



GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
México • La Ciudad de la Esperanza



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE FORMACION DE RECURSOS HUMANOS
CENTRO DERMATOLÓGICO “DR. LADISLAO DE LA PASCUA”

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN
DERMATOLOGÍA

GENOTIPIFICACION DEL VPH EN CONDILOMAS ACUMINADOS DE
PACIENTES MASCULINOS MEXICANOS

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
ENSAYO CLÍNICO

PRESENTADO POR: DRA. EDNA GONZÁLEZ SOLÍS
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA



DIRECTOR: DR. FERMÍN JURADO SANTA CRUZ

DIRECTORES DE TESIS: DRA. LOURDES ALONZO ROMERO PAREYON
DR. LUIS E. SOTO RAMÍREZ

MÉXICO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Genotipificación del VPH en Condilomas Acuminados de
pacientes masculinos mexicanos**

Dra. Edna González Solís

Vo. Bo.

**Dra. Obdulia Rodríguez Rodríguez
Profesora Titular del Curso de Especialización
en Dermatología**

Vo. Bo.

**Dr. Antonio Fraga Mouret
Director de Educación e Investigación**

INDICE

GENERALIDADES

ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	3
GENOTIPOS DE VPH.....	6
CONDILOMAS ACUMINADOS	8
ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	8
EPIDEMIOLOGÍA	8
PATOGÉNESIS	10
FACTORES DE RIESGO.....	10
MANIFESTACIONES CLÍNICA.....	11
TOPOGRAFÍA.....	11
MORFOLOGÍA.....	11
DIAGNÓSTICO.....	16
PREVENCIÓN	17

MÉTODOS DE DETECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS 17

PROTOCOLO DE INVESTIGACION

1. JUSTIFICACIÓN	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
TIEMPO Y LUGAR:.....	22
DISEÑO.	22
POBLACIÓN.	22
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	22
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	22
UNIVERSO MUESTRAL.....	23

6. VARIABLES	24
7. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO.....	25
8. ASPECTOS ÉTICOS	35
9. RECURSOS.....	36
ESTRATEGIA DE ANÁLISIS	36
10. RESULTADOS.....	37
11. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	51
12. ANEXOS	52
BIBLIOGRAFÍA.....	55

GENERALIDADES

El virus del papiloma humano, infecta la piel y mucosas, ocasionando diversas lesiones epiteliales relacionadas con benignidad o malignidad. De acuerdo a su secuencia de ADN , homología y asociación con lesiones clínicas, los virus se pueden agrupar en bajo y alto riesgo. Sin embargo la mayoría de estudios epidemiológicos se han enfocado principalmente a describir la infección genital , y el potencial oncogénico de éste¹.

ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Es un virus ADN del subgrupo A de la familia papovaviridae, grupo Papova (papiloma-polioma vacuolizante), son epidermotrópicos, relativamente pequeños, se caracteriza por tener forma icosaédrica y carecer de cubierta, miden 55 nm de diámetro aproximadamente y replican su genoma en el núcleo de las células infectadas². Fig 1. La cápside icosaédrica está compuesta de 72 capsómeros, los cuales contienen al menos 2 proteínas de cápside, L1 y L2. Cada capsómero es un pentámero de proteínas. El genoma consiste de una molécula de doble cadena de El DNA circular que contiene aproximadamente 7,900, comprende genes tempranos y tardíos separados por regiones . Los genes tempranos codifican para proteínas (E1,E2,E4,E5,E6 y E7), que participan en la replicación del DNA, control de transcripción y transformación celular. Los genes tardíos codifican las proteínas de la cápside mayor (L1), y una proteína de cápside menor (L2), entre estas dos regiones existe una región larga de control (RLC), esta es una región no codificante, que contiene promotores y elementos que están

involucrados en la replicación y transcripción del DNA. Fig.2 . Cada tipo de VPH no solamente tiene un promotor común para E6 , también tiene uno o más específicos en la RLC ^{3,4, 5,6, 7, 8} .

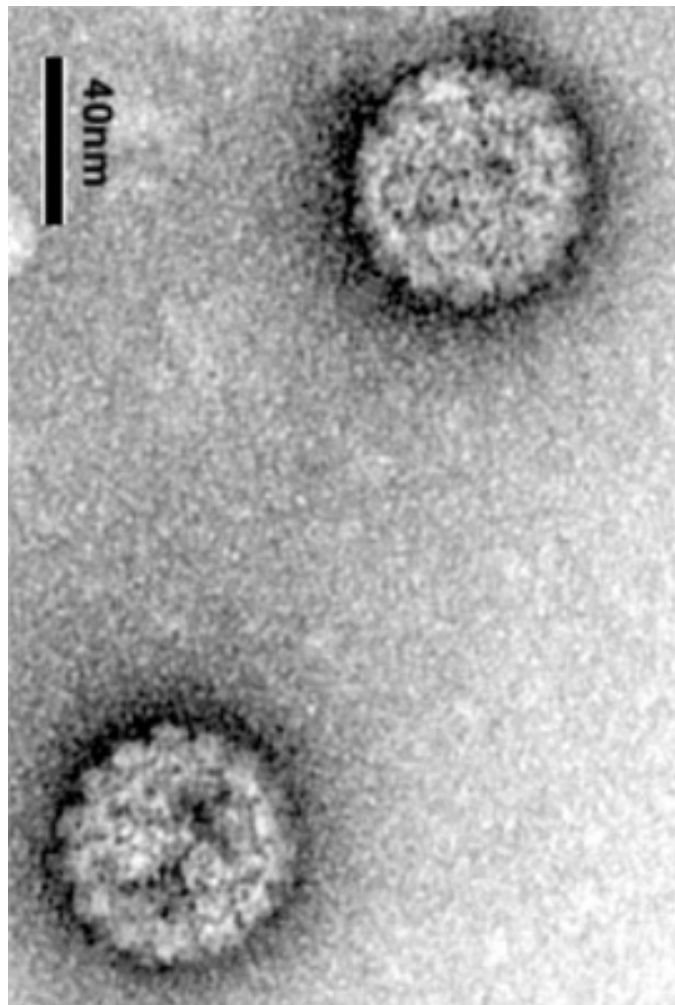
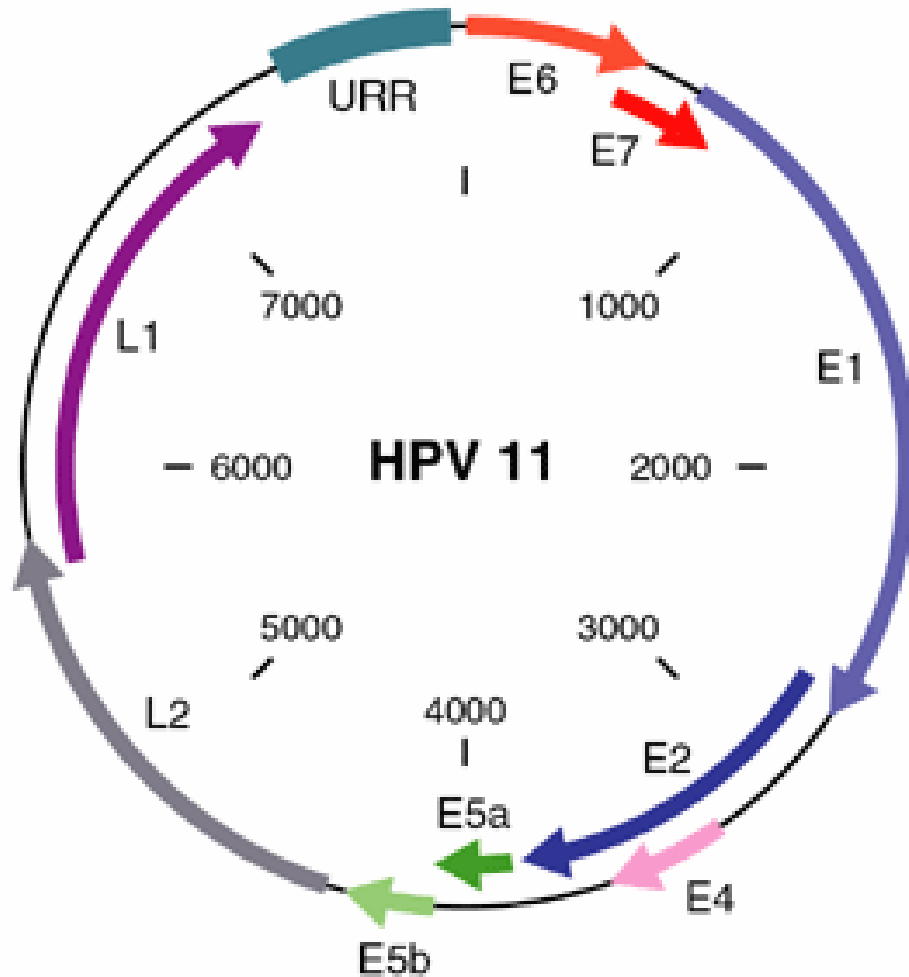


Fig. 1 Microscopia electrónica VPH
www.ncbi.nlm.nih.gov/.../Images/em_papil.htm



<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/04007665h.htm>

Fig 2. Esquema del genoma viral del VPH 11. El marco de lectura abierta codifica a cinco proteínas tempranas “early” (E1, E2, E5, E6 and E7) y dos proteínas estructurales tardías ‘late’ (L1 and L2) indicadas en el círculo; el número dentro la molécula circular de ADN indica aproximadamente la posición entre ~7900 pares de bases del genoma.

Abreviaciones: HPV Papilomavirus; URR, Región reguladora “upstream”.

El virus del papiloma humano (VPH) , constituye un grupo de de mas de 120 tipos de virus y son responsables de numerosos tipos de lesiones cutáneas y mucosas, dependiendo del genotipo es como se asocian a diversas enfermedades (Tabla 1) ^{9,10}.

TABLA 1. Genotipos de VPH y manifestaciones clínicas

<u>Lesión clínica</u>	<u>VPH (frecuente)</u>	<u>VPH (Menos frecuente)</u>
<u>Mucosa genital y lesiones relacionadas</u>		
Condiloma acuminado	6,11	1-5,10,16,18,30,31,33,35,39-45,51-59,70,80
Neoplasia Intraepitelial Cervical		
Bajo-grado	6,11	16,18,26,27,30,31,33-35,40,42-45,51-58,61,62,67-69,71-74,82
Alto-grado	16,18	6,11,31,33,35,39,42,44,45,51,,52,56,58,59,61,64,66,68,82
Papulosis Bowenoide	16	34,39,40,42,45
Cáncer cervical	16,18	31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66
Condiloma Gigante de Buschke y Lowenstein y otros carcinomas verrucosos	6,11	57,72,73
Papiloma Oral/laríngeo	6,11	2,16,30,32,40,57
En pacientes VIH	7,72,73	

Lesiones no genitales

Verrugas plantares	1,2	4,60,63
Verrugas comunes	2,4	1,26,27,29,57,65,75-78
Carniceros	7	1-4,10,28
En trasplantados renales	75-77	27,28,38,49
Verrugas planas	3,10	27,28,38,49
Epidermodisplasia verruciforme	5,8,9,10,12,14,15,17,20	2,3,19,21-25,28,36-38,,40,47,50
Carcinoma espinocelular o queratosis actínica	16	14,18,36,41,48
Queratoacantoma	37	7,9,16,29
Carcinoma espinocelular en pacientes inmunosuprimidos	48,60	
Melanoma	16,18,35,38	
Cáncer de piel no melanoma asociado a PUVA	5,20,21,23,24,38	
Enfermedad de Bowen no genital	16	2,26-29,31,34,54,56,58,61,62,73
Hiperplasia epitelial oral focal	13,32	
Verruga Mymercia	63	
Verruga pigmentada	65	
Quiste epidérmico	57,60	
Papiloma esofágico	6,20	
Carcinoma esofágico	16,18	6,9,11,13,20,24,25,33,38,51-54,57
Papiloma conjuntival y cáncer	6,11,16	
Carcinoma tonsilar	16	
Piel histológicamente normal	80	

CONDILOMAS ACUMINADOS

Los condilomas acuminados se consideran como una infección de transmisión sexual ocasionada por el Virus del Papiloma Humano (VPH), son lesiones verrugosas, aisladas o múltiples localizadas principalmente en el tracto urogenital o anal.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Desde el siglo I D.C los Griegos y Romanos conocían la verrugas cutáneas. En 1907 Ciuffo estableció el origen viral. Durante el año 1949 se observa por primera vez la partícula viral mediante microscopia electrónica y es en 1966 cuando se asocia por primera vez con epidermodisplasia verruciforme, con lo que se considera como un virus oncogénico. El nombre de papovavirus lo acuñó Melnick en 1962 para referirse a un grupo pequeño de virus oncogénicos resistentes al éter que contenían ácido desoxirribonucleico (ADN) y en 1974 Zur Hausen sugiere la existencia de múltiples tipos virales, ¹¹.

