes transplantados renales o pacientes con terapia inmunosupresora. La fuente o reservorio del VPH son individuos con lesiones clínicas o subclínicas, así como la presencia del virus en el medio ambiente. La evolución y la respuesta al tratamiento es variable en cada individuo, en algunos casos las lesiones son autolimitadas, otros pacientes responden adecuadamente al tratamiento y algunos más son refractarios al tratamiento, siendo esta última situación más difícil en pacientes inmunosuprimidos.

Características biológicas del VPH.

El VPH es un virus de doble cadena de DNA, que se encuentra en los humanos y en otras especies, es altamente específico de cada huésped. Cada genoma se compone aproximadamente 8000 pares de bases de nucleótidos, este genoma codifica sólo ocho o nueve proteínas, que se han separado históricamente en dos grupos, el "E" de early y el "L" de "late". Las proteínas E principalmente participa en la replicación del DNA viral, regulando la expresión genética, se expresa antes de la proteína L y no se incorpora a las partículas virales infecciosas. Las proteínas L1 y L2 codifican proteínas estructurales que forman las proteínas de la cápside.

Patogénesis de la infección por VPH en piel

Sobre la patogénesis de la enfermedad, se puede decir que el mecanismo de inoculación es favorecido por una epidermis dañada, pero hay evidencia de que existen células receptoras para el VPH, como las integrinas tipo $\alpha\beta_4$, que son las moléculas de adhesión encontradas en la superficie de queratinocitos basales. Cuando estas células basales se dividen, el genoma viral también se replica y es transportado dentro de las células hijas que migran hacia la superficie del epitelio (7). La transcripción del RNA viral permanece lenta hasta llegar justo antes de la capa granular, entonces comienza la replicación del DNA, resultando en cientos de copias de DNA viral por célula. Las proteínas de la cápside (L1 y L2) son sintetizadas y ensambladas en viriones en el núcleo de la célula. Las Proteínas virales llamadas E1-E4, producidas por la unión de RNA de los genes E1 y E4, pueden inducir colapso de los filamentos de queratina citoplasmática y se postula que este hecho facilita la liberación de viriones desde el citoesqueleto de la célula hacia otros sitios o hacia el medio ambiente. Por otro lado, también son muy importantes las proteínas E5, E6 y E7, las cuales se relacionan con la facilidad que tiene el virus para alterar la proliferación celular.

El papel de la susceptibilidad genética para desarrollar la infección causada por el VPH aun no está completamente establecido, así como tampoco el mecanismo de la respuesta inmunológica para eliminar la infección. Se

piensa que la inmunidad innata puede contribuir en la resistencia a la infección, pero la mayor parte de la evidencia sugiere que la inmunidad adquirida juega un papel significativo en la regresión de las lesiones, dado que los individuos con deficiencia en la CMI son particularmente susceptibles y es notoria la resistencia al tratamiento. En un estudio realizado en Londres por Coleman y cols.(8) en verrugas genitales, se muestra cómo las lesiones con regresión espontánea muestran una respuesta inmune celular activa ya que contienen más cantidad de linfocitos T activados CD4+ y CD8+ en el estroma y en el epitelio superficial, además de una marcada expresión en CD 25 y HLA DR, este último junto con el ICAM-1 se encuentran ampliamente distribuidos en los queratinocitos de las células epiteliales escamosas de las verrugas en regresión (8). Algo similar se ha observado en pacientes con verrugas planas que se presentan en regresión espontánea, pues en estas lesiones se observa un infiltrado celular mononuclear; además de la evidencia en algunos casos, que cuando se da tratamiento una o varias verrugas, esto lleva a la resolución completa de todas las lesiones en pacientes inmunocompetentes (9).

La manera en que responden los linfocitos T a la presentación antigénica aun no está muy clara, las células de Langerhans son las principales presentadoras de antígeno a los linfocitos T en la superficie del epitelio. En las infecciones por VPH éstas células se encuentran disminuidas y tienen alteraciones morfológicas (10), en el estudio de Coleman el número de células de Langerhans (CD1a+) intraepitelial no fue estadísticamente

diferente en verrugas con regresión y no regresión espontánea, aunque si mostraron en ambos casos anomalías en su morfología (8).

Por último, se observa un descenso en la frecuencia de presentación de las verrugas virales en piel con la edad (4), lo que sugiere que con el tiempo se desarrolla resistencia a la infección, inclinando la balanza a la inmunidad adquirida en la fisiopatología de la eliminación del virus.

Polimorfismo de los genes del complejo principal de histocompatibilidad.

El MHC en el humano se conoce como Complejo HLA (del inglés: Human Leucocyte Antigens). Se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca aproximadamente 4,000 Kb (Fig. 1). Se han descrito alrededor de 50 genes HLA. Este complejo genético induce y regula a la respuesta inmunológica y discrimina lo propio de lo extraño (11, 12). Incluye regiones que codifican para los bien conocidos antígenos de superficie HLA-clase I y -clase II que presentan antígenos a las células T CD8+ y CD4+, respectivamente. Entre las regiones de clase I y clase II del MHC del humano está la región de clase III que incluye genes para algunos de los componentes del sistema del complemento (13, 14). Centromérico a la región de clase I se localiza la región de clase IV donde se encuentran genes que codifican proteínas involucradas en la inflamación, como son los genes de la familia del factor de necrosis tumoral TNF (TNF- α , LTA y LTB), así como a los genes B144 (D6S49E), 1C7 (D6S2570E), AIL-1, I κ B-like (NFKBIL1) y SKI2W (15, 16).