EPIDEMIOLOGIA

El VPH es la infección de transmisión sexual mas común mundialmente, la incidencia anual de condilomas acuminados en Estados Unidos es de aproximadamente 1%, en México se desconoce ^{12,13}. La importancia de la genotipificación de VPH tiene un gran valor para fines epidemiológicos ¹⁴.

Existen más de 100 tipos de VPH, de los cuales 40 tipos afectan la región anogenital, y de éstos 15 son oncogénicos^{15,16, 17}. Un tipo de VPH, se define

cuando existe al menos un 10% de diferencia en la secuencia de nucleótidos del gen L1, y se define como subtipo, cuando la secuencia de nucleótidos es mayor del 2% y menor del 10%^{18, 19, 20,21, 22}. Basado en su asociación con cáncer cervical y anogenital, los tipos de VPH se han clasificado en: bajo riesgo oncogénico los asociados a verrugas o displasias leves y tipos de alto riesgo oncogénico, a los asociados con cáncer anogenital o displasias de alto grado.

Los tipos 6 y 11 (considerados de bajo riesgo oncogénico) se han aislado hasta en un 90% de los condilomas acuminados y los tipos 16,18,31,33 y 35 en el 10% de los condilomas acuminados.

Algunos autores mencionan al VPH 16 como el tercer tipo asociado a cáncer cervicouterino^{23,24}.

En México la información sobre la prevalencia, y la genotipificación de la infección por VPH en población general es escasa, sólo mencionan prevalencia de VPH en las mujeres, asociada con Cáncer cervicouterino, encontrándose dicho virus hasta en un 95% en dicha patología. Algunos investigadores han encontrado al VPH tipo 16 como el más frecuente tanto en mujeres mexicanas asintomáticas como sintomáticas^{25,26}. Lazcano y colaboradores estudió 120 hombres asintomáticos, en México, analizó la presencia del ADN del VPH en muestras de orina y de surco balano-prepucial encontrando una prevalencia del ADN del VPH de 11.8% y 42.7%, respectivamente, demostrando con ello que la presencia del ADN del VPH uretral se encuentra en aquellos sujetos con condilomas clínicos intrauretrales⁶, sin embargo no realizó genotipificación.

En un estudio realizado en estudiantes universitarios del estado de Morelos se encontró una prevalencia global del 14%, lo que contrasta con la prevalencia en trabajadoras sexuales de la ciudad de México que es del 43%, mientras que en muestras de mujeres mexicanas en población abierta es de 14.5%⁷. Sin embargo no existe un estudio específico en pacientes mexicanos en los que se haya genotipificado el VPH, obtenido de condilomas acuminados.

PATOGÉNESIS

La infección ocurre a través de la inoculación del virión a través de un micro trauma a en el epitelio, infectan inicialmente las células basales donde son identificados por receptores virales, migran al núcleo y se inicia la replicación del DNA viral, producen de 50 a 100 genomas por célula, como las células basales se dividen, las partículas virales de VPH se replican y distribuyen a través de ellas, al madurar estas células y ser remplazadas a la superficie por nuevos queratinocitos, activa también el ciclo celular del virus²⁷.

Algunos autores refieren que el período de incubación promedio posterior al contacto sexual con un paciente infectado por VPH es de 3 meses, las lesiones pueden persistir años, y también se ha reportado una involución espontánea de los condilomas en un porcentaje de 17 a 69%; la transformación a carcinoma tiene baja frecuencia; y ocurre después de anomalías citológicas progresivas y a factores asociados ²⁸.

FACTORES DE RIESGO

Algunos autores han relacionado a la promiscuidad sexual como factor de riesgo, aumentando la incidencia en hombres que han tenido por lo menos 3 parejas sexuales. Respecto a la circuncisión en algunos estudios se considera dudosa el papel protector, ya que en algunos se demuestra que disminuye la prevalencia y en otros no; el tabaquismo actualmente se menciona como factor de riesgo para la infección de VPH²⁹. Pacientes con deficiencias en la inmunidad celular, como son los pacientes VIH positivos, o post trasplantados frecuentemente presentan lesiones más extensas o refractarias a tratamiento, así como predisposición a malignidad. Existen estudios que sugieren que la presencia de VIH facilita tanto la activación o la adquisición reciente de VPH como la reactivación de la infección latente o ambos ^{30,31,32, 33, 34, 35}.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

TOPOGRAFIA

Predomina en genitales. En hombres, se afecta con mayor frecuencia a la porción interna del prepucio y el frenillo, la corona, el surco coronal, el meato urinario y el glande; es poco común la porción externa del prepucio, el área púbica, la ingle, el escroto y el perineo. También pueden presentarse en el ano.

MORFOLOGÍA

Se caracteriza por lesiones vegetantes de superficie granulosa, húmeda, blandas, del color de la piel, rosado o grisáceo, pueden estar cubiertas por un exudado seroso o hemorrágico, son sésiles o pediculadas. Ante infección agregada puede observarse maceración y fetidez.

La evolución es crónica y persistente.

Se distinguen 3 tipos: hiperplásico, sésil y verrucoide, la forma hiperplásica se observa en regiones húmedas se inician como pequeñas masas papiliforme, luego se forman masas vegetantes, ramificadas blandas y húmedas, que adquieren formas redondeas, periformes en coliflor, únicos o múltiples , de color parduzco, blanquecino (Foto 1,2,3,4). Los condiloma sésiles son más pequeños se observan en el pene. (Foto 5,)

El tipo verrucoide, tiene el aspecto clínico verrugoso e histológicamente es muy hiperqueratósica, y pueden confundirse con verrugas vulgares (Foto 6,7,8).

Se localizan en el hombre en cara interna y externa del prepucio, frenillo, surco balanoprepucial, meato urinario, uretra, ano, ingle, región genitocrural, pubis, cara interna de muslos y escroto³⁶ .



Foto 1. Paciente de 30 años, bisexual, presenta dermatosis localizada a región perianal, la dermatosis constituida por múltiples lesiones vegetantes de superficie granulosa, húmedas, blandas, del color grisáceo. La evolución es crónica y persistente (4 años). (condiloma hiperplásico)



Foto 2. Paciente masculino de 25 años de edad, homosexual, portador de SIDA, con tratamiento antirretroviral con Zidovudina, Lamimudina y Nevirapina, no se conocía carga viral ni conteo de linfocitos CD4. La dermatosis estaba localizada a región perianal, constituida por vegetaciones, blandas, húmedas, con formas redondeadas que confluían formando placas, de color parduzco, evolución de 6 meses y asintomática. (condiloma hiperplásico)



Foto 3. Paciente masculino de 18 años de edad, homosexual, con dermatosis localizada a región perianal, constituida por lesiones vegetantes, papiliformes blandas, húmedas, del color de la piel (condiloma papiliforme)



Foto 4. Paciente masculino de 26 años de edad, heterosexual, presentaba dermatosis localizada a pene. Lesiones vegetantes, papiliformes. Evolución de un año. (Forma hiperplásica, papiliforme).



Foto 5. Masculino de 31 años con antecedente de infección por molusco contagioso, presenta dermatosis localizada a región genital de la que afecta surco balanoprepucial, Neoformaciones filiformes del color de la piel (Condiloma sésil).



Foto 6 . Paciente de 30 años de edad, con diagnóstico reciente de Diabetes Mellitus tipo 2, presenta dermatosis localizada a la región genital de la que afecta prepucio y glande. Neoformaciones verrugosas, con superficie queratósica (Morfología Verrucoide), asintomática de un mes de evolución.



Foto 7. Paciente masculino de 44 años de edad con antecedente de Diabetes Mellitus con descontrol metabólico, presenta dermatosis localizada al área genital de la que afecta el glande y el prepucio. Neoformaciones verrugosas, con superficie queratósica, con una evolución de un año. Tratamientos previos con corticoesteroide tópico e Imiquimod durante 3 meses.

(Morfología verrucoide)



Foto 8. Paciente masculino de 55 años de edad, con antecedente de Gonorrea. Placa verrugosa, hiperpigmentada en dorso de pene. Evolución 2 años, asintomática. (Morfología verrucoide)

HISTOPATOLOGIA

Depende de la topografía y morfología de las lesiones, se puede observar hiperqueratosis, acantosis de diversos grados, papilomatosis y la presencia de coilocitos³⁷.

DIAGNÓSTICO

Inicialmente se identifica la infección del VPH por la clínica, se puede utilizar ácido acético al 3% o 5% , siendo positivo al presentar “escarchamiento” en las lesiones, sin embargo no se considera una prueba específica para infección por VPH, además la especificidad y sensibilidad de este procedimiento para tamizado no se ha definido, con la histología se puede realizar el diagnóstico definitivo, sin embargo no es necesario. La mayoría de los condilomas acuminados se tratan sin previa biopsia, esta última por lo general se reserva a lesiones que no han respondido a tratamientos convencionales. Existen otras pruebas diagnósticas accesorias, como es la hibridación de ácidos nucleicos la cual provee el tipo de virus presente en la lesión, la inmunohistoquímica con la desventaja de que no indica el tipo de virus^{2, 38,39}. En contraste con otras infecciones de transmisión sexual, el VPH no se cultiva y no existe una prueba serológica disponible para uso clínico⁴⁰. Brown y cols. en 1999 demostraron que los condilomas acuminados pueden contener varios tipos de VPH, incluyendo algunos asociados con lesiones displásicas.

TRATAMIENTO

Se incluyen métodos ablativos como la crioterapia, terapia inmunomoduladora, interferón sistémico, terapia adyuvante. La tasa de recurrencia es de 30 a 90%. Se usan antimitóticos como la podofilina, podofilotoxina, ácido tricloroacético^{41,42,43}. La podofilina es una resina que se utiliza frecuentemente, respecto al porcentaje de curación, se han publicado diversos estudios, en los que se establece en un promedio de 3 meses se obtiene un 45% de curación y en un

tiempo de 9 meses hasta un 73% de curación⁴⁴. El ácido tricloro acético es un agente cáustico con efecto queratolítico, se emplea en preparación magistral diluido al 50 u 80%, algunos autores mencionan porcentajes de curación que varían del 40 al 80%, una ventaja de este producto, es que su uso está indicado en mujeres embarazadas ⁴⁵ .

En lesiones gigantes a veces se utiliza electrodesecación, intervención quirúrgica o láser de CO₂. teniendo en cuenta que los humos o agujas pueden contaminarse con el virus e infectar a quien efectúa el procedimiento; se han utilizado antimetabolitos como bleomicina, cantaridina y 5 fluoruracilo via tópica o intralesional ⁴⁶. El Imiquimod es un modificador de la respuesta inmune con actividad antiviral y antitumoral, induce interferon- α , interleucina 1 (IL-1), y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en sangre periférica, y queratinocitos humanos ^{47, 48, 49, 50} .

PREVENCIÓN

Respecto a la manera más efectiva de prevenir las infección por VPH es la abstinencia, sin embargo en las personas con vida sexual activa se debe de recomendar evitar la promiscuidad sexual, respecto al uso del condón o preservativo puede reducir la frecuencia de infección, pero no elimina el riesgo para la transmisión del VPH^{51, 52}. En la actualidad , se dispone en México la vacuna tetravalente que induce inmunidad con los tipos 6,11,16 y 18 (Gardasil), la cual se recomienda aplicar en preadolescentes de 10 a 13 años.

MÉTODOS DE DETECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas de biología molecular consisten en la manipulación de fragmentos de ácido nucleico como amplificación (la creación de millones de copias idénticas de secuencias de DNA o RNA presentes en una muestra clínica), corte específico por enzimas, ligaciones, entre otros y la visualización mediante el

uso de geles y electroforesis. Dichas técnicas han sido desarrolladas en décadas pasadas y son útiles en el diagnóstico y manejo de una gran variedad de enfermedades infecciosas y genéticas^{53,54,55,56}.

La aplicación de las técnicas de biología molecular a las enfermedades de la piel ha permitido conocer los mecanismos de muchas entidades, y han facilitado su diagnóstico e incluso su tratamiento. Estas técnicas permiten extraer y analizar el ADN o ARN de sangre periférica o de biopsias de piel, tanto por congelación como en los tejidos incluidos en parafina.

Las técnicas de hibridación tras la extracción de ácidos nucleicos han evolucionado desde las más sencillas como Southern blot o Dot blot hasta otras más sofisticadas como la hibridación genómica comparada. Sin duda, uno de los campos con más futuro es la aplicación de técnicas de hibridación a los cortes histológicos (hibridación in situ), incluyendo su variación fluorescente para el análisis de cromosomas (FISH, hibridación in situ con fluorescencia). Hoy en día; la mayoría de las técnicas de análisis de ADN se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que puede ser aplicada a un gran número de procesos nosológicos, y destaca sobre las anteriores por su sensibilidad, aunque a costa de una mayor complejidad tecnológica para impedir falsos positivos⁵⁷.

El diagnóstico molecular de enfermedades dermatológicas infecciosas permite detectar, caracterizar y cuantificar ácidos nucleicos de microorganismos bacterianos, virales y micóticos. Estos ensayos moleculares facilitan la elaboración de diagnósticos más rápidos y precisos que no se pueden obtener mediante métodos tradicionales. Los métodos moleculares tienen en ventaja de que son altamente sensibles y pueden detectar cantidades mínimas del agente infeccioso sin necesidad de cultivo. Los microorganismos que no son cultivables pueden ser identificados, así como organismos no viables como los fijados en formol para estudio histopatológico. Esta técnica ha sido eficaz para identificar micobacterias en lesiones de la piel consideradas como reacciones de hipersensibilidad a tuberculosis y para determinar el virus del papiloma humano⁵⁸.

PROCOLO DE INVESTIGACION

Introducción

Se revisaron los expedientes de los pacientes masculinos mayores de 16 años, de la consulta general del CDP en los últimos 6 años, y se encontró una prevalencia de 3 pacientes por cada mil que acudieron por primera vez a consulta. (Tabla No.2). De igual forma los expedientes de la Clínica de Enfermedades de Transmisión Sexual, en las fechas comprendidas de Enero 2000 a septiembre 2007, un total de 828 pacientes con condilomas acuminados (hombres y mujeres) de los cuales 83 presentaron coinfección con VIH.

TABLA 2. Incidencia de pacientes con Condilomas Acuminados

Año	Hombres Mayores a 16 años	Casos	Incidencia x1000
2000	13431	43	3.2
2001	13756	58	4.2
2002	12949	47	3.6
2003	13017	35	2.7
2004	13283	17	1.3
2005	13120	61	4.6
2006	12343	40	3.2
Promedio *	13,130	43	3.2

1. Justificación

Hasta el momento a nivel internacional está bien establecido que los tipos 6 y 11 de VPH son los agentes etiológicos de los condilomas acuminados, asimismo se sabe de la presencia de otros genotipos, en proporción menor, algunos de ellos considerados como de alto riesgo oncogénico. Debido a que no existen estudios donde se conozcan los genotipos de VPH en población masculina mexicana, es trascendente determinar la frecuencia de los tipos oncogénicos, con la finalidad de predecir la evolución, y de acuerdo a esto establecer la base para el seguimiento adecuado y detección de contactos.

2. Planteamiento del problema

Se sabe que el VPH es una enfermedad de transmisión sexual, común en el grupo de alto riesgo como lo son las trabajadoras sexuales de la ciudad de México (hasta un 43%) , sin embargo en el hombre se desconoce la prevalencia. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado la presencia del VPH tipo 6 y 11 (considerados como de bajo riesgo) hasta en un 90% de los condilomas acuminados y los tipos 16,18,31,33y 35 (de alto riesgo) hasta en un 10% de este padecimiento.

Dado a que no se sabe la prevalencia de los genotipos de VPH en condilomas acuminados de pacientes masculinos mexicanos, nos interesa saber cuál es la frecuencia de genotipos 6,11,16,18, 31, 33 y 35 en hombres mexicanos de 16 a 70 años de edad que acudan al Centro Dermatológico Pascua.

3. Objetivo General

Determinar mediante la reacción en cadena de la polimerasa los genotipos del VPH en condilomas acuminados, de pacientes del sexo masculino de 16 a 70 años de edad que acudan al CDP.

4. Objetivos específicos

Determinar los genotipos mas frecuentes en condilomas acuminados de los pacientes participantes.

Determinar si existe la presencia de más de un genotipo en los pacientes estudiados.

Describir las características clínicas y epidemiológicas de los casos estudiados dependiendo de la topografía de las lesiones.

5. Material y métodos

Tiempo y lugar:

Previo consentimiento informado, se realizaron biopsias por rasurado, en pacientes con diagnóstico clínico de condilomas acuminados; en el Centro Dermatológico Pascua del 1 de septiembre del 2005 a junio 2006.

Diseño.

Transversal, descriptivo, prospectivo.

Población.

Se incluyeron pacientes de sexo masculino, que fueron captados en la consulta de dermatología general y en la clínica de Enfermedades de Transmisión sexual (ETS), del CDP.

Criterios de inclusión

Pacientes de sexo masculino mayores de 16 años y menores de 70 años de edad, con diagnóstico clínico de condilomas acuminados.

Sexualmente activos.

Lesiones mayores de 0.5 cm².

Que aceptaran participar en el estudio, previo consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Tratamiento tópico en los últimos 30 días.

Universo muestral.

El tamaño de la muestra se calculó con base en la fórmula para estimar una proporción con una precisión de 5%, una confianza del 95% y con prevalencia (p) probable de 10%, el tamaño máximo de ella se ajustará para población finita.

$$n = Z^2 pq / e^2$$

$$Z^2 \text{- nivel de confianza} = (1.96)^2$$

$$e^2 \text{- precisión} = 5\%$$

$$p \text{- prevalencia} = 10\%$$

$$q = (1-p)$$

$$n = (1.96)^2 (0.10)(0.90) / (0.05)^2 = 138.2 \text{ pacientes}$$

Número con corrección finita tomando en cuenta $N = 88$ que es el promedio de pacientes por año de los pacientes de sexo masculino con condilomas acuminados atendidos en el CDP.

$$N_a = n / (1 + (n/N)) = 138.2 / (1 + 138/88) = 53.9$$

Debido a la carencia de recursos económicos, obligó limitar los estudios, realizándose sólo en 48 pacientes.

Lugar de realización. Centro Dermatológico Pascua, clínica de ETS y Departamento de Virología Molecular del INCMNSZ.

.

Variables de estudio: edad, evolución, inmunosupresión, tamaño de la lesión localización, práctica sexual, circuncisión.

6. Variables

Definición operacional de variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN	Definición operacional	Tipos de variables	Escala de medición	Unidad de medición
Edad	Tiempo transcurrido desde su nacimiento hasta el momento de inclusión al estudio.	Se preguntó la edad del paciente	Cuantitativa continua.	Razón	Años.
Escolaridad	Estudios realizados	Se preguntó nivel de escolaridad	Cualitativa	Nominal	Analfabeta Nivel básico Medio superior
ocupación	Actividad que realiza para obtener ingresos económicos	Se preguntó en que trabaja	Cualitativa	Nominal	
Estado civil	Estado civil	Se preguntó si es soltero, casado, unión libre	cualitativa	Nominal	Soltero Casado Unión libre
Evolución	Tiempo transcurrido de la presencia de la enfermedad hasta la inclusión al estudio	Se preguntó el tiempo de evolución	Cuantitativa continua	Razón	Meses
Inmunodepresión	Estado VIH, uso de esteroides o inmunorreguladores, Diabetes Mellitus (DM)	Se interrogó el antecedente de uso de esteroides o inmunorreguladores. Así como serología para VIH, DM	Cualitativa	Nominal	Dicotómica: Sí o No.
Tamaño de la lesión	Tamaño de lesión	Se midió el tamaño de la lesión con tumorímetro	Cuantitativa continua	Nominal	Mayor a 1 cm: Sí o No
Localización de la lesión	Sitio en el que se ubican las lesiones	Se exploró el sitio donde se localizaron las lesiones. Si eran mas de 2 lesiones se tomó la muestra de la primera lesión o de la que no había recibido tratamiento	Cualitativa	Nominal	Genital Anal

VARIABLE	DEFINICIÓN	Definición operacional	Tipos de variables	Escala de medición	Unidad de medición
Relación sexual	Tipo de relación: heterosexual (diferente sexo), bisexual (ambos sexos), homosexual (hombre-hombre)	Se interrogó la preferencia sexual	Cualitativa	Nominal	Homosexual Bisexual Heterosexual
Enfermedades de transmisión sexual previa (ETS)	Infecciones adquiridas por transmisión sexual	Se interrogó si ha padecido sífilis, gonorrea o alguna otra ETS	Cualitativa	Nominal	Dicotómica: Si o No
Circuncisión	Antecedente de extirpación del prepucio	Se observó si tenía circuncisión o no	Cualitativa	Nominal	Dicotómica: Si o No
Número de parejas sexuales	Número de parejas sexuales hasta la fecha del estudio	Se preguntó el número de parejas sexuales que ha tenido	cuantitativa	razón	numero

7. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

Se realizó el análisis según la descripción del protocolo PVHfast fabricado por GENOMICA SAU y distribuido en México por Biodist S.A. de C.V. Registro No. 01242R99 SSA.

El kit PVHfast 2.0 ha sido diseñado para la detección y tipificación del VPH en distintas muestras clínicas (frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina), mediante amplificación por PCR y posterior digestión del producto amplificado con enzimas de restricción.

Cada tipo de VPH presenta en su genoma una secuencia de DNA característica y distinta; no obstante, aparecen zonas dentro de esta secuencia que son muy parecidas entre los distintos tipos de VPH. Con el kit PVHfast 2.0, la detección de VPH se realiza amplificando una región de unos 450 pb del DNA del virus que es muy similar entre los distintos tipos de VPH. Esta región es la denominada L1 del

marco abierto de lectura (ORF) del virus. A pesar de que esta secuencia es común a los distintos tipos de PVH presenta pequeñas variaciones entre ellos. Una forma útil de tipificar los virus es localizar estas pequeñas variaciones características de cada tipo. Para localizar estas pequeñas variaciones de secuencia y , por tanto, para tipificar los diferentes VPH, se digiere el DNA amplificado anteriormente con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción, por ejemplo, la enzima RsaI, corta en puntos específicos de la secuencia de DNA. De este modo, la enzima cortará el producto amplificado de cada tipo de VPH en distintos puntos y se obtienen así varios fragmentos de DNA. Si separamos los fragmentos por su tamaño en un gel de agarosa, cada tipo de virus presentará un patrón de bandas característico.

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del DNA de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de ella, por degradación del DNA debida a una inadecuada conservación o por pérdida del DNA durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del virus (hemoglobina, restos de parafina, sales, etc).

Con el equipo PVHfast 2.0 se han eliminado esos falsos negativos gracias a la introducción de dos controles internos en el mismo tubo de reacción donde se analiza la muestra. Por un lado, la amplificación de DNA del propio paciente presente en la muestra sirve como control del DNA de la muestra. La amplificación del DNA del paciente se lleva a cabo gracias a que todos los tubos de reacción del kit PVHfast 2.0 contienen una pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 892 pb del gen humano CFTR. Por otro lado, todos los tubos de reacción del kit PVHfast 2.0 contienen un plásmido modificado que sirve como control de la reacción de amplificación. Este control interno se amplifica con los mismos cebadores que el gen CFTR humano, pero el tamaño del amplificado es distinto (1202 pb). Los dos controles internos se amplifican simultáneamente junto con el PVH en un único tubo de reacción, de manera que al amplificar el DNA

extraído a partir de una muestra clínica podemos encontrar estas bandas de amplificado:

Banda de unos 450 pb (variable según el tipo de PVH): corresponde a la amplificación del PVH presente en la muestra.