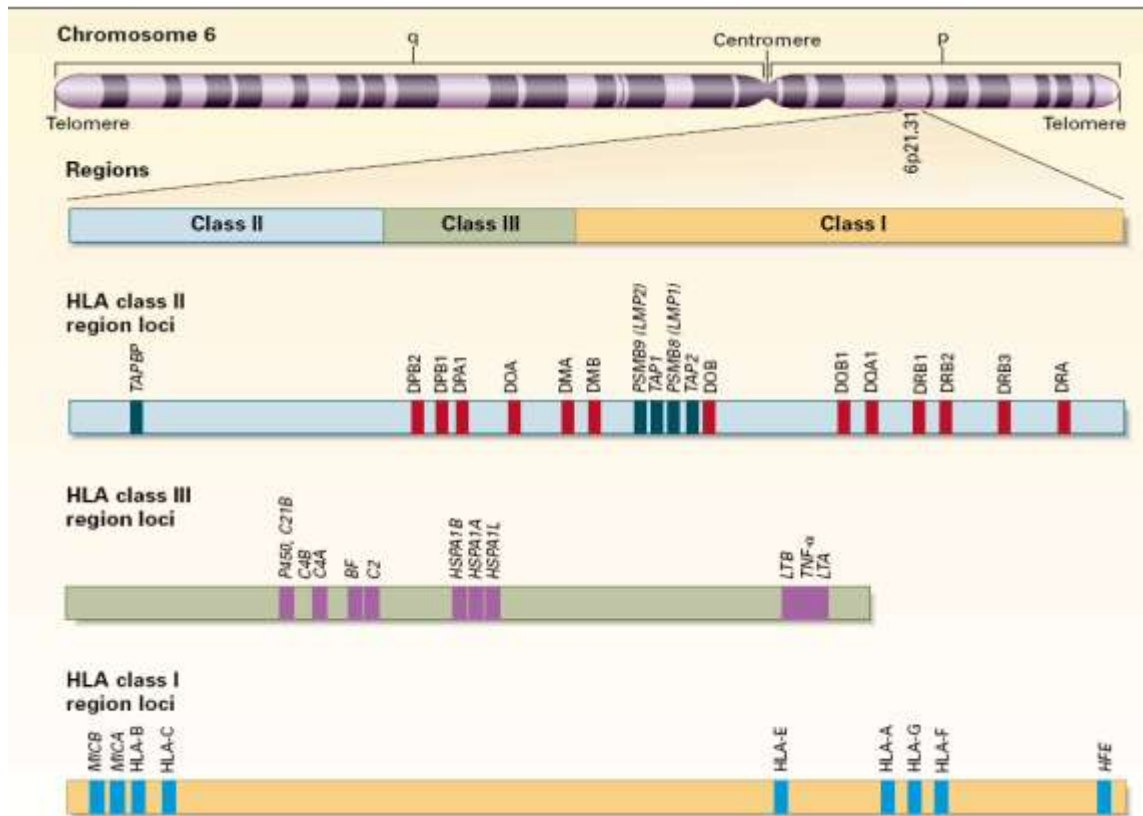


Figura 1. Localización y organización del Complejo de HLA en el Cromosoma 6

Los antígenos HLA clase II están formados por dos cadenas de glicoproteínas unidas por enlaces no covalentes, ligadas a la cadena por una porción intracelular. A estas cadenas se les llama α y β , cada una de las cadenas consta de tres regiones: una región extracelular, un segmento transmembrana y una porción intracitoplasmática. Ambas cadenas tienen dos dominios extracelulares, cada uno denominado $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ respectivamente (17) (Fig. 2).

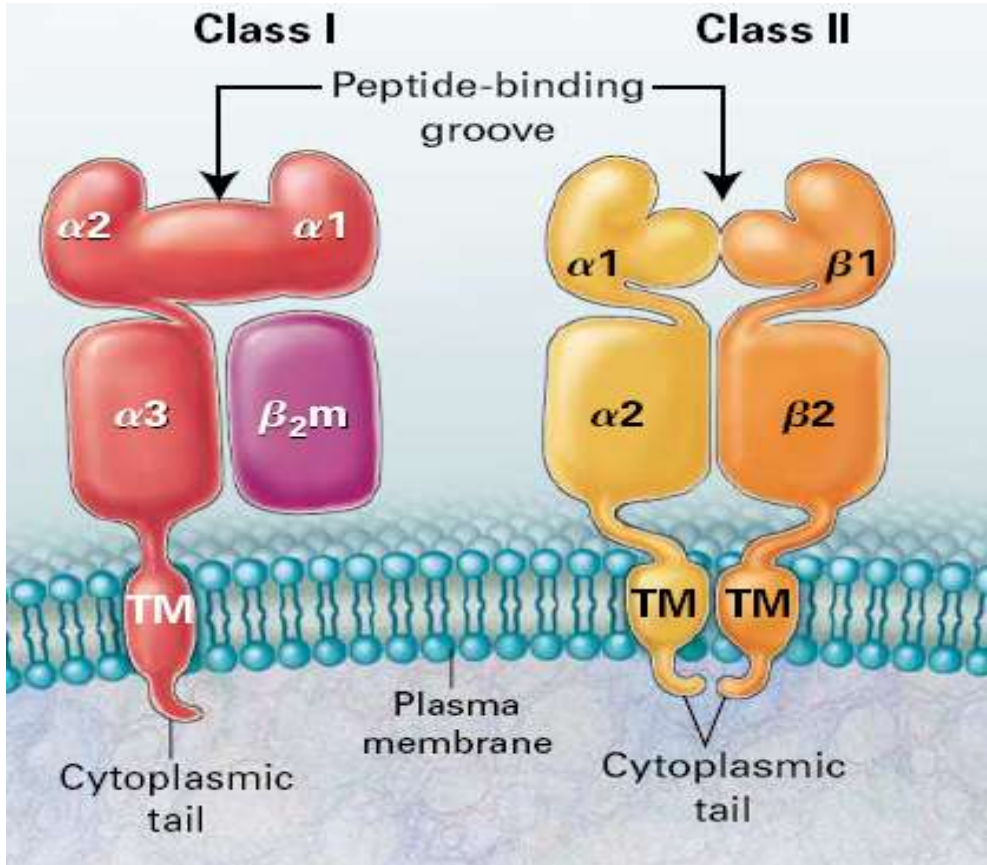


Figura 2. Estructura de las moléculas del HLA clase I y II.

En cuanto al locus HLA DR, la cadena β es extremadamente polimórfica y la cadena α es constante; las moléculas HLA DP y DQ en ambas cadenas presentan polimorfismo, donde la cadena β es más polimórfica que la cadena α .

La función del producto de los genes clase II es la presentación de péptidos derivados de antígenos exógenos. Los linfocitos T reconocen un antígeno sólo cuando éste es presentado unido a una molécula del MHC en la superficie de una célula presentadora de antígeno, en general las moléculas

de clase I unen péptidos de proteínas intracelulares y las de clase II presentan péptidos de proteínas extracelulares, aunque las moléculas de clase I y II también puede presentar antígenos extracelulares e intracelulares (17). En conclusión los posibles mecanismos de asociación entre el MHC y la presencia de enfermedades se pueden resumir de la siguiente manera: alteración molecular de autoantígenos, similitud molecular entre antígenos propios y foráneos, moléculas del MHC como receptores para agentes patógenos, alteraciones del repertorio de las células T adultas, expresión inapropiada de moléculas del MHC, interacción del MHC con moléculas coestimuladoras, y genes alterados de la región central del MHC (complemento, proteínas de choque térmico, TNF, etc).

Marco de Referencia

Entre los primeros estudios que relacionan el HLA y la infección por VPH se encuentra uno realizado en conejos donde se observa que la regresión de las lesiones inducidas por VPH está asociado a los haplotipos MHC clase II, posteriormente en verrugas genitales Coleman reporta cómo las lesiones con regresión espontánea muestran una respuesta inmunológica celular activa y una marcada expresión de HLA DR sobre los queratinocitos de las células epiteliales escamosas (8, 10, 18).