Banda de 892 pb: corresponde a la amplificación del DNA del paciente (control del DN2 de la muestra)

Banda de 1202 pb: corresponde a la amplificación del plásmido (control de la reacción de amplificación).

COMPONENTES Y CONSERVACION DEL EQUIPO PVHfast 2.0

El equipo contiene todos los reactivos necesarios para la extracción del DNA y el análisis de muestras clínicas de diverso origen. Todos los reactivos sin abrir son estables conservados a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en el equipo. Los reactivos incluidos en el equipo son los siguientes:

Solución de digestión 2.0: una vez descongelada, guardar a 4°C .

Proteinasa K : una vez descongelada, mantener en hielo mientras se esté usando y después guardar a 4°C . Este reactivo nunca debe ser congelado de nuevo. No usar este reactivo si ha transcurrido más de un mes tras su descongelación.

Tubos de reacción listos para su uso.

Los tubos son de 0.2 ml , no llevan aceite mineral, por lo que sólo se observa una única fase formada por 45 microlitos mezcla de reacción.

Solución de carga: una vez descongelada, guardar entre 4 y 25°C.

Solución de restricción: una vez descongelada, guardar a 4°C.

Enzima 1 de restricción (Rsal) guardar siempre a -20°C

Cuando se utilice, que esté el menor tiempo posible fuera del congelador y siempre en hielo.

Enzima 2 de restricción: guardar siempre a -20°C. Cuando se utilice, que esté el menor tiempo posible fuera del congelador y siempre en hielo.

MATERIAL REQUERIDO

EQUIPOS

Baño o termobloque ajustable a 37° C, 55°C y 100°C

Vórtex

Autoclave

Termociclador

Balanza con exactitud de 0.1 g

Fuente de electroforesis

Cubeta de electroforesis y accesorios

Tres micropipetas ajustables entre 1.20 microlitros, 20.200 microlitros y 200-1000 microlitros para el laboratorio de extracción

Una micropipeta ajustable entre 1-20 microlitros para el laboratorio de visualización

Transiluminador ultravioleta

Cámara de fotos u otro sistema de captación de imágenes.

Microcentrifuga

pHmetro

microondas o placa calefactora

REACTIVOS Y MATERIAL

Agua destilada

Solución salina

Agarosa

Agarosa de alta resolución

Bromuro de etidio

Marcador de pesos moleculares DNA molecular weight marker VIII (Roche Diagnostics)

Hidróxido de sodio

Acido acético glacial

Tris base (Trizma base)

Na₂EDTA.2 H₂O

Guantes desechables

Puntas de pipeta con filtro o de desplazamiento positivo

Recipiente con hielo picado

Tubos de 1.5 ml estériles

Vasos de precipitado y probetas de 1 litro

Gradillas para tubos de 1.5 ml y 0.5 ml

RECOMENDACIONES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACION

La técnica se debe realizar en dos áreas separadas físicamente, para evitar contaminaciones con el producto amplificado anteriormente. Cada una de las áreas debe tener su propio material de trabajo identificado, y nunca debe salir de ellas (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.). No utilizar el mismo fregadero para lavar el material no desechable.

Área de extracción: en esta área se hace la extracción del DNA y el montaje de la reacción de amplificación

Área de visualización: en esta se trabaja con el producto amplificado. El material de este sitio nunca ha de entrar en contacto con la del área de extracción. Evitar ir a esta última mientras se está trabajando en el área de visualización.

Evitar que exista contacto entre las distintas muestras (al abrir y cerrar los tubos que las contienen, al contacto con las micropipetas, etc).

Utilizar guantes en todo momento. Es recomendable cambiarse de guantes con cierta frecuencia, especialmente si existe sospecha de contacto con alguna muestra.

Emplear siempre puntas con filtro o pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones debidas a la micropipeta.

Desechar la punta de la micropipeta tras cada pipeteo.

Cerrar los tubos de los reactivos inmediatamente después de su uso para evitar contaminaciones.

Emplear material de laboratorio desechable y estéril

Nunca mezclar reactivos de dos lotes distintos

Los resultados obtenidos con el equipo no son válidos si se emplean otras muestras distintas a las indicadas en él o DNA extraído por un protocolo distinto al indicado.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS NO SUMINISTRADOS

Solución salina (NaCl 0.9%) Disolver 9 g de NaCl en un litro de agua destilada. Autoclavear o filtrar a través de un filtro de 0.2 microlitros.

Bromuro de etidio 10mg/ml. Disolver 10 mg de bromuro de etidio en 1 ml de agua. Guardar protegido de la luz. El bromuro de etidio es mutagénico. Todas las soluciones que contengan bromuro de etidio han de ser manipuladas con guantes.

EDTA 0.5 M pH 8.0 (1 litro). Añadir 186,1 g de Na₂ EDTA.2H₂O a 800 ml de agua destilada. Poner en un agitador y ajustar el pH a 8.0. Enrasar a 1 litro con agua destilada. Autoclavear o pasar a través de un filtro de 0.2 µm.

TAE 50X. Añadir en un vaso 242 g de Trizma base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M y pH 8.0 preparado como se indica en el apartado anterior), y completar con agua destilada hasta 1 litro. Agitar hasta su total disolución.

Tampón TAE1X. Mezclar 20 ml de TAE50X y 980 ml de agua.

tampón de electroforesis TAE 1X con bromuro de etidio 0.2 mg/L. Añadir 20 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml a 1 l de TAE 1x. agitar y conservar en una botella protegida de la luz.

Gel de agarosa al 2% en TAE1X. Para 100 ml de gel, disolver calentando en el microondas 2 g de agarosa en 100 ml de TAE 1X. Añadir 5 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml. Agitar, verter en la cubeta y dejar gelificar.

Gel de agarosa de alta resolución al 2.5% en TAE 1X. Para 100 ml de gel, disolver calentando en el microondas. 2.5 g de agarosa de alta resolución en 100 ml de TAE 1X. Añadir 5 µl de bromuro de etidio 10mg/ml. Agitar y verter en la cubeta. Una vez gelificado introducir en la nevera a 4°C durante al menos 15 minutos (también se puede melificar directamente a 4°C durante 30 minutos).

Marcador de pesos moleculares. Mezclar en un tubo estéril 420µl de agua destilada estéril, 80µl de Molecular Weight marker VIII a 250 µg/ml (Roche Diagnostics) y 100µl de la solución de carga incluida en este kit. Esta solución lleva 0.5 µg de molecular weight marker VIII por cada 15 µl, listos para cargar en un gel de agarosa. Guardar este reactivo a 4°C.

PROCEDIMIENTO PARA REALIZACION DE BIOPSIA

BIOPSIA POR RASURADO, CONSERVACIÓN DEL TEJIDO, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN.

Previa asepsia y antisepsia de la región, y aplicación de anestésico local xilocaína con epinefrina, se obtendrá lesión de aproximadamente 0.5 cm de diámetro mediante bisturí , empleándolo paralelo a la superficie de la piel, y se colocará apósito a presión para hemostasia o ácido tricloroacético a saturación. Las muestras tomadas serán transportadas en un vial con solución salina, al Laboratorio de Virología Molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNZ), después de la maceración del tejido, este será incubado con proteinasa K durante 24 horas, posteriormente se realizará la extracción de DNA con método de Trizol, finalmente, previa cuantificación de DNA mediante espectrofotometría, se realizará la reacción de polimerasa en cadena (PCR) comercial. La prueba detectará 14 tipos de VPH de alto riesgo (VPH 16,18,31,33,35,39,45,51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y 6 tipos de VPH de bajo riesgo (VPH 6,11, 40,42, 43 y 44).

Se recolectará la biopsia por rasurado en un criovial con rosca hasta procesar, con 600 microlitros de solución salina (PBS), se mantuvieron en congelación a -70°C hasta su procesamiento.

PROTOCOLO DE GENOTIPICACION

EXTRACCION DE DNA

- Descongelar muestra a temperatura ambiente
- Cortar tejido con bisturí en caja de Petri
- Agregar 1000 microlitros de coloruro de Na 0.9% , macerar tejido, utilizar vórtex
- Incluir control negativo con 1 mililitro de cloruro de Na
- Centrifugar muestra en tubo de 1.5 ml estéril durante 10 minutos, centrífuga a 12,000 rpm
- Decantar sobrenadante
- Agregar 1 ml de cloruro de Na, pipetear o utilizar vórtex
- centrifugar muestra 10 min a 12,000 rpm
- Retirar sobrenadante con micropipeta Pasteur
- Añadir 50 microlitros de solución de digestión 2.0
- Añadir 50 microlitros de proteinasa K
- Agitar tubos en vórtex o micropipeta para disgregar
- Incubar muestras a 56°C durante 2 a 3 horas
- Incubar muestras a 100°C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K
- centrifugar las muestras durante 10 minutos en una microcentrífuga a 12,000 rpm y congelar a -20C°

TÉCNICA DE PURIFICACIÓN DE DNA

- Agitar la resina de purificación hasta conseguir suspensión homogénea durante 10 minutos
- Añadir 1000 microlitros de resina de purificación por cada 100 a 300 microlitros de muestra

- Mezclar el contenido invirtiendo el tubo varias veces, dejar incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir el contenido del tubo de muestra a la jeringa y pasar lentamente el líquido a través de la columna de purificación presionando el émbolo.
- Quitar la columna y fijar de nuevo la columna
- Añadir 2 mililitros de solución de lavado a la jeringa y presionar el émbolo
- Colocar la columna en el tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar 2 minutos en la microcentrífuga 7.6 rpm para eliminar los restos de solución de lavado.
- Pasar la columna seca a otro tubo Eppendorf, previamente marcado con el número de la muestra, añadir 50 microlitros de solución de dilución a la columna y dejar incubando durante al menos 5 minutos (máximo 30 minutos) para permitir que el DNA se despegue de la resina. Eluir el DNA por centrifugación durante 20 segundos en microcentrífuga 30 segundos 6000 rpm
- Mantener DNA (50 µl) a 4°C o -20°C.

PROCEDIMIENTO DE PCR

- Descongelar tubos de reacción mas control negativo, mantenerlos en hielo.
- Dar un pin a los tubos de reacción.
- Añadir 5 ml de DNA extraido a tubos de reacción resuspendiendo.
- Programar el termociclador con los siguientes ciclos:

1 ciclo	95°C 9 minuto
45 ciclos	94°C .30 minuto 55°C 1 minuto 72°C 1.30 minutos
1 ciclo	72°C 8 minutos
	4°C Continuo hasta recoger tubo

Arrancar el programa y colocar los tubos de reacción en el termociclador cuando el bloque haya sobrepasado los 90°C con la finalidad de minimizar las posibles amplificaciones inespecíficas.

PROCEDIMIENTO PARA VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

- Tomar 10 microlitros de cada tubo de reacción amplificado
- Añadir 2 microlitros de solución de carga a los 10 microlitros del producto amplificado y cargar todo en un pocillo de un gel de agarosa al 2% en TAE1X.
- Utilizar los dos pocitos situados a los lados de las muestras con marcador de peso molecular 2 ml + 12 ml de solución de carga.

PROCEDIMIENTO PARA TIPIFICACIÓN DE VPH POR DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

- Sólo se tipifican las muestras positivas en el gel de detección
- En este caso en el que la banda del amplificado fue muy intensa, se diluyó el amplificado previo a la digestión.
- Tomar 10 microlitros del tubo de reacción amplificado poner en tubo de 0.2 ml agregar 30 microlitros de solución de restricción.
- Descongelar enzima de restricción 1 y 2 mantener en hielo, centrifugar unos segundos en microcentrífuga.
- De los amplificados diluidos con solución de restricción añadir a cada uno de ellos 1 mililitro de enzima 1 de restricción. Marcar tubos con Dig.1
- Mezclar el contenido de la digestión enzima 1 (Dig 1) resuspendiendo con micropipeta varias veces.
- Pasar 20 microlitros de cada digestión a un tubo estéril marcado con el número de muestra y Dig 1+2 (Digestión enzima 1+enzima2). Añadir 1 microlitro de enzima 2 de restricción y resuspender de nuevo con micropipeta o vórtex.