El único estudio en verrugas en piel fue realizado en Alemania en 2004 por Spelten, donde se analizaron 71 pacientes con verrugas virales causadas por VPH 2/27/57 con una persistencia de por lo menos 18 meses, comparándolos

con 92 individuos sin verrugas o con verrugas que duraron menos de 18 meses. Se observó que la frecuencia alélica de DQA1*0301, DQB1*0301, DRB1*07 y DRB1*09 se encontraba elevada y la frecuencia alélica de DQA1*0501 y DQB1*0603, DRB1*01 y DRB1*03 estaba disminuida. Sólo se encontró diferencia significativa en DQA1*0301 y DQB1*0301, lo que sugiere que en la historia natural de las verrugas vulgares persistentes causadas por el VPH 2/27/57 puede estar modulada por los alelos de los genes HLA-DQA1 y HLA-DQB1 (5). Llama la atención que los alelos DQ también están asociados a epidermodisplasia verruciforme (19) y cáncer cérvico-uterino (Ca cu) relacionado al VPH 16 (20, 21), inclinando la evidencia a que estas moléculas probablemente tiene un papel más allá de la asociación con enfermedades causadas por la infección por el VPH.

Por otra parte, existen estudios en pacientes con otras entidades también causadas por VPH donde se afectan mucosas o la piel en forma precancerosa, que muestran la relación entre el HLA clase I/II y la infección causada por subtipos de la familia de los VPH. Un ejemplo de estas entidades es el Ca Cu asociado a VPH, papilomatosis laríngea, hiperplasia epitelial focal y epidermodisplasia verruciforme, que se describen a continuación.

En el caso de los VPH asociados Ca Cu la literatura ha mostrado asociación con los siguientes alelos del HLA: DRB1*0301- DQB1*0201 con 2 veces menor riesgo de infecciones transitorias o persistentes por el virus; con el DRB1*1102-DQB1*0301 con bajo riesgo sólo para persistencia, y por último

con DRB1*1601-DQB1*0502 y DRB1*0807-DQB1*0402 con un incremento en el riesgo 7 y 3 veces mayor, respectivamente para persistencia (21). Sin embargo, otros estudios refieren que los pacientes con Ca Cu relacionado con infección por largo tiempo de VPH-16, se asocian con los alelos DRB1*1501 y DQB1*0602, lo que indica que los alelos de clase II contribuyen a la incapacidad de combatir la infección por el VPH (22-26). En el caso de la papilomatosis laríngea, la cual se relaciona con el VPH 6 y 11, se asocia con los alelos DQB1 (*0302, *0303) y DQA1*0101/04 en afroamericanos y el alelo DQA *0102 en caucásicos (27). Otra entidad que afecta mucosa es la hiperplasia epitelial focal la cual se relaciona con el VPH 13 y 32, en un estudio realizado en 22 pacientes mexicanos se encontró asociación con el alelo DRB1*0404 y en la tipificación viral sólo se encontró la presencia del VPH-13 (28). Por último en la epidermodisplasia verruciforme que se relaciona con el VPH 5 en que se observan múltiples verrugas con riesgo de desarrollar carcinomas epidermoides, se encontró asociación con el alelo HLA-DQB1*0301 (19).

Con respecto a los alelos del HLA clase I, Friedman en 1982 comparó 100 pacientes con verrugas virales y 108 individuos aparentemente sanos, no encontrando diferencia significativa en la frecuencia de los antígenos HLA-A y B, por lo que sugiere que la posible susceptibilidad genética en verrugas no está relacionada a estos loci (29). Por otro lado, pacientes con diagnóstico de Ca Cu relacionado al VPH se asoció el HLA B7 con el 1.5 de incremento en

el riesgo de padecer lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado de malignidad.

García y colaboradores, en el 2008, (datos no publicados) realizaron un estudio en 52 pacientes mexicanos con verrugas vulgares, sin enfermedad sistémica acompañante y fue comparada con una población sana del estudio de Barquera y cols. (30). En el se encontró una elevada asociación con HLA-DR4 y DR3 y en el se propone investigar la asociación de verrugas cutáneas con otros loci vecinos como el HLA-DQA1 y DQB1.

3. JUSTIFICACION

Existen pocos estudios que relacionan la participación del MHC y el desarrollo de las verrugas cutáneas, además ninguno se ha llevado a cabo en la población mexicana. La realización de este estudio nos permitió identificar la existencia de susceptibilidad genética en el desarrollo de la infección, así como determinar la participación de los genes HLA-DQA1 y -DQB1 en la fisiopatología de la enfermedad, para poder de esta manera profundizar en el campo del tratamiento, ya que algunas presentaciones son refractarias. En este protocolo sólo se estudiaron los loci HLA-DQA1 y -DQB1, ya que en el estudio de Spelten (5) se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de verrugas cutáneas y los alelos DQA1*0301 y DQB1*0301.

4. HIPOTESIS

Si en la patogénesis de las verrugas virales participan factores genéticos que involucren a los alelos del HLA-DQ, entonces nuestros pacientes presentaran frecuencias alélicas diferentes a las del grupo control.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

Identificar las frecuencias alélicas de los genes HLA-DQA1 y -DQB1 en pacientes con verrugas cutáneas y compararlas con individuos sanos.

5.2 Objetivos particulares.

1. Analizar un grupo de pacientes con diagnóstico clínico de verrugas cutáneas por VPH
2. Explorar la presencia de genes de susceptibilidad y/o protección en los loci HLA-DQA1 y -DQB1 en pacientes con verrugas cutáneas y compararla con sujetos aparentemente sanos de una población abierta.
3. Calcular las frecuencias alélicas para cada alelo, en los loci HLA-DQA1 y DQB1 estudiados, en los enfermos y en los sanos. Comparar las frecuencias en ambos grupos y evaluar la significancia estadística de las comparaciones.
4. Obtener la razón de Momios y la fracción etiológica si se encuentra un alelo significativamente aumentado en los enfermos, para conocer el riesgo de desarrollar verrugas cutáneas.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Tipo de Estudio

Casos y controles, no pareado, abierto, observacional, prospectivo y transversal.

6.2. Ubicación Temporal y Espacial

Entre el período comprendido del 1 de marzo del 2008 al 1 de Junio del 2009, se eligieron todos los casos que asistieran de forma espontánea a la consulta externa de dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" con diagnóstico clínico de verrugas cutáneas virales y sin ninguna enfermedad sistémica conocida. Para la tipificación del HLA-DQA1 y HLA-DQB1 se contó además con la participación del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del hospital.

6.3. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión.

Casos:

- Pacientes con diagnóstico clínico e histológico de verruga viral en piel, en cualquier sitio.
- Pacientes sin enfermedades concomitantes sistémicas o dermatológicas.
- Mexicanos de por lo menos dos generaciones nacidos en México
- Cualquier sexo y cualquier edad.

- Pacientes que firmen la carta de consentimiento informado

Controles:

- Individuos aparentemente sanos, de población abierta. Se estudiaron 314 controles, todos mexicanos, no relacionados y sin antecedentes de enfermedad sistémica.

Criterios de exclusión.

Casos:

- Pacientes que padezcan enfermedades inmunosupresoras como: SIDA u otros estados que lleven a inmunosupresión, enfermedades crónicas degenerativas, y otras enfermedades dermatológicas con o sin involucro sistémico, etc.
- Pacientes embarazadas
- Pacientes que no acepten entrar al estudio

Criterios de eliminación.

- Pacientes en los que no se logre completar el estudio por problemas técnicos en el momento de procesar las muestras

6.4. Variables

Independientes. (CAUSA)		Dependientes. (EFECTO)	
Variable	Escala	Variable	Escala
Edad	Intervalo	HLA-DQA1	Nominal
Sexo	H/M	HLA-DQB1	Nominal
Presencia de verrugas cutáneas	Si/ No		
Verrugas virales	Nominal		
	-vulgares		
	-planas		
	-plantares		

6.5. Tamaño de la Muestra.

No existe en la literatura datos sobre la frecuencia de presentación de los alelos del HLA clase II en pacientes con infecciones del VPH en piel por lo que se tomó en cuenta los datos obtenidos del estudio previo realizado por nosotros, donde se comparó a 22 pacientes con Hiperplasia Epitelial Focal (HEF) contra sujetos sanos, donde el alelo del sistema HLA que se encontró estadísticamente significativo fue el HLA-DR4, el cual tuvo una diferencia del 30% al compararlo con el grupo control 54.4% vs. 23.7% (28). Se calculó el tamaño de la muestra en programa EpiInfo Versión 6: con un nivel de confianza del 95%, potencia de la prueba 80%, relación de enfermos por no enfermos 1:1, frecuencia esperada para enfermos 54%, para no enfermos del 24%, y una con una razón de momios de 3.93, obteniendo un tamaño de

muestra de 47 pacientes. Sin embargo, sólo pudieron reclutarse 32 pacientes con verrugas cutáneas durante el período del estudio.

6.6. Métodos de Laboratorio

Una vez seleccionados los casos con verrugas virales cutáneas, se procedió a la firma de una carta de consentimiento informado (anexo 1 y 2) y llenado de un cuestionario (anexo 3) que incluía datos epidemiológicos y demográficos del paciente. Posteriormente se tomaron imágenes fotográficas de las lesiones y una muestra de 10 – 20 ml de sangre periférica con EDTA como anticoagulante para la extracción de DNA. Luego se les practicó biopsia por rasurado de las lesiones, las cuales fueron procesadas en bloques de parafina y teñidas con tinción de hematoxilina y eosina y sometidas a análisis histopatológico para la confirmación del diagnóstico.

Extracción de DNA:

Cada muestra de sangre periférica se mezcló con un volumen igual de un medio para el transporte (RPMI 1640 suplementado).

La sangre se centrifugó a 1,600 xg a 4⁰C durante 30 min, se eliminó el plasma y se obtuvo el paquete de leucocitos. Los eritrocitos se lisaron con 5 mM de MgCl₂ dos o tres veces y se centrifugaron cada vez a 1,600 xg a 4⁰C durante 15 min, hasta obtener el paquete de leucocitos libre de eritrocitos. El paquete se lisó con: 50 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.2% SDS; 300g/ml proteinasa K y se incubó durante 12 h a 53⁰C.

El DNA se extrajo dos veces con fenol equilibrado (v/v), dos con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (v/v) y dos con cloroformo alcohol isoamílico (24:1) (v/v). En cada extracción se agitó suavemente la mezcla hasta su homogeneización y se centrifugó durante 15 min a 4⁰C. El DNA se precipitó con 100 mM final de NaCl y un volumen de isopropanol. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 500 ml de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0). (31, 32)

Cuantificación del DNA:

El DNA extraído de cada sujeto se diluyó 1:100 y se leyó a 240 nm, 260 nm y 280 nm. La concentración del DNA se calculó tomando la lectura a 260 nm X la dilución X 50 (coeficiente de extinción molar del DNA). La pureza se verificó haciendo las relaciones de las lecturas a 260/240 y 260/280, que debían dar entre 1.65 y 2.0.

Amplificación del DNA:

Para cada individuo se amplificó por duplicado el segundo exón de los loci DQA1 y DQB1. Los iniciadores utilizados para las amplificaciones son los diseñados por el XII Taller Internacional de Histocompatibilidad y se enlistan en el cuadro 1. Las muestras se amplificaron en un termociclador Hybaid Express, usando 30 ciclos. Las condiciones para cada loci se describen en el cuadro 2 (33, 34).

Verificación de la amplificación:

Se tomaron 10 μ l del producto de cada amplificación y se les añadió 5 μ l de colorante para corrimiento (50% glicerol; 0.01% rojo de cresol). Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% con TAE y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, durante 40 min a 90 voltios. El gel se observó con luz UV (312 nm) y se fotodocumentó para su registro y análisis. (31, 32, 33)

Tipificación con sondas específicas de secuencia (SSOs):

Se tomaron de 180 μ l para sembrar 16 membranas de cada gen, en un formato de dot-blot. Se llevó a un volumen final de 800 μ l con agua destilada, utilizando cajas de polipropileno con formato de 96 pozos. Se cortaron membranas de nylon positivamente cargadas (Boehringer) de 12 cm X 8 cm. Para sembrar las muestras se utilizó un aparato de dot-blot (Bio-Rad). Las membranas se humedecieron en agua destilada, se acomodaron en el aparato, se colocó la parte superior y se ajustaron los tornillos. Se conectó el vacío, los pozos se lavaron con 100 μ l de TE. Se quitó el vacío y se colocaron las muestras en los pozos con una pipeta múltiple para 12 puntas. Una vez colocadas todas las muestras, se conectó el vacío y se lavaron los pozos con 100 μ l de TE. Todavía con el vacío puesto se quitó la membrana y se dejó secar sobre un papel filtro a temperatura ambiente. El DNA de las membranas se desnaturalizó con 0.4 M NaOH durante 10 min y se neutralizó con 10X SSPE durante 10 min. El DNA se fijó durante 2 h a 80°C y 3 min con luz UV (312 nm). (32, 33)

Marcaje de los SSOs.