- Centrifugar durante segundos tubos en microcentrífuga para que no queden gotas en las paredes. Incubar los tubos Dig1 y Dig 1+2 a 37°C (mínimo 2 horas). Se puede mantener en incubación de un día otro, como fue en este caso.
- Realizar gel de Agarosa de alta concentración al 2.5% para la visualización de las digestiones. (Foto. 9)

TIPIFICACIÓN DEL VPH

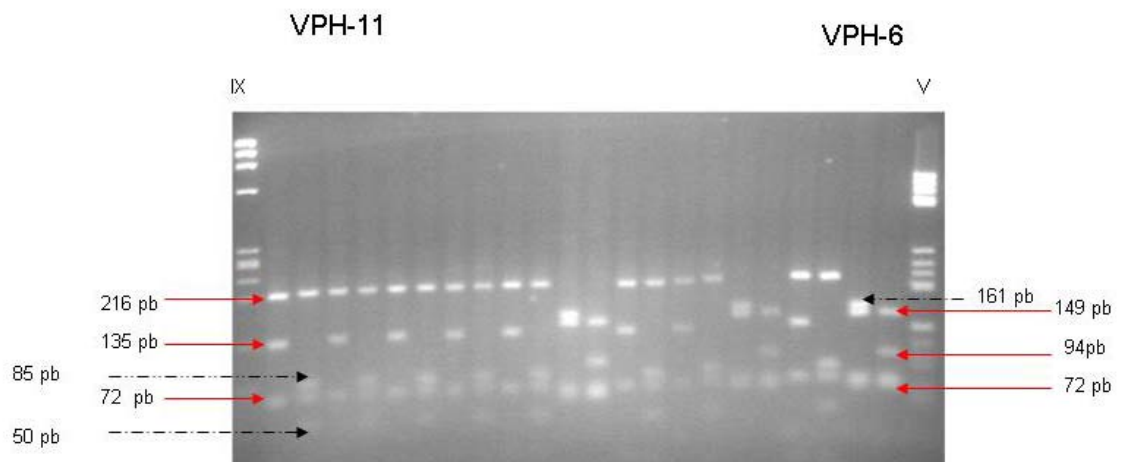


Foto 9. Fotografía de un gel de agarosa con los patrones de restricción de las muestras positivas VPH. Marcador IX y marcador V

8. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio se apegó a los requisitos estipulados por el acuerdo de Helsinki para estudios en humanos.

Se informó al paciente sobre el procedimiento, confidencialidad del estudio y complicaciones, tanto en forma escrita como verbalmente. Se obtuvo una carta de consentimiento antes del estudio. El riesgo es mínimo, en el caso de resultado

positivo para un virus oncogénico considerado como de alto riesgo, se dará seguimiento y tratamiento más estrecho en la clínica de ETS.

9. RECURSOS

Financiero: A cargo del investigador y del laboratorio de virología molecular del INCMNSZ.

Físicos: Se llevó a cabo en consulta externa del Centro Dermatológico.

Materiales: Guantes, equipo de biopsias , viales con solución salina, así como equipo para toma de muestra sanguínea como lo son ligadura, agujas vacutainer, y tubos vacutainer.

Personales: Asesores: Dra. Lourdes Alonzo (Dermatóloga CDP), Dr. Luis Enrique Soto (Infectólogo INCMNSZ).

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS

1. Se utilizó estadística descriptiva de acuerdo al nivel de medición de las variables, se calcularon los intervalos de confianza para la proporción estimada, se elaboraron tablas y gráficas para la descripción de los resultados. El análisis fue realizado con un software SPSS® .

10. RESULTADOS

Se estudiaron 48 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión para determinar mediante la reacción en cadena de la polimerasa los genotipos del VPH en condilomas acuminados, provenientes de la consulta del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”, en el período comprendido de septiembre 2005 a Junio del 2006.

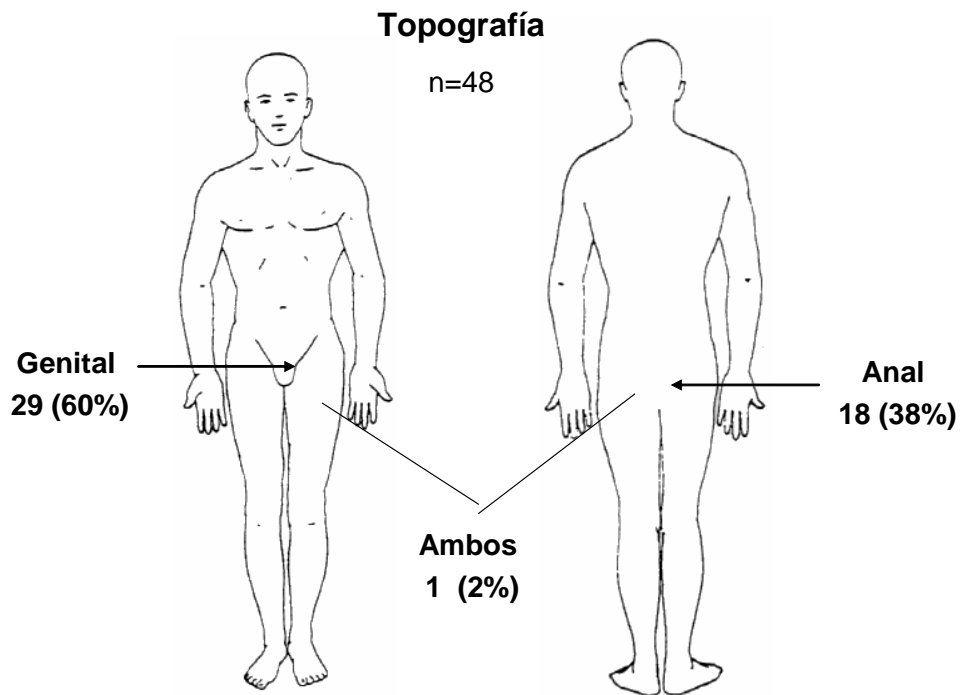
Características clínicas epidemiológicas

Desde un punto de vista epidemiológico dividimos los pacientes de acuerdo a la topografía de las lesiones con el fin de establecer posibles asociaciones con sus características clínicas y prácticas sexuales

Se observó un predominio de las lesiones localizadas en región genital con 29 casos (60.4%), sobre la localización anal 18 (37.5%). Sólo un paciente presentó lesiones tanto en región genital como anal. (Tabla 3)

TABLA 3. TOPOGRAFÍA DE LAS LESIONES.

Topografía	Casos	%
Genital	29	60.4
Anal	18	37.5
Ambos	1	2.1
Total	48	100.0
<i>R=Genital/Anal</i>	1.6	



Fuente: Consulta externa del CDP

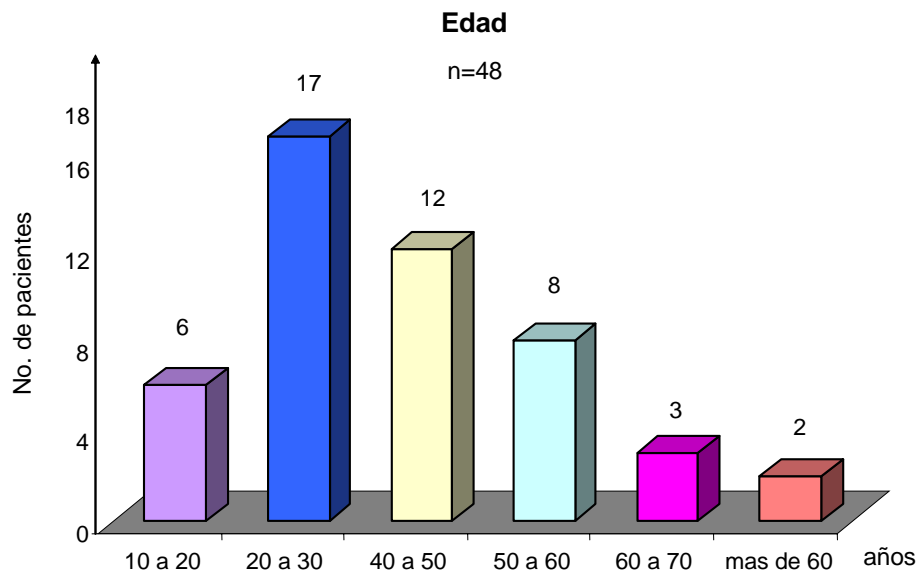
Gráfica 1

Edad

La edad promedio de los pacientes con lesiones en área genital fue de 34 años, el porcentaje más alto de lesiones fue en el grupo de 20 a 30 años, mientras que los pacientes con lesiones en región anal fue de 32 años y los grupos por edad más afectados fueron de 20 a 30 años al igual que de 40 a 50 años. (Tabla 4)

TABLA 4 . PACIENTES POR GRUPO DE EDAD

Gpo x edad	Genital	Anal	Ambos	Total	%
10 a 20	5	1	0	6	12.5%
20 a 30	10	7	0	17	35.4%
40 a 50	4	7	1	12	25.0%
50 a 60	6	2	0	8	16.7%
60 a 70	2	1	0	3	6.3%
más de 60	2	0	0	2	4.2%
Total	29	18	1	48	100.0%
Rango	18 - 70	20 - 56			
promedio	34	32			



Fuente: Consulta externa del CDP

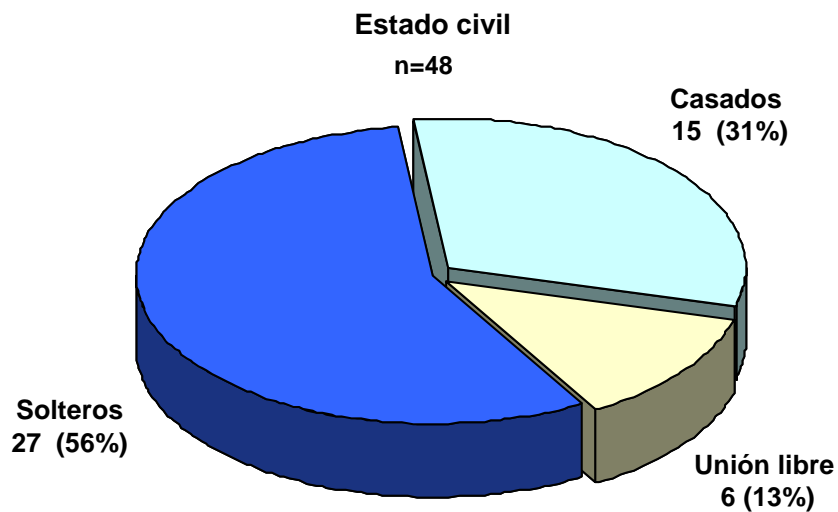
Gráfica 2

Estado civil

La mayoría de pacientes estudiados sin importar la topografía fueron solteros. (Tabla 5).

TABLA 5. Estado civil

Estado civil	Genital	Anal	Ambos	Total	%
Soltero	14	12	1	27	56.3%
Casado	13	2	0	15	31.3%
unión libre	2	4	0	6	12.5%
Total	29	18	1	48	100.0%



Fuente: Consulta externa del CDP

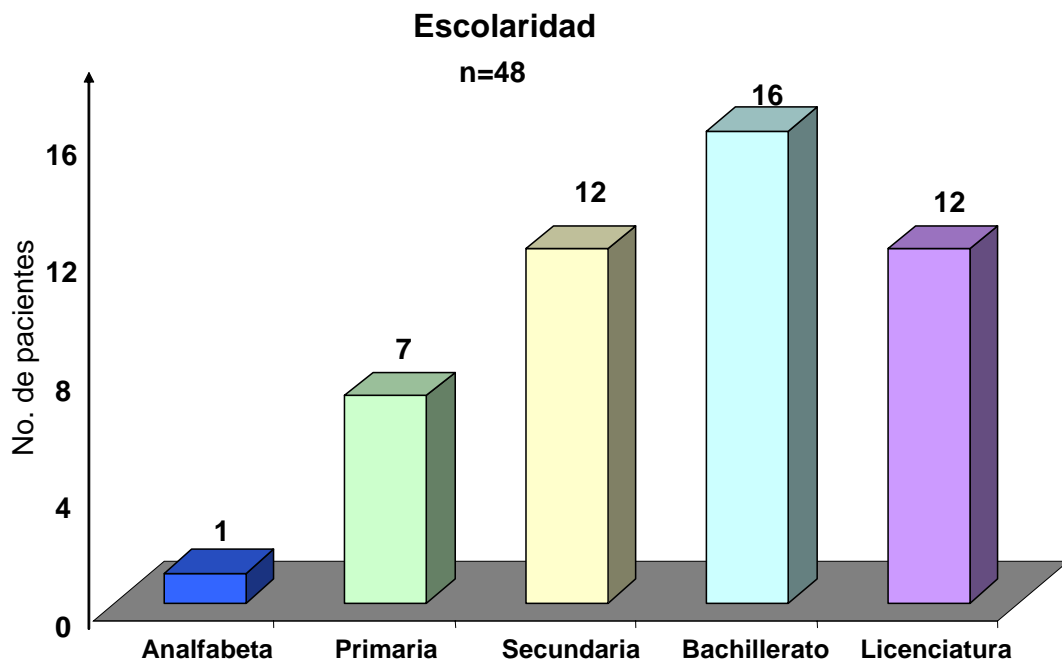
Gráfica 3

Escolaridad

Respecto a la escolaridad en el caso de los pacientes con lesiones de topografía genital, con escolaridad de licenciatura ocuparon el 34.%, seguidos por bachillerato 31% , en el caso de los pacientes con topografía anal , con estudios de de bachillerato ocuparon el 38.9% seguidos por secundaria 33.3%. (Tabla 6)

TABLA 6. ESCOLARIDAD DE LOS PACIENTES

Escolaridad	genital	Anal	Ambos	Total	%
Analfabeta	1	0	0	1	2.1%
Primaria	4	3	0	7	14.6%
Secundaria	5	6	1	12	25.0%
Bachillerato	9	7	0	16	33.3%
Licenciatura	10	2	0	12	25.0%
Total	29	18	1	48	100.0%



Fuente: Consulta externa del CDP

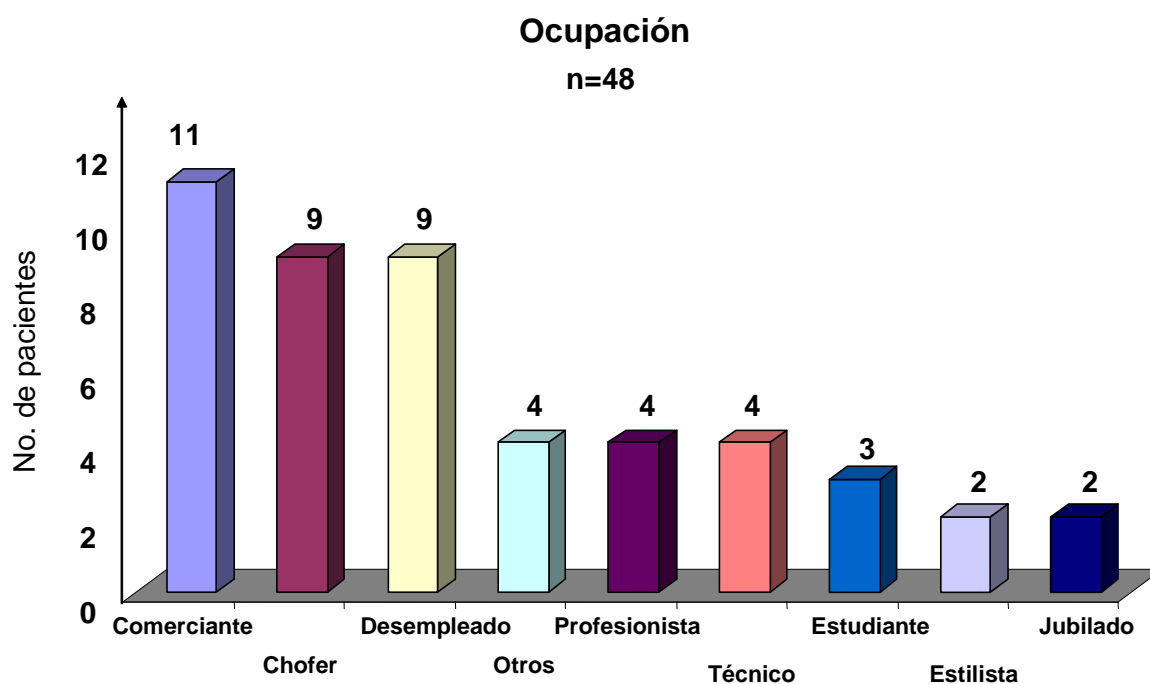
Gráfica 4

Ocupación

En cuanto a la ocupación, los comerciantes ocuparon el primer lugar, seguido por los chóferes al igual que los desempleados. (Tabla 7).

TABLA 7 . OCUPACIÓN DE LOS PACIENTES

Ocupación	genital	Anal	Ambos	Total	%
Comerciante	6	5	0	11	22.9%
Chofer	7	2	0	9	18.8%
Desempleado	6	3	0	9	18.8%
Otros	1	2	1	4	8.3%
Profesionista	2	2	0	4	8.3%
Técnico	4	0	0	4	8.3%
Estudiante	2	1	0	3	6.3%
Estilista	0	2	0	2	4.2%
Jubilado	1	1	0	2	4.2%
Total	29	18	1	48	100.0%



Fuente: Consulta externa del CDP

Gráfica 5

ITS – VIH - Circuncisión

Sólo 3 pacientes refirieron antecedentes de infecciones de transmisión sexual, las cuales fueron 2 casos de Gonorrea y uno de Moluscos contagioso; dichos pacientes pertenecían al grupo de topografía genital.

En cuanto a coinfección por VIH sólo se confirmó en 2 pacientes, los cuales tuvieron lesiones en área anal. (Tabla 8).

TABLA 8. ANTECEDENTE DE ITS-VIH Y CIRCUNCISIÓN

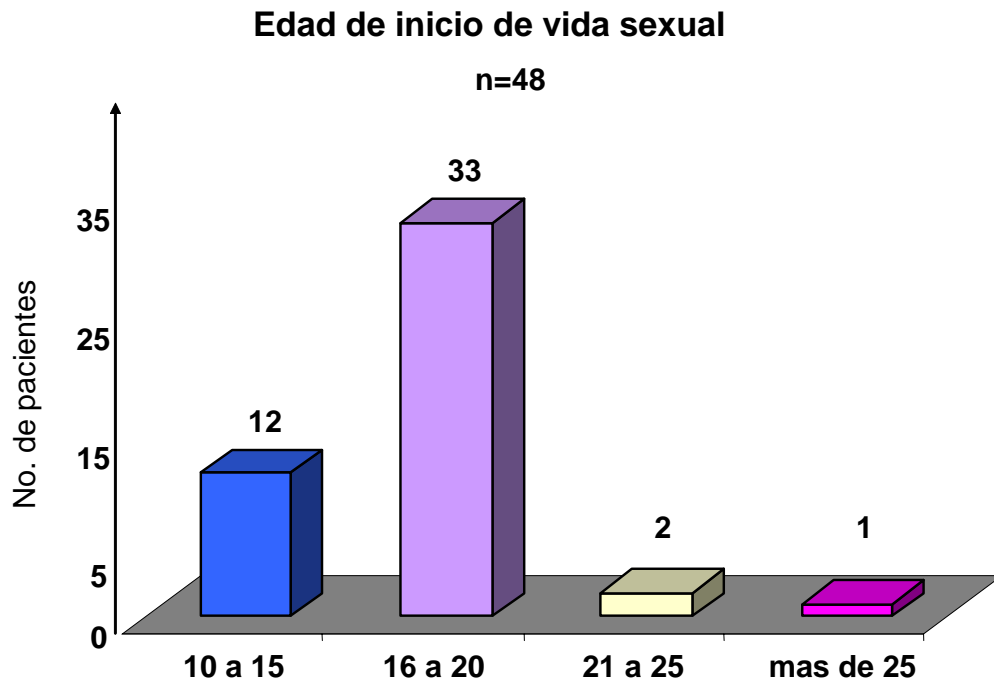
ITS	genital	Anal	Ambos	Total	%
Negados	26	18	1	45	94%
Referidos	3	0	0	3	6%
VIH positivo	genital	Anal	Ambos	Total	%
No referidos	29	16	1	46	95.8%
Referidos	0	2	0	2	4.2%
circuncisión	genital	Anal	Ambos	Total	%
no	27	15	1	43	90%
si	2	3	0	5	10%
Total	29	18	1	48	100%

Edad de inicio de vida sexual

La mayoría de pacientes estudiados, iniciaron su vida sexual activa antes de los 20 años. (Tabla 9).

TABLA 9. EDAD DE INICIO DE LA VIDA SEXUAL ACTIVA

Edad de inicio de vida sexual	genital	Anal	Ambos	Total	%
10 a 15 años	6	6	0	12	25%
16 a 20 años	21	12	0	33	69%
21 a 25 años	1	0	1	2	4%
más de 25 años	1	0	0	1	2%
Total	29	18	1	48	100%



Fuente: Consulta externa del CDP

Gráfica 6

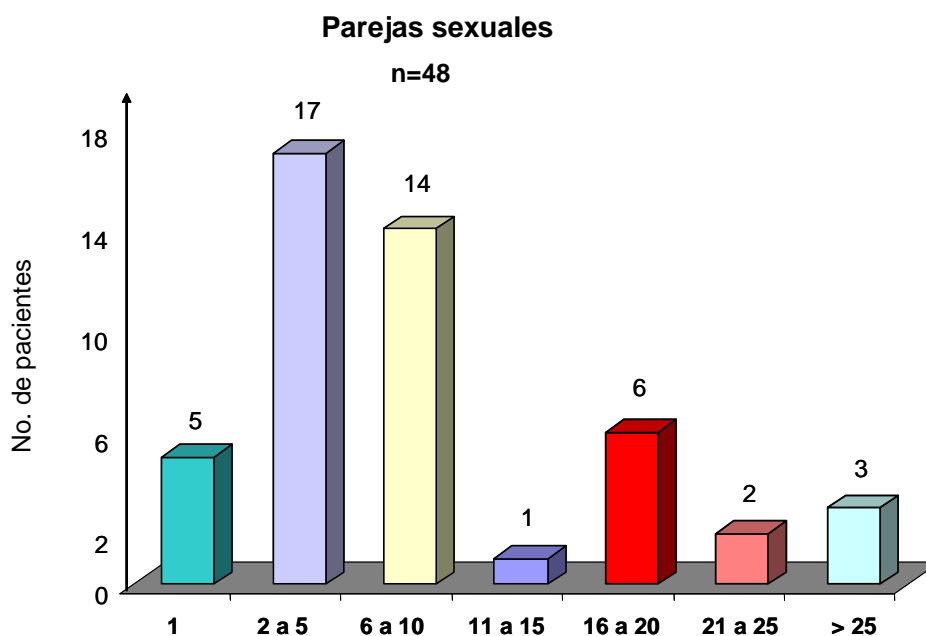
Parejas sexuales

De los pacientes estudiados, los que tuvieron de 2 a 5 parejas sexuales, presentaron el porcentaje mayor (35%), seguido por los pacientes con 6 a 10 parejas sexuales (29%). (Tabla 10).