Se colocaron 100 pmoles de cada SSO en tubos de 1.5 ml se añadió 1 nmol de ddUTP-digoxigenina, 5 mM cloruro de cobalto, amortiguador para desoxittransferasa terminal (TdT), 37 U de TdT (Boehringer) y agua destilada para un volumen final de 40 µl. La reacción se incubó a 37⁰C durante 45 min. El SSO marcado se precipitó con cloruro de litio 8 mM final y 160 µl de etanol absoluto a -20⁰C, se centrifugó a 12,000 xg a 4⁰C durante 60 min. Una vez precipitado, se lavó con 100 µl de etanol al 80% y se centrifugó a 12,000 xg a 4⁰C durante 30 min. Se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de TE (1pmol/ ml). En el cuadro 3 se muestran las sondas que se emplearon para la tipificación. (31,33)

Prehibridación e hibridación de las membranas.

Cada membrana se colocó en un tubo de polipropileno de 15 ml, se añadieron 10 ml de la mezcla de prehibridación y se incubaron durante 12 h a 42⁰C. Se eliminaron 5 ml de la solución y se añadieron 20 picomoles del SSO marcado con ddUTP-digoxigenina. Las membranas se incubaron durante 12 h a 42⁰C.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de los loci HLA-clase II

Nombre	Codones Exón 2	Secuencia	Tamaño de la Banda
<i>DQA1</i>			
2DQAAMP-A	11-18	AT GGT GTA AAC TTG TAC CAG T	229 bp
2DQAAMP-B	80-87	TT GGT AGC AGC GGT AGA GTT G	
<i>DQB1</i>			
2DQBAMP-A	13-20	C ATG TGC TAC TTC ACC AAC GG	214 bp
2DQBAMP-B	78-84	CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC	

Tomado del XII Taller Internacional de Histocompatibilidad (33).

Cuadro 2. Condiciones usadas para la amplificación de los genes HLA DQ

Gen	Desnaturalización	Alineación	Extensión	MgCl₂ Final
DQA1	96°C/ 1 min	56°C/ 1 min	72°C/ 1 min	1.5 mM
DQB1	96°C/ 1 min	56°C/ 1 min	72°C/ 1 min	1.5 mM

Tomado del XII Taller Internacional de Histocompatibilidad (33).

Cuadro 3. Sondas empleadas en la tipificación del gen DQA1 (33)

No. de sonda	Tm⁰C	Alelo(s)
2501	56	*0101,0102,0104,0401,05011,05012,05013,0502
2502	56	*0102,0103,0601
2503	56	*03011,03012,0302
3401	56	*0101,0104
3402	56	*102,0103,05011,05012,05013,0502,
3403	58	*0401,0601
5501W	50	*0101,0102,0103,0104
5502	50	*0201
5503	50	*03011,03012,0302
5504	46	*0401,0601,05011,05012,05013,0502
6901	54	*0101,0102,0103,0104
6902	50	*0201,03011,03012
6903	50	*03012,05011,05012,05013,0502
6904	52	*0401,0601
7502	48	*0201,0401,0601
7504	48	*05011,05012,05013,0502

Sondas utilizadas para la tipificación del gen DQB1

No. de Sonda	Tm⁰C	Alelo (s)
2301	64	*0401
2302	66	*0402,03031,0305
2601	60	*0501,0502,05031,05032
2602	52	*0301,0304,06011,06012
2603	54	*0302,03031,03032,0602
2604	54	*0603,0604,0607,0608
4501	62	*0301,0304
4901	62	*0501
5701	60	*0501,0604,06051,0606,0608,0609
5702	62	*0502,0504
5703	62	*05031,06011,06012
5704	60	*05032,0602,0603,0607
5705	64	*0201,0202
5706	64	*0301, 03031, 03032
5707	68	*0302, 0304, 0305
5708	64	*0401,0402
7005	62	*0201, 0202

Quimioluminiscencia.

Las membranas se lavaron dos veces con 2X SSPE, 1% SDS a temperatura ambiente durante 10 min, dos veces a la T_m de cada SSO ($T_m = 2(A+T)+4(G+C)$) con 6X SSPE, 1% SDS durante 15 min. Posteriormente se lavaron con AMORTIGUADOR 1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.3% Tween 20) dos veces durante 5 min a temperatura ambiente. Se incubaron con reactivo bloqueador (Boehringer) (AMORTIGUADOR 2) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se incubaron con Fab anti-digoxigenina (Boehringer) 1:10,000 en AMORTIGUADOR 2 durante 60 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con amortiguador 1, se incubaron 5 min a temperatura ambiente con AMORTIGUADOR 3 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$). Finalmente se incubaron 5 min a temperatura ambiente con CSPD (Boehringer) diluido 1:500 en amortiguador 3. Se quitó el exceso de CSPD de las membranas y se colocaron en bolsas de plástico transparente, se sellaron con calor, se incubaron a 37°C durante 15 min y se expusieron en placas de rayos X durante 15 min. Se llevaron a cabo varias exposiciones para el análisis correcto de los resultados (5 min, 8, min, 15 min.). (33)

6.7. Análisis Estadístico

Se calcularon las frecuencias alélicas (FA) por conteo directo. Se compararon las FA entre los pacientes y los controles. Para probar asociaciones significativas entre los alelos y la enfermedad se utilizó la

prueba de X^2 con la corrección de Yates, o la prueba exacta de Fisher, considerando $p < 0.05$ como el mínimo nivel de significancia, además de la corrección de Bonferonni para pruebas múltiples cuando el valor de p fue significativo, multiplicando la p por el número de alelos detectados en cada locus y por el número de comparaciones (p_c). El resultado se consideró significativo con $p_c < 0.05$. Se calculó la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95% mediante la aprobación de Cornfield. En el caso de asociación de alelos particulares se calculó la frecuencia etiológica (FE) fracción preventiva (FP). (35)

7. Resultados

En este estudio se participaron 32 pacientes de los cuales 19 fueron hombres y 17 mujeres con una relación de 1.46 entre ambos sexos. La edad de los pacientes osciló entre los 6 años hasta los 66 años, con una media de 23 años. En el 50% de los casos se encontró un antecedente familiar positivo. El tiempo de evolución de la enfermedad al momento de la captación de los casos fue variable desde los 2 meses a 8 años (promedio de 25 meses). La presentación clínica más frecuente fue la verruga vulgar en 31 pacientes, 5 presentaron la forma plana únicamente y ninguno presentó la forma plantar. En 3 casos coexistieron 2 tipos de lesiones, vulgar y plana (figura 3). De todos los casos el 40.6% refirió haber presentado cuadros previos de verrugas en piel mientras que 59% negaron episodios anteriores. El 50% de estos pacientes no recibieron tratamientos previos.

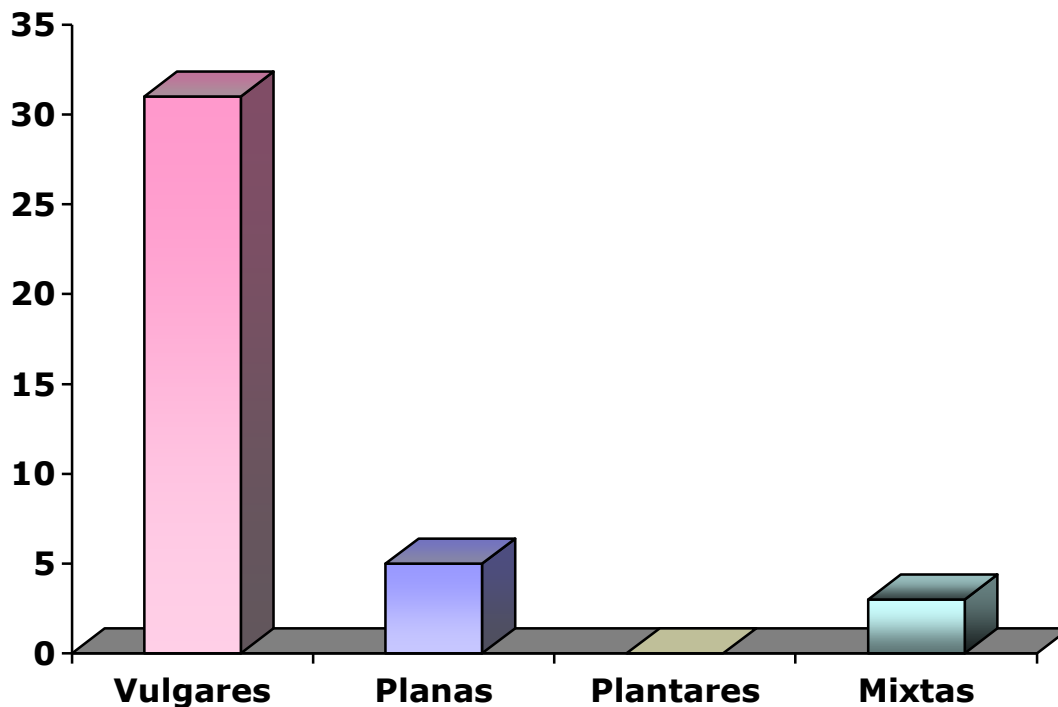


Figura 3. Presentación clínica de verrugas cutáneas

En el cuadro 4 se muestran las frecuencias alélicas de los genes DQA1 y DQB1 encontradas en el estudio y obtenidas de los 32 pacientes con verrugas cutáneas comparadas con los 314 controles. En el gen DQA1 los alelos más frecuentes fueron el *030101, *0401 y *0501, mientras que para el DQB1 el *0302, *0402 y *030101 fueron los más encontrados. De todos los alélos encontrados el DQA1 *030101 y el DQB1 *0302 resultaron ser los que se asocian con mayor frecuencia a la presencia de VPH en piel, con una frecuencia alélica de 42.19% y 26.7% respectivamente.

En el cuadro 5 se observan los distintos haplotipos encontrados mostrándose en mayor número los de DQA1*030101-DQB1*0302 seguido por

DQA1*0401-DQB1*0402 con frecuencias alélicas de 39.1% y 31.3% respectivamente. En el cuadro 6 se ven los alelos y haplotipos que mostraron mayor asociación con los pacientes con verrugas cutáneas presentando una RM=3.2, siendo esto estadísticamente significativo con una $p=0.004$.

Cuadro 4. Distribución de alelos HLA-DQA1 y DQB1 en pacientes con verrugas cutaneas y en controles

ALELO	PACIENTES N=32	FA (%)	CONTROLES N=314	FA (%)
DQA1				
*0101/4	4	6.25	57	9.55
*0102	3	4.69	46	7.48
*0103	0	0.00	15	2.39
*0201	2	3.13	27	4.30
*030101	25	42.19	159	30.57
*0401	18	31.25	104	17.99
*0501	8	12.50	145	27.71
DQB1				
*0201	2	9.6	55	9.39
*0301	10	24.0	136	25.48
*0302	25	26.7	147	27.39
*0303	0	0.9	3	0.48
*0402	18	14.8	103	17.99
*0501	4	7.7	47	7.96
*0502	0	1.4	5	0.8
*0503	0	1.1	9	1.43
*0504	0	0.3	1	0.16
*0601	1	7.7	6	0.96
*0602	2	2.3	32	5.1
*0603	0	1.1	11	1.75
*0604	0	0.3	6	0.96
*0609	0	0.3	1	0.16

FA= Frecuencia alélica

Cuadro 5. Distribución de haplotipos

Haplotipo	Pacientes		Controles	
	N=32	FH%	N=314	FH%
*0101/4-*0501	2	3.1	46	7.8
*0101/4-*0502	0	0.0	1	0.2
*0101/4-*0503	0	0.0	8	1.3
*0101/4-*0601	1	1.6	1	0.2
*0101/4-*0603	0	0.0	1	0.2
*0102-*0201	0	0.0	1	0.2
*0102-*0501	1	1.6	1	0.2
*0102-*0502	0	0.0	4	0.6
*0102-*0504	0	0.0	1	0.2
*0102-*0601	0	0.0	3	0.5
*0102-*0602	2	3.1	30	4.8
*0102-*0604	0	0.0	6	1.0
*0102-*0609	0	0.0	1	0.2
*0103-*0503	0	0.0	1	0.2
*0103-*0601	0	0.0	2	0.3
*0103-*0602	0	0.0	2	0.3
*0103-*0603	0	0.0	10	1.6
*0201-*0201	1	1.6	23	3.7
*0201-*0301	0	0.0	1	0.2
*0201-*0302	1	1.6	0	0.0
*0201-*0303	0	0.0	3	0.5
*030101-*0201	0	0.0	5	0.8
*030101-*0301	3	4.7	13	2.1
*030101-*0302	24	39.1	148	27.6
*030101-*0402	0	0.0	1	0.2
*0401-*0301	0	0.0	1	0.2
*0401-*0402	18	31.3	103	17.8
*0501-*0201	1	1.6	28	4.8
*0501-*0301	7	10.9	121	22.9

FH = Frecuencia haplotípica

Cuadro 6. Alelos y haplotipos que contribuyen en la susceptibilidad a desarrollar verrugas planas

Alelo	X²Y	p	p_c	RM (95% IC)	FE
DQA*03011	7.7	0.005	0.03	3.3 (1.4-7.9)	0.54
DQB1*0302	8.1	0.004	0.03	3.3 (1.4-7.5)	0.52
Haplotipo					
DQA1*030101-DQB1*0302	7.9	0.004	---	3.2 (1.4-7.4)	0.52

RM= Razón de Momios; FE= Fracción etiológica; p= probabilidad; p_c= probabilidad corregida

8. DISCUSION

Los datos demográficos de este trabajo muestran que la forma clínica más común de presentación de las verrugas es la vulgar en un 87.5% de los casos, su edad de inicio oscila entre los 6 a 66 años, con un tiempo de evolución variable de 2 meses a 8 años. Al momento de la realización del estudio 13 pacientes (40.63%) ya habían tenido por lo menos un episodio previo de verrugas cutáneas. Mientras que el 50% manifestó tener un familiar en primer grado con antecedente de haber tenido verrugas en piel. Los hallazgos ya mencionados son semejantes a los encontrados en otros reportes previamente consignados (1-6).