TABLA 10. Número de parejas en el transcurso de la vida

Parejas sexuales	genital	Anal	Ambas	Total	%
1	3	1	0	5	10%
2 a 5	12	5	0	17	35%
6 a 10	7	6	1	14	29%
11 a 15	0	1	0	1	2%
16 a 20	3	3	0	6	13%
21 a 25	2	0	0	2	4%
mas de 25 *	2	1	0	3	6%
Total	29	17	1	48	100%

* En un caso se refirió más de 100 parejas sexuales



Fuente: Consulta externa del CDP

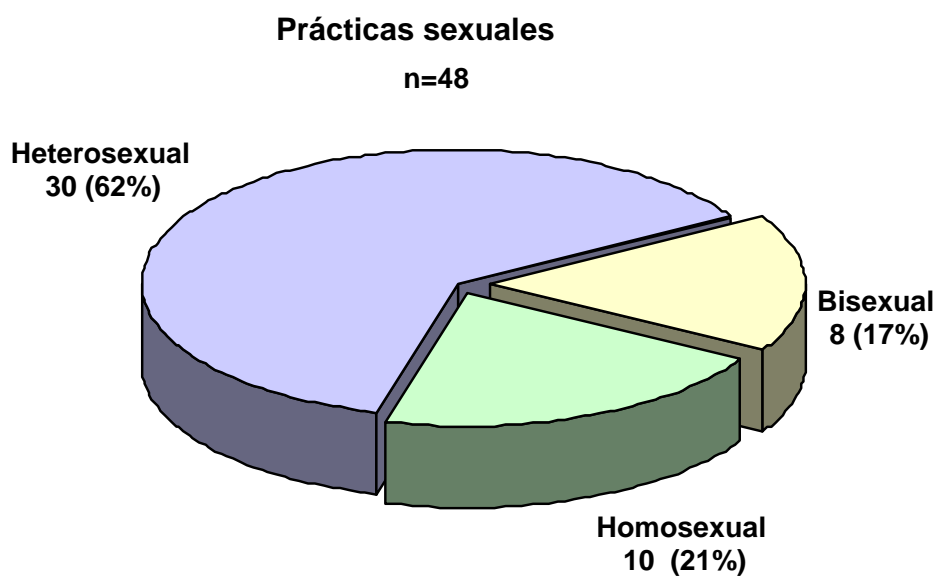
Gráfica 7

Práctica sexual

En cuanto a la práctica sexual, la mayoría de pacientes estudiados son heterosexuales, seguidos por homosexuales. (Tabla 11)

TABLA 11. PRÁCTICA SEXUAL

Relación sexual	Genital	Anal	Ambas	Total	%
Homosexual	2	7	1	10	20.8%
Heterosexual	24	6	0	30	62.5%
Bisexual	3	5	0	8	16.7%
Total	29	18	1	48	100.0%



Fuente: Consulta externa del CDP

Gráfica 8

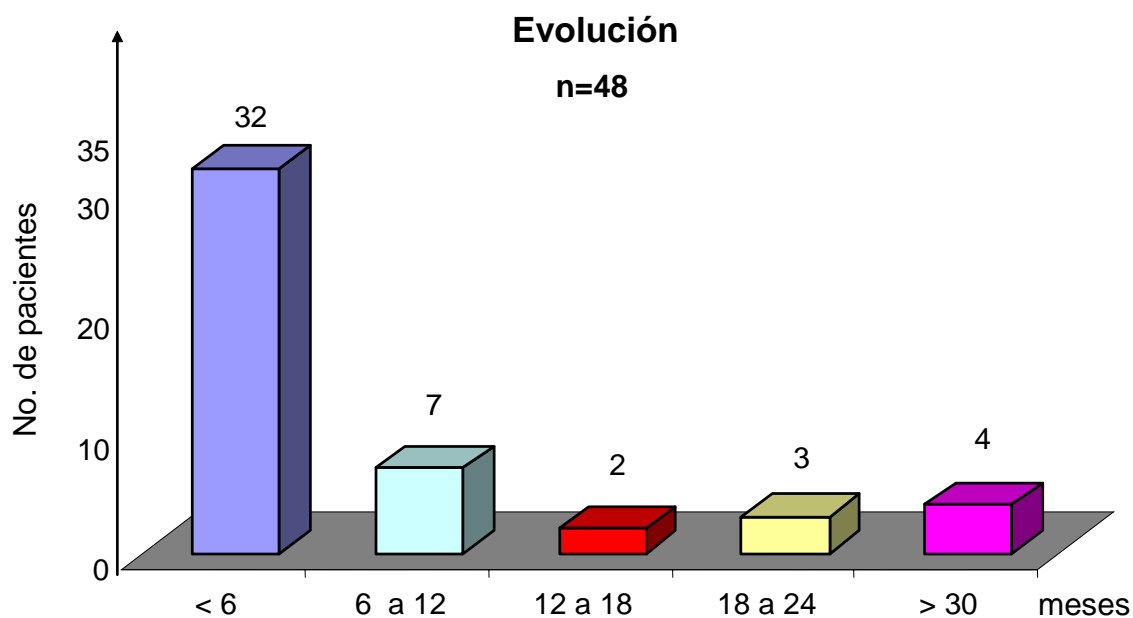
Evolución

Tanto los pacientes con topografía genital como anal, el tiempo de evolución fue menor de 6 meses, seguido de 6 a 12 meses. (Tabla 12).

TABLA 12 . EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES EN MESES.

Gpo x evolución	genital	Anal	Ambas	Total	%
< 6	20	11	1	32	67%
6 a 12	4	3	0	7	15%
12 a 18	1	1	0	2	4%
18 a 24	2	1	0	3	6%
> 30 *	2	2	0	4	8%
Total	29	18	1	48	100%

* Un paciente con evolución de 96 meses era VIH positivo.



Fuente: Consulta externa del CDP

Gráfica 9

GENOTIPOS

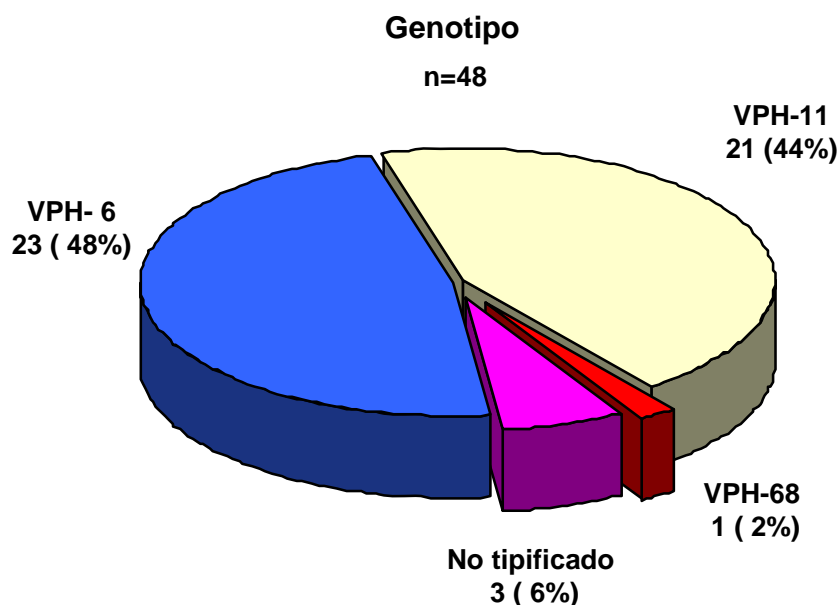
Al realizar la genotipificación, se encontró que el genotipo 6 , representó el mayor porcentaje (47.9%), seguido del genotipo 11 en el 43.8% de los pacientes. El genotipo 68 únicamente se aisló en una muestra y en 3 pacientes no se pudo genotipificar el virus, por pérdida de tejido durante su procesamiento.

En ningún caso se encontró mas de un genotipo. (Tabla 13)

TABLA 13 . GENOTIPOS DETECTADOS

Genotipo	genital	Anal	ambos	Total	%
VPH-6	13	9	1	23	47.9%
VPH-11	15	6	0	21	43.8%
*VPH-68	0	1	0	1	2.1%
No tipificado	1	2	0	3	6.3%
Total	29	18	1	48	100.0%

*Genotipo de riesgo oncogénico.



Fuente: Consulta externa del CDP

Gráfica 10

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, se eliminaron 4 muestras estudiadas, 3 por no haberse tipificado el virus, y una por ser genotipo 68, de esta manera se homogeneizó la muestra. (Tabla 14)

TABLA 14. ASOCIACIÓN DE GENOTIPO CON TOPOGRAFÍA

X^2	Topografía			
Genotipo	genital	anal	Ambos	Total
6	13	9	1	23
11	15	6	0	21
Total	28	15	1	44

Se exploró la asociación entre el genotipo 6 y 11 con la topografía de la dermatosis mediante X^2 y razón de momios. Para el genotipo 6 con localización genital se obtuvo una fuerza de asociación de 0.45 (IC95% 0.12-1.7) $p = 0.20$, el genotipo 6 y localización anal , la asociación de 1.7 (IC 95%0.45-6.0) $p= 0.33$ para el genotipo 11 con localización genital la asociación fue de 1.62 (IC95%0.46-5.7) $p=0.33$, el genotipo 11 con localización anal, su asociación fue de 0.75 (IC95%0.22-2.6) $p= 0.44$

OTROS HALLAZGOS

Los dos pacientes cuyas lesiones eran acentuadamente queratósicas y de mayor tamaño tuvieron antecedente de DM2, uno con diagnóstico previo, y el otro que fue diagnosticado secundariamente al estudio.

El paciente en el que se tipificó el VPH-68 (de alto riesgo), presentaba coinfección por VIH, diagnosticado 13 años antes y fue uno de los casos cuya evolución de las lesiones era de mayor tiempo (5 años), estaba con tratamiento antirretroviral con Lopinavir, Ritonavir, Efavirens, Lamivudina (3TC) y AZT, su último control de CD4 era de 486 células y con carga viral indetectable. (Foto 9)



Foto 9. Paciente del género masculino, de 35 años de edad con dermatosis localizada a región perianal, constituida por neoformaciones vegetantes hiperpigmentadas , con una evolución de 5años.

11. CONCLUSIONES

Los genotipos identificados en las lesiones, fueron 6 y 11 y se observaron en proporción similar.

Solamente en un caso se identificó un genotipo de alto riesgo para oncogenia (VPH 68).

No se encontró asociación entre ninguna de las variables clínicas ni epidemiológicas, con el genotipo detectado.

12. COMENTARIO

En este trabajo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se aplicó a todas las muestras obtenidas, de los pacientes con diagnóstico clínico de condilomas acuminados, sin embargo hay que recordar que no es un recurso de rutina, pero ofrece grandes ventajas desde el punto de vista de investigación.

En el estudio de pacientes VIH positivos, en los que la literatura internacional refiere la presencia de otros genotipos diferentes, puede ofrecer datos interesantes.

El único genotipo que difirió al 6 y 11, fue el 68 (genotipo de alto riesgo para oncogenicidad) y fue aislado en un paciente enfermo de SIDA.

Es un dato interesante que los genotipos oncogénicos 16 y 18 no fueron encontrados en ninguna de las muestras, de donde se puede cuestionar la utilidad de la vacuna de VPH que actualmente se está promoviendo como el mejor recurso para prevenir el cáncer cervicouterino.

Todos los pacientes que ingresaron al estudio contaban con serología para descartar coinfección por VIH, en aquellos en los que resultó negativa, se

mantienen en seguimiento con prueba de ELISA para VIH a los 6 meses, como establece la rutina del servicio de E.T.S. , tomando en cuenta los estudios que sugieren que la presencia de VIH facilita tanto la reinfección como la reactivación de VPH.

El conocimiento del genotipo viral en los condilomas acuminados, en un mayor número de pacientes mexicanos, nos ofrecerá un panorama más real del problema en nuestro medio.

Algunos estudios refieren que el tamaño de las los condilomas acuminados son mayores en pacientes VIH positivos, sin embargo en este estudio, llamó la atención que las lesiones mas grandes y queratósicas se encontraron en pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitas tipo 2.

Todos los pacientes que ingresaron al estudio contaban con serología para descartar coinfección por VIH, en aquellos en los que resultó negativa, se mantiene el seguimiento con prueba de ELISA para VIH a los 6 meses, como establece la rutina del servicio de E.T.S. ya que existen estudios que sugieren que la presencia de VIH facilita tanto la reinfección como la reactivación de VPH.

12. ANEXOS

Forma de recolección de datos

Consentimiento informado

Bibliografía

FORMA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ficha de Identificación

Nombre:

Edad:

Estado Civil:

Ocupación:

Escolaridad:

Teléfono:

Expediente

Antecedentes Personales Patológicos

¿Ha padecido o padece alguna de las siguientes enfermedades?

- Alérgicos: especificar _____
- Infección de transmisión sexual No _____ Sí _____ Cuáles _____
- Diabetes mellitus No _____ Sí _____
- VIH No _____ Sí _____
- Cáncer No _____ Sí _____
- Toma corticoesteroides No _____ Sí _____
- Circuncisión No _____ Sí _____
- I.V.S.A.
- Número de parejas sexuales hasta la fecha. _____
- Ha tenido relaciones sexuales con hombres? No _____ Sí _____
- Ha tenido relaciones sexuales con mujeres? No _____ Sí _____

Evolución

- Fecha de inicio: _____
- Sitio de inicio: _____
- Tratamientos previos: No _____ Sí _____
En caso afirmativo especifique cuáles _____
Por cuánto tiempo los empleó _____
Presentó mejoría: No _____ Sí _____
Fecha de último tratamiento _____

TOPOGRAFÍA

- Sitio de la lesión : Genital _____ Anal _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Los condilomas acuminados son neoformaciones (tumores benignos) localizados en área genital o anal, éstos se han relacionado con el virus del papiloma humano tipo 6 y 11, sin embargo existen otros virus de esta familia que pueden presentarse en estos tumores y ocasionar otras lesiones malignas, estos virus pueden no ocasionar síntomas y el paciente ser portador toda la vida, sin saberlo. La principal forma de contagio es la transmisión a través de relaciones sexuales. En México no se han realizado estudios en hombres para saber el tipo de virus que se encuentran en esta clase de neoformaciones, por lo que ha sido invitado para participar en este estudio con el fin de analizar el virus encontrado en las lesiones que usted presenta. Esto se llevará a cabo mediante el estudio de una biopsia por rasurado, que consiste en tomar un fragmento de tejido de la lesión, previa anestesia local (mediante la aplicación de una sustancia anestésica) así mismo se tomará una muestra de sangre periférica para descartar la presencia de VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), posteriormente se analizará el material en un laboratorio especial. Toda la información será manejada de forma confidencial. Usted deberá acudir a 3 consultas, en la primera se realizará exploración física, interrogatorio, en la segunda se tomará muestra de sangre periférica y biopsia por rasurado. En la tercera al finalizar el estudio se le proporcionará el resultado con la orientación conveniente. El tratamiento y el seguimiento de la enfermedad que presenta se llevará a cabo en la clínica de ETS (Enfermedades de transmisión sexual) de este centro, ubicado en el segundo piso. En caso de no aceptar o abandonar el protocolo, seguirá siendo paciente de este centro y no repercutirá en su atención.

Riesgos y efectos secundarios posterior a realizar estudio:

Puede presentarse hematoma (cambio de coloración en el sitio de punción o toma de biopsia). En caso de que se presente se dará seguimiento.

En la ciudad de México DF. El día _____ de _____ del año 200__

Una vez que he sido informado cabalmente de la naturaleza, propósito, expectativas del estudio, autorizo al personal del Centro Dermatológico Pascua, para que lleve a cabo el protocolo de referencia asumiendo voluntariamente todas las consecuencias que del mismo derive.

NOMBRE Y FIRMA
PACIENTE

PADRE O (TUTOR)

TESTIGO

TESTIGO

MÉDICO

BIBLIOGRAFÍA

1. Wieland U, Fister P. Papillomavirus in human Pathology: Epidemiology, patogenesis and oncogenesis role,. En Human Papilloma Virus Infection Clinical Atlas Ed. Gross G, Barrasco Mosby 1997; 1-3.
2. Longworth Michelle S. and Laimins Laimonis A. Patogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68, 362-372.
3. Stephn K. Tying. Human papillomavirus infectios: Epidemiology, pathogenesis and host immune response J Am Acad Dermatol 2000, 43: S18-S26
4. Schiffman M, Castle P Human Papillomavirus Epidemiology and Public Health Arch Pathol Lab Med 2003:127; 930-934.
5. Sykes Condyloma Acuminatum International Journal of Dermatology 1995, 34; 297-302.
6. Brown D, Bryan J, Cramer H, Fife K Analysis of Human Papillomavirus Types in Exophytic Condylomata Acuminata by Hybrid Capture and Southern Blot Techniques. Journal of Clinical Microbiology 1993:31; 2667-2673
7. Christopher B, Buck, Cynthia D. Thompson, Yuk-YingS Pang, Douglas R. Lowy, and John T. Schiller. Maturation of Papillomavirus Capsids Journal of Virology 2005, 79, 2839-2846.
8. Burd E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer Clinical Microbiology Reviews 2003, 16, 1-17
9. Pompeo Donofrio En: Atlante Di Patologia Cutaneo-Mucosa Da HPV Edizione DERMO- Napoli 2001 pp63.
10. Nebesio C, Mirowski G W, Chuang T Human papillomavirus: clinical significance and malignant potential International Journal of Dermatology 2001:40, 373-379
11. Rowson K and Mahy W Human papova (Wart) Virus Bacteriological Reviews 1967, 31, 110-131.
12. Kousty L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Am J Med 1997;102:3-8.

13. Jiménez Hernández F Diagnóstico y tratamiento de condilomas acuminados. *Dermatología Rev Mex* 1998, 42. 203-208
14. Coutlée François, Rouleau Danielle, Petignat P, Ghattas G, Kornegay, Schlag P, Boye S, Hankins C, Vézina S, Côté p, Macleod J, Voyer H, Forest P, Walmsley S, Franco E. Enhanced Detection and Typing of Human Papillomavirus (HPV) DNA in Anogenital Samples with PGMV Primers and the Linear Array HPV Genotyping Test. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44, 1998-2006.
15. Aynaud O, Piron D, Barraso R, Poveda JD, Comparision of clinical, histological, and virological symptoms of HPV in HIV-1 infected men and immunocompetent subjects. *Sex Transm Inf* 1998; 74:32-34
16. Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frias Mendivil M, Solorza G, Lazcano M Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública de México* 2004, 46:7-15
17. Ortiz M, Torres M, Muñoz L, Fernández-García E, Canals J, I. Cabornero A, ÇAguilar E, Ballesteros J, del Amo J and García-Sáiz A. Oncogenic Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution and HPV Type 16 E6 Variants in Two Spanish Population Groups with Different Levels of HPV Infection Risk. *Journal of Clinical Microbiology* 2006,44: 4; 1428-1434
18. Calleja-Macias I, Villa L, Prado J Kalatari M, Allan B, Williamson A, Chung <L, Collins R, Zuna R, Dunn S, Chu T, Cubie H, Cushcieri K, Knebel-Doerberitz M, Martins C, Sanchez G, Bosfch X, Munoz N and I Sanchez G. Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31,35,52 and 58, tour Close Relatives of Human Papillomavirus Type 16 *Journal of Virology* 2005,79, 13630-13640
19. External Genital Warts: Diagnosis, Treatment, and Prevention *CID* 2002;35 (Suppl 2) S210-224
20. Heinzl P, Chan S, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo M, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, Steinberg B, Tay S, Villa L and Bernard H. Variation of

- Human Papillomavirus Type 6 (HPV-6) and HPV-11 Genomes Sampled throughout the World. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33, 1746-1754.
21. Villiers E, Fauquet C, Broker T, Bernard H and Hausen H.. Classification of papillomaviruses *Virology* 2004, 324, 17-27
 22. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution, and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl 1): S1-6.
 23. Zafra G, García E, Mallet A, Saad A, Pedraza L, Villalobos S, Quintero P, Aguirre X y Gariglio P. Gen Detección y Tipificación del Virus del Papiloma Humano por PCR , en muestras de exudado cervical. *Rev Biomed* 1998; 9: 143.
 24. Lazcano E, Herrero R, Muñoz N, Hernández M, Salmerón J, Leyva A et al. High prevalence of human papillomavirus infection in Mexican males. Comparative study of penile-urethral swabs and urine samples. *Sex Transm Dis* 2001;28:277-280
 25. Sánchez –Aleman MA, Uribe Salas F, Conde-González CJ. La infección por el virus del papiloma humano, un posible marcador biológico de comportamiento sexual en estudiantes universitarios. *Salud Publica Mex* 2002;44:442-447
 - 26... Alvarez Salas LM, Lopez Bayghen. Regulación Genética de los Papilomavirus humanos Genitales. *Salud Publica de México* 1995: 37; 240-247.
 27. Heber Christy M and Laimins Laimonis A Human papillomaviruses: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006; 16: 83-97.
 28. Riethmuller D. Physiopathologie et épidémiologie des maladies ano-génitales à HPV. *Ann Dermatol Venereol* 2000;127(Suppl.):3S5-3S9.
 29. Partridge Jeffrey M, Koutsky Laura A Genital human papillomavirus infection in men . *Lancet Infect Dis* 2006; 6:21-31.
 30. Shao J, Zhou M, Ye Y. Detection of human papillomavirus in condyloma acuminata tissues *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 1995 Feb;24(1):46-8
 31. Labropoulou V, Balamotis A, Tosca A, Rotola A, Mavromara-Nazos P. . Typing of human papillomaviruses in condylomata acuminata from Greece. *J Med Virol.* 1994 Mar;42(3):259-63

32. Grace M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozencic J, Pavelic K. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res.* 2000 May-Jun;20(3B):2097-102.
33. Ahmed A, Madkan V, Tyring S, Human Papillomaviruses and Genital Disease *Dermatol Clin* 2006, 24, 157-165.
34. Smits P, Bakker R, Jong E, Mulder J, Meenhorst P, Kleter B, Doorn L and Quint W. High Prevalence of Human Papillomavirus Infections in Urine Samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Men. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43, 5936,5939.
35. Spano J.P, Marcelin A G, Carelin G, Cancer et infection à papillomavirus humain *Bull Cancer* 2005;92:59-64.
36. Aguirre Rodríguez Dolores Aurora. Dermatoses más frecuentes en genitales masculinos. Tesis UNAM , 1984
37. Weedon D., Strutton G . En: *Piel Patología* Marban 2002, pp: 596
38. Maw R Anogenital warts. *Sex Transm Inf* 2006; 82; 40-41.
39. Krejci Elaine B and Sanchez Marlene L. Genital Human Papillomavirus infection *Clinics in Family Practice* 2005, 7,79-96.
40. Dunne Eileen F, Burstein Gale R, Stone Katherine. Anogenital human papillomavirus infection in males *Adolescent Medicine* 2003, 14, 3
41. Rivera A, Tyring S. Therapy of cutaneous human Papillomavirus infections. *Dermatologic Therapy* 2004, 17, 441-448
42. Swinehart, Malcolm Sperling, Stephen Phillips, Setephe Kraus, Seephen Gordon et cols. Intralesional fluorouracil/ Epinephrine Injectable Gel for Treatment of Condylomata Acuminata. *Arch Dermatol* 1997;133:67-73.
43. Ting P, Dytoc M, Therapy of external anogenital warts and molluscum contagiosum: a literatura review. *Dermatologic Therapy*, 2004; 17, 68-101
44. Lipke Michelle M. An Armamentarium of Wart Treatments. *Clinical Medicine Research* 2006; 4, 273-293.
45. Lehmann V, Kiep E, Pobel C. Prise en charge des condylomes acuminés externs: revue de la littérature *JPharm Clin* 2005; 24: 61-9

46. Lacey CJ. Therapy for genital human papillomavirus related disease. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl 1):S82-90.
47. McMillan A. The management of difficult anogenital warts. *Sex Transm Inf.* 1999; 75; 192-194.
48. Mahe E, Descamps V, Bouscarat F, Crickx B. Management of external genital warts by dermatologists: a French survey. *Ann Dermatol Venereol* 2002; 129:997-1002.
49. Carrasco D, Vander Straten M, Tying SK. Treatment of anogenital warts with imiquimod 5% cream followed by surgical excision of residual lesions. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47(4 Suppl): S212-6.
50. Edwards L, Ferenczy A, Eron L, Baker D, Owens ML, Fox TL. Self administered topical 5% imiquimod cream for external genital warts. *Arch Dermatol* 1998; 134:25-30.
51. Munkagaard. Blackwell Human papillomavirus infection *American Journal of Transplantation* 2004; 4(suppl 10):95-100.
52. Winer R, Hughes J, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat N, Holmes and Koutsky L. *N Engl J Med* 2006;354:2645-54.
53. Dereure O, Augias D, Guilhou Il et Basset-Seguin N. *Giologie et génétique moléculaires. Encycl Méd Chir, Dermatologie*, 98-110-A-10,1999,22p.
54. Louis M, Louis L, Simor A. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ* 2000; 163: 301-9.
55. Brentjens MH, Kimberly MS, Yeung-Yue, Lee PC, Tying S. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin* 2002;20, 315-331
56. Von Krogh G, Lacey CJN, Barrasso R and Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex. Transm Inf* 2000; 76:62-168.
57. García-Rojo M, Morillo-Castro A *Dermatología Peruana* 1999, 9(sup.1):5-40.
58. Orozco Topete R. La biología Molecular y la investigación en Dermatología *Rev Invest Clin* 2003;55(2):168-171