En lo que respecta a la susceptibilidad genética que puede mostrar un individuo con verrugas cutáneas por VPH, existe un estudio publicado por Spelten y colaboradores (5) en una población alemana con la enfermedad,

en la cual se encontró predominio del HLA-DQA1*030101 compatible con el resultado obtenido en nuestra población mexicana con verrugas cutáneas. Así mismo ese estudio reporta asociación con HLA-DQB1*030101, dato que difiere con lo encontrado en este estudio donde la mayor asociación del gen DQB1 fue con HLA-DQB1*0302. Estos datos nos llevan a pensar que en el locus DQB1 las dos poblaciones difieren por su etnicidad, pero que comparten el locus DQA1*030101 lo que confirma que este es el alelo que brinda la mayor susceptibilidad a la infección por VPH.

En esta población encontramos que el haplotipo mas frecuente fue DQA1*030101-DQB1*0302 diferente al reportado en el estudio de Spelten donde el más frecuente fue DQA1*0501-DQB1*030101. Estas diferencias en haplotipos pueden ser debidas a diferentes mecanismos de acción del agente infeccioso, VPH, sobre la piel (5,6).

Es importante señalar que tanto los alelos como los haplotipos que presentaron mayor asociación registraron una RM: 3.3 y 3.2 respectivamente, indicando que su presencia aumenta 3 veces el riesgo de padecer verrugas cutáneas por VPH que la población general.

La fracción etiológica de estos alelos y haplotipos sugiere que estos están contribuyendo en más del 50% a la presencia de infección por VPH y podrían estar actuando como detonadores de la enfermedad.

Es además importante mencionar que el alelo DQA1*030101 está siempre en desequilibrio de enlace con el gen HLA-DR4, por lo que en esta serie de casos esperaríamos encontrar que 25 pacientes tengan dicha asociación con

HLA-DR4. En el HLA-DQB1 este desequilibrio no siempre se ve presente, por lo que la búsqueda de otros alelos de HLA-DR en estos pacientes nos ampliaría el conocimiento de la susceptibilidad a esta infección en particular. Es por eso que sugerimos la realización de otros estudios a lo largo de esta línea de investigación (36).

9. CONCLUSIONES

1.- En este trabajo se pudo comprobar que sí existe asociación entre los pacientes con verrugas cutáneas y los alelos HLA-DQA1*30101 y DQB1*0302.

2.- La frecuencia elevada del alelo HLA-DQA1*30101 en distintas poblaciones con infección por VPH confirma que este es el alelo de susceptibilidad para VPH.

3.- La elevada prevalencia de HLA-DQB1*030101 en la población mexicana con verrugas vulgares fue distinta a la reportada en otras poblaciones con infecciones de piel por VPH.

4.- El Haplotipo registrado con mayor frecuencia fue el DQA1*030101-DQB1*030101, diferente al encontrado en estudios previos de verrugas cutáneas

10. PERSPECTIVAS

Estudiar en esta misma población si existe susceptibilidad genética con otros HLA-DR aparte del DR4 y tipificar el VPH por medio de los bloques de parafina ya existentes.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1.- De Villiers E-M. Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol* 1997;15:199-206.
- 2.- Magaña GM, Vázquez R, González LN. Dermatología pediátrica en el Hospital General. Frecuencia de las enfermedades de la piel del niño en 10,000 consulta; 1990-1994. *Rev Med Hosp Gen Mex* 1995;58(3):124-130.
- 3.- Beutner KR, Becker TM, Stone KM. Epidemiology of human papillomavirus infections. *Dermatol Clin* 1991Apr;9(2):211-218.
- 4.- Laurent R, Kienzler JL. Epidemiology of HPV infections. *Clin Dermatol* 1985; 3:64-70.
- 5.- Spelten B, Grussendorf-Conen EI, Rübben A. Human leukocyte antigen class II alleles and natural history of HPV 2/27/57-induced common warts. *Arch Dermatol Res* 2004;296:105-111.
- 6.- Rübben A, Kalka K, Spelten B, Grussendorf-Conen EI. Clinical Features and age distribution of patients with HPV 2/27/57-induced common warts. *Arch Dermatol Res* 1997;289: 337-340.
- 7.- Evander M et al. Identificación of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997;71:2449-2456.
- 8.- Coleman N, Birley HD, Renton AM, et. al. Immunological Events in Regressing Genital Warts. *Am J Clin Pathol* 1994 Dec;102(6):768-774.
- 9.- Rogozindki TT et al. Role of cell-mediated immunity in spontaneous regresión of plane wart. *Int. J Dermatol* 1988;27:322-326.

- 10.- Viac J, Chardonnet Y, Chignol MC, Schmitt D. Papilloma viruses, warts, carcinoma and Langerhans cells. *In Vivo* 1993 May-Jun;7(3):207-212.
- 11.- Mizuky N, Inoko H, Ohno S. 1994. Role of HLA and T lymphocytes in the immune response. *Ocular Immunol Inflammat* 2:57-91.
- 12.- So A. 1994. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. Lechler, R. HLA and Disease. Academic Press. Great Britain, pp 1-34.
- 13.- Aguado B, Milner CM, Campbell RD. 1996. Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode. HLA and MHC: Genes, Molecules, and Function. Browning M, McMichael A (eds). Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers, p 39.
- 14.- Klein J. 1986. The Natural History of the Major Histocompatibility Complex. New York, Wiley.
- 15.- Gren JR, Weissman SM. 1997. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 90:4252-4265
- Brodsky F, Lem L, Bresnahan P. 1996. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 47:464-471.
- 16.- Peelman LJ, Chardon P, Vaiman M, Mattheeuws M, Van Zeveren A, Van de Weghe A, Bouquet Y, Campbell RD. 1996. A detailed physical map of the porcine major histocompatibility complex (MHC) class III region: comparison with human and mouse MHC class III regions. *Mamm Genome* 7:363-367.

- 17.- Rhodes DA, Trowsdal J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Reviews in Immunogenetic* 1999; 1: 21-31.
- 18.- Han R, Breitburd F, Marche PN, Orth G. Linkage of regression and malignant conversion of rabbit papillomas to MHC class II genes. *Nature* 1992; 356: 66-68.
- 19.- Barzegar C, Paul C, Saiag P, Cassenot P, Bachelez H, Autran B, et. al. Epidermodysplasia verruciformis-like eruption complicating human immunodeficiency virus infection. *Br J Dermatol* 1998 Jul;139(1):122-127.
- 20.- Lie AK, Skarsvag S, Haugen OA, et. al. Association between the HLA DQB1*0301 gene and human papillomavirus infection in high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1999 Jul;18(3):206-210.
- 21.- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, Villa LL. Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2002 Jul15;186(2):164-172.
- 22.- Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. *Int J Cancer* 2001 Sep15;93(6):817-822.
- 23.- Cuzick J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan I. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British woman. *Br J Cancer* 2000 Apr;82(7):1348-1352.
- 24.- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical

cancer and human papillomavirus infection in Brazilian woman. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Nov; 9(11):1183-1191.

25.- Ghaderi M, Nikitina L, Peacock CS, Hjelmstrom P, Hallmans G, Wiklund F, et. al. Tumor necrosis factor a-11 and DR15-DQ6 (B*0602) haplotype increase the risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive woman in Northern Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Oct; 9(10):1067-1070.

26.- Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Martin D, Kissner T, Sherman ME, et. al. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998 Nov; 7(11):1035-1041.

27.- Rabah R, Lancaster W, Gregoire L. Laryngeal papillomatosis: viral genotype and HLA haplotype. *Lab Invest* 1998; 78(1): 5.

28.- García-Corona C, Vega-Memije E, Mosqueda-Taylor A, et. al. Association of HLA-DR4 (DRB1*0404) with Human Papillomavirus Infection in patients with Focal Epithelial Hyperplasia. *Arch Dermatol* 2004;140:1227-31.

29.- Friedman-Birnbaum R, Haim S, Sheinkman A, Gideone O, Barzilai A. Histocompatibility antigens in viral warts. *Acta Derm Venereol.* 1982;62(1):72-73.

30.- Barquera R, Zuñiga J, Hernández-Díaz R, et. al. HLA class I and Class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Molecular Immunology* 2008;45:1171-1178.

- 31.- Manual de técnicas del VIII curso Teórico-Práctico de Biología Molecular. 2009. Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".
- 32.- Sambrook J, Fitch EF, Maniatis T, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 33.- Bignon JD, Fernández-Viña M. 1995. Technical Handbook, Twelfth International Histocompatibility Workshop. Publisher: HLA et médecine. Paris, France.
- 34.- Saiki R. y col. 1989. Rapid analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230.
- 35.- Svejgaard A, Platz P, Ryder LP: HLA and disease 1982- A survey. *Immunol Rev* 70:193, 193-218.
- 36.- Lara MI, Layrisse Z, Scorza JV, García F, Stikow Z, Granados J, Bias W. 1991. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. *Human Immunol.* 30:129-135.

12. ANEXOS

Anexo 1

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21:

Se me ha explicado que padezco de verrugas virales cutáneas (mezquinos) y que se me propone participar en el proyecto para estudiar si hay algún factor hereditario que predisponga el desarrollo de mis verrugas.

Se me ha informado que se tomará una muestra de sangre de 10 ml, esta toma es adicional al estudio que requiere mi enfermedad. Además se me tomará biopsia por rasurado de la verruga.

Se me explicó que la toma de sangre de 10 ml (una jeringa pequeña) y el rasurado de la verruga pueden dar como resultado moretones, sangrados e infección, estos se resolverán con las indicaciones del médico en término de una o 2 semanas.

Los resultados de este estudio ayudarán a determinar si hay algún factor hereditario que predisponga el desarrollo de mis verrugas.

Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación.

Se me aclaró que esto no sevirá para cambiar el diagnóstico clínico o el tratamiento, sólo para conocer más su frecuencia. Puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico o del hospital.

Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.

Los estudios de laboratorio que se practicarán serán cubiertos por los Departamentos de Dermatología y de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado:

Verrugas cutáneas causadas por VPH asociadas a alelos del HLA DQ en población mexicana que acude a la consulta externa de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Nombre y firma del paciente
o responsable legal

Nombre y firma del Investigador
Responsable

Nombre y firma del testigo1

Nombre y firma del testigo2

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador.

Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Octavio Sierra Martínez, Presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 4000-3000 Ext. 3218.

Anexo 2

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21 y Capítulo III de la investigación en menores de edad. Artículo 34 a 39:

A mi _____ tutor o responsable del menor de edad _____ se me ha explicado que éste padece de verrugas virales cutáneas (mezquinos) y se me propone participar en el proyecto para estudiar si hay algún factor hereditario que predisponga el desarrollo de sus verrugas.

Se me ha informado que se le tomará una muestra de sangre de 10 ml, esta toma es adicional al estudio que requiere mi enfermedad. Además se le tomará biopsia por rasurado de la verruga.

Se me explicó que la toma de sangre de 10 ml (una jeringa pequeña) y el rasurado de la verruga pueden dar como resultado moretones, sangrados e infección, estos se resolverán con las indicaciones del médico en término de una o 2 semanas.

Los resultados de este estudio ayudarán a determinar si hay algún factor hereditario que predisponga el desarrollo de las verrugas.

Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación.

Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico o del hospital.

Autorizo la publicación de los resultados del estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará el nombre o revelará la identidad del menor.

Los estudios de laboratorio que se practicarán serán cubiertos por los Departamentos de Dermatología y de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado:

Verrugas cutáneas causadas por VPH asociadas a alelos del HLA DQ en población mexicana que acude a la consulta externa de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Nombre y firma del tutor o
o responsable legal del paciente

Nombre y firma del Investigador

Nombre y firma del testigo1

Nombre y firma del testigo2

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador.

Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Octavio Sierra Martínez, Presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 4000-3000 Ext. 3218.

Anexo 3
Cuestionario

No. _____

Fecha: _____

Nombre: _____ Registro: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Ocupación: _____

Originario y residente: _____ Tel: _____

Antecedentes familiares de verrugas virales en piel:

Tipo de lesiones:

Sitio de las lesiones:

Tiempo de evolución:

Tratamiento:

Cuadros previos (número y tiempo de evolución):

Tratamientos previos:

Enfermedades concomitantes:

Resultados:

HLA DQA1

HLA-DQB1

Comentarios: