



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE VIRUS DE PAPILOMA  
HUMANO EN VERRUGAS CUTÁNEAS DE PACIENTES MEXICANOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestra en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:

MARTHA DELINA SÁNCHEZ BARRIOS

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

† DR. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D. F., Noviembre, 2013



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.

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá, en la Unidad de Investigación de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología contando con el apoyo de la beca de posgrado de CONACYT.

El Comité tutorial que asesoró esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
†Dr. Ernesto Méndez Salinas	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la asesoría académica de la M.C. Silvia C. Galván Herrera del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el análisis de secuencias y durante todo el desarrollo de esta tesis.

Se reconoce la asesoría académica y colaboración de la Dra. María del Refugio González Losa del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, UADY. Así también se reconoce la colaboración del Dr. José Cerón Espinosa del Centro Dermatológico por su asesoría en el diagnóstico, recopilación de información clínica y muestras biológicas utilizadas en este trabajo.

Se reconoce el apoyo técnico y asesoría del M. en C. Heriberto A. Valencia González en el desarrollo de esta tesis. Se reconoce el apoyo técnico de la M. en C. Miriam C. Guido Jiménez y M. en C. Rocío S. Méndez Martínez.

Of. No. PMDCB/820/2012

**QFB. MARTHA DELINA SÁNCHEZ BARRIOS**  
**Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

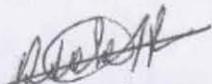
Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 17 de Septiembre del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada "Determinación de los genotipos de Virus de Papiloma Humano en verrugas cutáneas de pacientes mexicanos", dirigida por el Dr. Alejandro García Carrancá.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

PRESIDENTE	Dr. Luis Padilla Noriega
VOCAL	Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz
VOCAL	Dra. Leticia Rocha Zavaleta
VOCAL	Dra. Yolanda López Vidal
SECRETARIO	Dr. Vicente Madrid Marina

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de Septiembre de 2012.  
**EL COORDINADOR DE ENTIDAD**

  
**DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES**

C.c.p. Archivo

RRS\*lgg



## AGRADECIMIENTOS

Al comienzo de ésta travesía no imaginé contar con el apoyo de tanta gente. Hoy al ver hacia atrás me doy cuenta de todas las manos que me han extendido y todas las muestras de cariño que he recibido.

Quiero agradecer a mis Padres Olivia y Herculano, por todo el esfuerzo y sacrificios que han hecho para educarnos no solamente en lo académico si no por todas las herramientas, consejos y enseñanzas, gracias porque siempre me ha apoyado en todos los caminos que he recorrido, a pesar las decisiones que he tomado. Estar lejos de ustedes ha sido una de las cosas más difíciles que he tenido que vivir, pero he aprendido que a luchar por lo que quiero y a pesar todo, seguir adelante. Sepan que son y serán siempre mi base fundamental. A mis hermanos: Carmen, Paty y Fernando y Abuelo; los quiero mucho.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por su apoyo y comprensión a lo largo de éste proyecto, por su voto de confianza a cada momento.

Un agradecimiento especial a la Dra. María del Refugio González Losa por sus sabios consejos, su guía a pesar de la distancia, por su cariño, por su disposición e incondicional apoyo. Fue la luz en un momento de oscuridad. Gracias.

A la MC Silvia Galván, ha sido una suerte contar con tu apoyo todo este tiempo. Gracias por las charlas amenas, los cafecitos y la amistad que me has brindado, estoy segura que nuestra colaboración seguirá rindiendo frutos.

Gracias Ma. Angélica García González por tu amor, comprensión y cariño todo este tiempo, por el impulso que me has dado en cada proyecto que he emprendido, por tu constancia, por tu paciencia y por soportarme en mis peores momentos. ¡Gracias!

Heriberto A. Valencia por todo el apoyo, por su cariño y amistad. Y a todos los aquellos que han intervenido en este logro: Elenaé, Verito, Peter, Grace, Chio, Miri, y a todos los compañeros del laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología por su amistad y buena disposición en los momentos clave.

# Índice

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
	A. Verrugas Cutáneas.....	2
	1. Definición y clasificación.....	2
	2. Datos epidemiológicos.....	4
	B. Virus del Papiloma Humano y Verrugas Cutáneas.....	6
	1. Características biológicas del Virus del Papiloma Humano.....	6
	2. Clasificación de los VPH.....	8
	3. Patogénesis de las verrugas cutáneas por VPH.....	10
	4. Genotipos de VPH implicados en el desarrollo de Verrugas Cutáneas.....	11
	5. Las variantes intratipo de VPH2.....	15
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
IV.	HIPÓTESIS.....	18
V.	OBJETIVOS.....	18
	A. Objetivo General.....	18
	B. Objetivos específicos.....	18
VI.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	18
	A. Tipo de Estudio.....	19
	B. Población de Estudio.....	19
	C. Criterios de Inclusión.....	19
	D. Criterios de exclusión.....	19

E.	Criterios de eliminación. ....	19
VII.	METODOLOGÍA.....	19
A.	Extracción de ADN. ....	20
B.	Calidad e integridad de ADN. ....	20
C.	Detección de VPH. ....	21
D.	PCR para determinación de variantes de LCR en muestras VPH2 positivas. ....	23
E.	Secuenciación para genotipificación y análisis de variantes.....	23
F.	Análisis de resultados. ....	24
VIII.	RESULTADOS. ....	25
A.	Características de la población. ....	25
B.	Detección de VPH. ....	27
C.	Variantes en LCR de VPH2. ....	29
IX.	DISCUSIÓN .....	34
X.	REFERENCIAS.....	38
XI.	ANEXOS.....	42
A.	Anexo I. Carta de Consentimiento Informado. ....	42

## Índice de figuras

Figura 1. Clasificación clínica de Verrugas Cutáneas. ....	4
Figura 2. Genoma del VPH2.....	8
Figura 3. Infección productiva por VPH. ....	11
Figura 4. Las VCs son más frecuentes en la infancia y pubertad de la población estudiada.....	25
Figura 5. Las manos son el sitio anatómico en el que se desarrollan VCs con mayor frecuencia en la población estudiada. ....	26
Figura 6. El 35% de nuestra población presenta Verrugas Cutáneas con una persistencia de un año. ....	27
Figura 7. La PCR anidada múltiple hace más eficiente la detección de VPH cutáneos. ....	28
Figura 8. Distribución de los genotipos de VPH. ....	29
Figura 9. Amplificados de LCR en muestras VPH2 positivas. ....	30
Figura 10. Una inserción de T en la posición 7350' es constante en las variantes identificadas en nuestra población. ....	31
Figura 11. Las variantes encontradas en nuestra población distan filogenéticamente de las variantes descritas. ....	33

## Índice de Tablas

Tabla 1. Genotipos de VPH identificados en estudios de verrugas cutáneas no genitales. ....	14
Tabla 2. Cambios nucleotídicos en LCR de variantes y aislados descritos de VPH2. ....	17
Tabla 3. Característica de oligonucleótidos empleados y productos obtenidos. ....	21
Tabla 4. Condiciones de reacción para la NMPCR. ....	22
Tabla 5. Programa de amplificación para NMPCR. ....	22
Tabla 6. Se identificaron 3 nuevas variantes putativas en la población mexicana, ninguna secuencia coincide con la prototipo. ....	32

## I. RESUMEN

La piel, el órgano más extenso del cuerpo humano, desempeña una gran variedad de funciones como son la termorregulación, la detección de distintos estímulos sensoriales que provienen del medio ambiente, protección contra las radiaciones ultravioleta y principalmente como protección ante los agresores físicos como son frío, calor, humedad y también contra agentes patógenos biológicos como los virus, bacterias y hongos. Una de las patologías cutáneas más comunes son las Verrugas Cutáneas (VCs), estas son proliferaciones benignas ocasionadas por la infección con el Virus de Papiloma Humano (VPH). Los Papilomavirus son una familia de virus pequeños (~8,000 pb) de doble cadena de ADN circular con más de 160 genotipos descritos hasta el momento. Una de sus principales características es que presentan tropismo, el cual se caracteriza por habilidad específica de infectar y replicarse en una población particular de células: las células epiteliales, de este hecho que se halla denominado Papilomavirus *mucosos* ó *cutáneos*, dependiendo del tipo de epitelio que infecten.

Las Verrugas cutáneas se clasifican clínicamente en Verrugas Genitales y Verrugas Comunes; las primeras también llamadas *Condiloma acuminado* se han asociado a la infección de VPH tipo 6 y 11; mientras que considera que las Verrugas Comunes están asociadas a la infección de por más de 30 tipos de VPH, entre ellos los más frecuentes son 1, 2, 3, 4, 27 y 57; sin embargo pocos son los reportes epidemiológicos en el mundo que describan la distribución de genotipos en verrugas cutáneas, mucho menos hay reportes sobre el tema en nuestro país.

En el presente estudio nos enfocamos en la tipificación de los VPH en verrugas cutáneas, en la descripción de la población así como características clínicas de dichas lesiones. La población estudiada abarcó a 102 muestras de VCs tomadas por remoción quirúrgica. El 46% de los pacientes con verrugas son infantes y preadolescentes (1- 13 años), siendo las manos la principal localización de estas proliferaciones.

Identificamos a VPH2 como el genotipo más frecuente en 64% de las VCs en la población, seguido por VPH57 con 13% y VPH3 con 4%. No encontramos asociación entre genotipo identificado y presentación clínica. El análisis de variantes

del genotipo prevalente (VPH2) mostró que ninguna muestra corresponde a la prototipo ni a ninguna de las variantes descritas previamente, se identificaron tres nuevas variantes putativas en la población mexicana.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

### **A. Verrugas Cutáneas.**

#### **1. Definición y clasificación.**

Las verrugas son en general lesiones poco elevadas, vegetantes y autolimitadas. Son muy comunes en la población general, sobre todo en niños y adultos jóvenes, pese a esto su transmisión se considera poco frecuente. En su mayoría tienen una persistencia de meses y una regresión espontánea que ocurre en menos de 2 años desde la aparición, son auto-inoculables, ocasionando lesiones isomorfas sobre todo en sitios de traumatismo. Las VCs son causadas por infecciones por VPH inclusive se ha reportado una relación entre genotipo infectante y tipo de lesión clínica así como las características histológicas de la lesión (Gross G 1982). Estas infecciones pueden pasar inadvertidas por periodos que abarcan de 1 a 20 meses, inicialmente se mantienen como lesiones subclínicas y eventualmente inducen un lento crecimiento celular (Iglesias Diez L 2004).

Las VCs se clasifican inicialmente en genitales (también llamadas *Condiloma acuminado*) y no- genitales o Verrugas Comunes. (Messing AM 1963; Lowy DR 2001).

Las Verrugas Genitales o Condiloma Acuminado son lesiones que se consideran de transmisión sexual y se presentan en la piel de los genitales y región perianal. Se caracterizan por ser lesiones vegetantes de superficie granulosa y húmeda, blanda, del color de la piel, rosado o grisáceo. Pueden presentarse tres tipos: hiperplásico, sésil y verrucoide; siendo éste último hiperqueratósico y puede confundirse con las verrugas vulgares (Figura 1 I). (González Solís 2007; Dong H 2011)

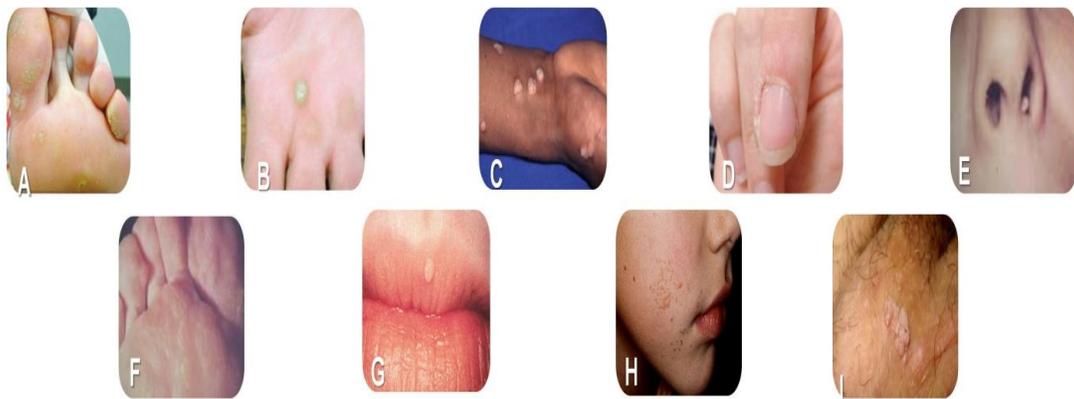
Las VCs no genitales se clasifican de acuerdo a su presentación clínica, morfología y localización en Verrugas Plantares, Palmares, Comunes, Periungueales, Filiformes, en Mosaico, Planas, Mirmerciales. (Plascencia 2000) (Figura 1).

Las Verrugas Comunes (*Verruca vulgaris*) son el tipo más frecuente, llamadas comúnmente mezquinos y representan aproximadamente el 70% de las verrugas cutáneas (Arenas Guzmán 2009). Se localizan en zonas expuestas, preferencialmente en las manos y en la región periungual, aunque pueden desarrollarse en cualquier parte de la piel incluyendo superficies palmares y plantares, cara, cuello y labios (Plascencia 2000). Pueden presentarse como únicas y aisladas ó múltiples y confluentes. Son semiesféricas, desde 3 a 5 mm hasta 1 cm, de superficie verrugosa, áspera y seca, del color de la piel o grisácea. Suelen ser asintomáticas a excepción de cuando se encuentran en el borde de la uña, en donde causan dolor y alteran el crecimiento de la misma. Se encuentran asociadas a los genotipos 2 y 4 de VPH principalmente y con menor frecuencia a los genotipos 1, 3, 6, 10, 26, 27, 28, 29 y 41 (Plascencia 2000; Lowy DR 2001). Las Verrugas Filiformes son una variante de la verrugas comunes caracterizadas por sus largas proyecciones tipo dedos, frecuentemente se encuentran en rostro, principalmente párpados, ala nasal y barba (Figura 1E) (Arenas Guzmán 2009; Jimenez Vieyra 2010).

Las Verrugas Plantares (*Verruca plantaris*) también llamadas “ojos de pescado” se localizan en las plantas y/o los dedos de los pies y manos. Son más comunes en adolescentes y adultos jóvenes, miden de 0.5 a 1 cm de diámetro. Pueden ser de tipo mirmercial solitarias, profundas y dolorosas, se asocian a la infección por VPH 1; ó múltiples con hasta 40 o 50 lesiones confluentes en una placa ligeramente abombada por ello llamadas en mosaico asociadas mayormente con el genotipo 2. Estas son dolorosas y bastante resistentes a tratamiento (Figura 1F). Otros genotipos de VPH asociados con las verrugas plantares son 4, 10, 27, 29 y 63 (Iglesias Diez L 2004).

Las Verrugas Planas (*Verruca plana*) o juveniles son el tipo menos frecuente, generalmente encontradas en niños. Son asintomáticas, predominan en el dorso de las manos, pueden ser escasas o muy abundantes.

Frecuentemente muestran una configuración lineal indicando contagio por autoinoculación por rascado, en adultos se encuentran en áreas de depilado como la barba en hombres y las piernas en mujeres. Se presentan como pequeñas pápulas apenas sobre-elevadas, lisas, de color de la piel o gris-amarillentas o parduscas, redondas o poligonales, de 2 a 4 mm de número variable: entre dos a centenares. Suelen ser difíciles de erradicar. Los genotipos de VPH asociados son 1, 3, 10, 11, 27, 28, 38 y 41 (Lowy DR 2001; Iglesias Diez L 2004; Arenas Guzmán 2009).



**Figura 1. Clasificación clínica de Verrugas Cutáneas.**

A. Verruga Plantar, B. Verruga Palmar C. Verruga Común con diseminación, D. Verruga Común Periungueal, E. Verruga Común Filiforme, F. Verruga Plantar en Mosaico, G. Verruga Común en boca, H. Verrugas Planas I. Verruga Genital.

Fuente: [http://www.consultorios-xanas.com.ar/hm/xanas\\_info\\_dermatologia\\_verrugas\\_virales.htm#thumb](http://www.consultorios-xanas.com.ar/hm/xanas_info_dermatologia_verrugas_virales.htm#thumb)

## 2. Datos epidemiológicos.

Las VCs afectan a personas de todas las razas, sexo y edad, con un pico de incidencia en la segunda década de la vida. En lo que respecta a las verrugas cutáneas, no genitales, se considera que afecta del 10 al 14% de la población. En Alemania se encuentra una incidencia infantil de 7.2%, en Estados Unidos una

incidencia del 10% principalmente en niños y adultos jóvenes, disminuyendo en la vejez. Esta patología se encuentra entre las 10 dermatosis más frecuentes en nuestro país, aunque existen pocos reportes acerca de la incidencia en población general. Magaña y cols. (Magaña GM 1995) señalan a las verrugas cutáneas como una de las 5 más frecuentes enfermedades de la piel en consultas pediátricas en el Hospital General de México.

El Centro Dermatológico de Pascua en la Ciudad de México señala que el 5% de los pacientes que acudieron a consulta en el primer semestre del año 2009 fueron tratados por verrugas cutáneas no genitales; de éstos, 47% presentaron verrugas planas, 46% verrugas vulgares y 7% plantares.(Cruz Pérez DMC 2011) Para ese mismo año el Departamento de Dermatología en el Hospital “Dr. Manuel Gea González” se observó una prevalencia del 3.6%. (Kilkenny M 1998; GM 2009; Cruz Pérez DMC 2011)

La transmisión de verrugas no genitales ocurre por contacto de persona a persona o indirectamente por fómites, se favorece con la existencia de lesiones o abrasiones en la piel; las piscinas y baños son lugares comunes para la propagación. Pacientes previamente infectados tienen un mayor riesgo para el desarrollo de nuevas verrugas que los que no han sido infectados. La autoinoculación es un medio común de propagación, en el caso de niños pequeños que muerden sus dedos suele ser el medio de esparcimiento a la región perioral o por rascado en la región perianal. Aproximadamente el 23% de las verrugas regresan espontáneamente en un periodo de 2 meses, 30% en menos de 3 meses y el 65% al 78% en 2 años. Las características clínicas que presentan las verrugas cutáneas difieren de persona a persona y se ve influida por diversos factores como el genotipo viral, el estado inmune del huésped, factores nutricionales entre otros. (Lipke 2006)

Orozco Topete y cols. reportan una asociación entre deficiencias nutricionales y el desarrollo de VCs en niños de una comunidad de Oaxaca con una prevalencia de 14.1% en niños mayores de 5 años, con número de lesiones que van de 1 hasta 20 VCs. (Orozco Topete R 2008)

Cuando las lesiones no se curan o recidivan en poco tiempo, se les denomina resistentes. Estas verrugas pueden ser deformantes, representan una carga psicológica considerable y son causa frecuente de consulta, lo

que justifica la investigación de los factores asociados que permitan desarrollar procedimientos efectivos para su curación. (Turbay 2007; Cruz Pérez DMC 2011)

La infección por VPH en genitales es la más común entre las infecciones de transmisión sexual. En Alemania la incidencia de verrugas genitales es de 113.7/100,000 personas por año; en España de 118/100,000; en Canadá 126/100,000 y en China se reporta 203.7/100,000 personas por año. En Estados Unidos se estima que el 2% de la población sexualmente activa presenta verrugas genitales. (Ferenczy 1995; Lin C 2010) En México no hay estudios epidemiológicos que reporten la incidencia en la población general, no obstante en mujeres mexicanas Jiménez Vieyra reporta una prevalencia de 3.2% de condilomas acuminados, con una mayor incidencia (21.6%) en el grupo de mujeres de entre 30 y 34 años. (Jimenez Vieyra 2010)

## **B. Virus del Papiloma Humano y Verrugas Cutáneas.**

### **1. Características biológicas del Virus del Papiloma Humano.**

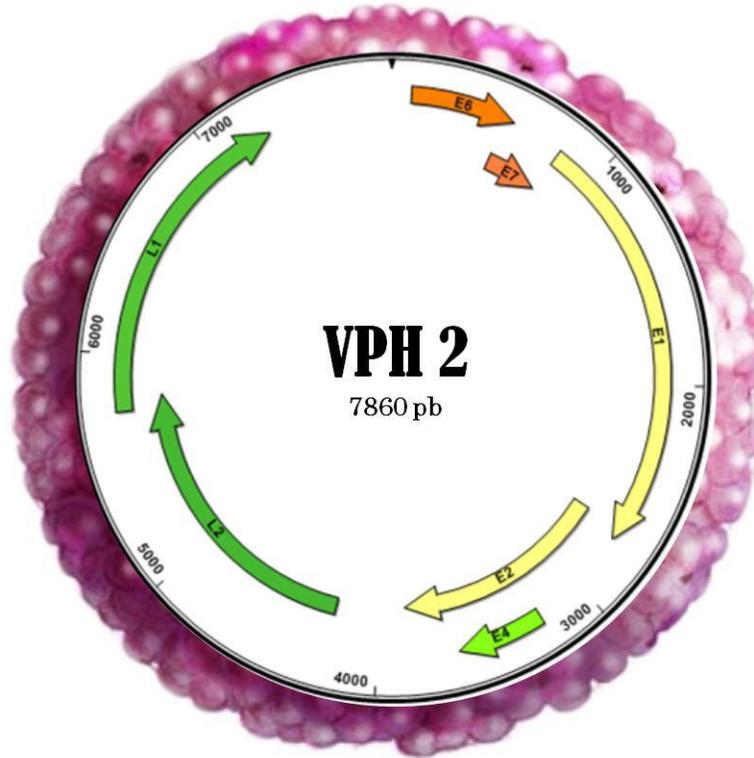
El VPH es un virus desnudo perteneciente a la familia *Papillomaviridae* de aproximadamente 55 nm de diámetro, posee una cápside icosaédrica de 72 capsómeros. Su genoma está constituido por ADN de doble cadena circular de aproximadamente 8000 pb. (Figura 2) La ausencia de membrana le confiere resistencia a la desecación. El genoma de los VPH está integrado comúnmente por ocho marcos de lectura abierta unidireccional (ORF por sus siglas en inglés), organizados en dos regiones de expresión: temprana (E) y tardía (L), así como una región reguladora denominada Región Larga de Control (LCR, por sus siglas en inglés). LCR comprende aproximadamente el 10% del genoma viral (~850 pb) contiene múltiples sitios de unión de factores de transcripción y se divide en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador y la región más alejada del extremo 5'. En ésta región se lleva a cabo la regulación de la transcripción y de la replicación viral, a través de su interacción con las proteínas E1, E2 y diversas proteínas celulares. La región de transcripción temprana codifica para proteínas relacionadas con la replicación, la transcripción y la transformación celular. Las proteínas E1 y E2 participan en la

replicación del ADN viral a través de su unión a la LCR. Forman un complejo (E2-E1), que le confiere una mayor afinidad a la secuencia de inicio en la LCR. Además E2 tiene funciones reguladoras de la transcripción viral mediante la modulación de la expresión de E6 y E7. Cuando la proteína E2 se encuentra en altos niveles, se enlaza como dímero a varios sitios en la LCR impidiendo la formación del complejo de transcripción eficiente de E6 y E7. (Lowy DR 2001; Ganguly N 2009)

La ORF E6 codifica la proteína E6 que tiene potencial oncogénico mediante la interacción con y posterior degradación de p53 (una proteína supresora de tumores), sin embargo los VPH de bajo riesgo oncogénico no tienen la capacidad de degradar p53, carecen del dominio PDZ y por tanto no interactúan con factores celulares asociados a tumorigenicidad. E7 es una proteína con una gran capacidad transformante por su interacción con la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (pRB). El enlace de E7 a pRB induce liberación de factores de transcripción (de la familia E2F), que promueven el progreso a la fase S del ciclo celular y por lo tanto a la replicación celular, en los VPH de alto riesgo oncogénico esta interacción tiene mucho mayor afinidad que con los de bajo riesgo, incluso llevan a la degradación de pRB. (Lowy DR 2001; Ganguly N 2009; Boily Jason 2011)

La proteína E4 se expresa tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo viral, cuando las partículas virales comienzan a ensamblarse, promueve la destrucción de los filamentos de queratina y de este modo la descamación de las células infectadas.

La región tardía codifica dos proteínas que forman parte de la cápside viral: L1 y L2, siendo L1 una región conservada entre todos los miembros de la familia. (Lowy DR 2001; IARC 2005)



**Figura 2. Genoma del VPH2.**

Fuente: Elaborada utilizando el programa computacional SeqBuilder Lasergene DNASTAR.

## 2. Clasificación de los VPH.

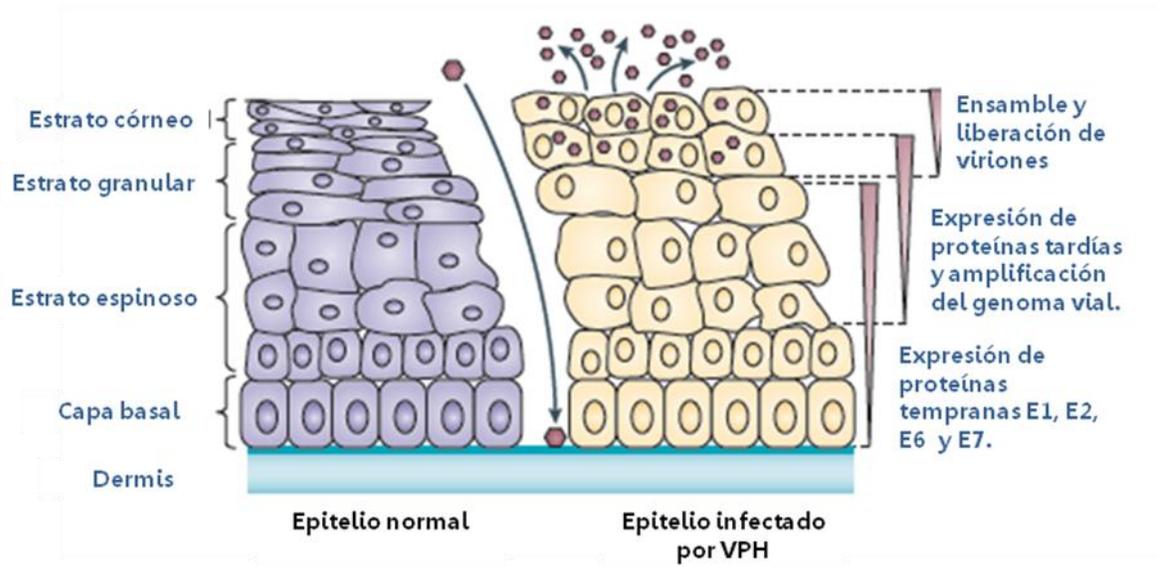
La clasificación vigente se basa en la caracterización del genoma; principalmente del segmento L1 que es altamente conservado en todos los VPH. Se considera un nuevo tipo de VPH si su genoma presenta una homología menor de 90% con otros genotipos conocidos de VPH. Cuando la homología se sitúa en el rango 90% a 98% indica un subtipo, y cuando la identidad es mayor de 98% pero menor del 100%, se considera que es una variante. Los genotipos son designados por números y los subtipos con letras, en su mayoría, de acuerdo al orden cronológico en el cual se aislaron y caracterizaron. (De Villiers EM 2004) Sin embargo a causa del tropismo que presentan los genotipos de VPH ésta particularidad fue utilizada para clasificarlos; en nuestros días aún se

les menciona en publicaciones como: *Cutáneos*, aquellos con la capacidad de afectar piel, como ocurre en el caso de las verrugas comunes y carentes de capacidad de inducir proliferación maligna. Entre estos encontramos los genotipos de VPH 1, 2, 4, 10, 27, 57, entre otros; *Mucosos*, aquellos asociados a patologías en mucosas, como condilomas acuminados, cáncer cervical, anal y orofaríngeo entre otros, en éste grupo se encuentran los VPH 6, 11, 16, 18, 31, etc., y los llamados *Tipo- EV* que han sido asociados al desarrollo de Epidermodisplasia verruciformis, en los pacientes estos suelen causar verrugas que aparentan ser comunes, pero que con el paso del tiempo tienden desarrollar carcinomas de piel, estudios recientes los han encontrado asociados también al desarrollo de carcinoma de piel en pacientes trasplantados, entre los genotipos identificados como tipos EV se encuentran el VPH 5, 8, 20, 21, 22, 23, 25, entre otros. (Lowy DR 2001; Bernard 2005)

### 3. Patogénesis de las verrugas cutáneas por VPH.

Los VPH son virus desnudos con la capacidad de resistir en el ambiente por un periodo prolongado de tiempo, esto a su vez favorece que la infección pueda ocurrir de persona a persona o de manera indirecta por medio de objetos contaminados, un tipo de infección frecuente es la autoinoculación de un sitio anatómico a otro. La infección se favorece por microtraumatismos mediante el cual el VPH entra en contacto con las células basales, a través de receptores de  $\alpha 6\beta 4$  integrinas, se internaliza y dentro del núcleo de las células basales, el genoma viral se mantiene como un episoma estable. La replicación viral inicia con la expresión de proteínas tempranas, principalmente E1 y E2, que forman el complejo de unión al sitio de inicio de la transcripción en LCR manteniéndose un número bajo de copias (de 30 a 50) por célula y comienza una fase de *latencia* en la cual se retarda la diferenciación de los queratinocitos basales favoreciendo la proliferación de queratinocitos basales infectados. En este momento se establece en los queratinocitos una infección no productiva ya que al final del ciclo no se forman partículas virales completas, esta es la infección subclínica y puede mantenerse hasta por 20 meses en la piel. Sin embargo, cuando la célula basal entra a la etapa de diferenciación ésta estimula la actividad de los genes virales tempranos, con lo que la replicación viral aumenta a cientos por célula. (Lowy DR 2001; IARC 2005)

E6 y E7 promueven la proliferación de las células en la etapa suprabasal con el fin de promover un mayor número de células infectadas; pese a esto, E2 regula negativamente su actividad con lo que se evita una proliferación incrementada en demasía que no permita completar la formación de viriones. Cuando la célula ya se encuentra en la etapa granular se inicia la expresión de genes tardíos (L1 y L2) con lo que se inicia el ensamblaje de los viriones, además se expresa E4 que como se expuso anteriormente degrada filamentos de queratina, altera el potencial de membrana mitocondrial y bloquea la actividad de E7. Con esto se cree que la liberación de viriones ocurre a través de la descamación de las células que los contienen, estableciéndose de este modo la infección productiva por VPH (Figura 3). (Lowy DR 2001)



**Figura 3. Infección productiva por VPH.**

A la izquierda se muestra un epitelio normal, las microabrasiones exponen la capa basal a la infección por VPH; a la derecha se muestra un epitelio infectado y los eventos clave en la infección productiva. Los hexágonos púrpura ejemplifican la cápside viral.

Fuente: Modificado de Moody C & Laimins L. (Moody 2010)

#### 4. Genotipos de VPH implicados en el desarrollo de Verrugas Cutáneas.

Las verrugas cutáneas han afectado al humano desde tiempos muy remotos, la naturaleza infecciosa de éstas lesiones hicieron sospechar la existencia de un agente etiológico pero no fue hasta 1949, a partir de la micrografía electrónica de partículas virales tomada de papilomas cutáneos que esto quedó demostrado. La asociación de los VPH de alto riesgo oncogénico con el desarrollo de cáncer cervical ha sido un gran descubrimiento que ha favorecido el estudio de éstos genotipos, naturalmente dejándose de lado aquellos asociados a lesiones benignas. (Jablonska S 1997; zur Hausen 2009)

Las verrugas genitales están fuertemente asociadas a los VPH 6 y 11, aunque también se ha identificado VPH16 y VPH2 entre otros genotipos; se consideran de transmisión sexual en adultos y presentan un bajo potencial para el desarrollo de carcinomas (Ferenczy 1995). En infantes se ha sugerido una relación entre el desarrollo de éstas (sobre todo de lesiones por VPH 6 y 11) con abuso sexual, sin embargo no se ha logrado establecer ésta asociación. La presencia de VPH2 en éstas lesiones se ha relacionado a una autoinoculación del paciente con historia de verrugas cutáneas no genitales. (Jayasinghe Y 2006)

Pocos son los estudios sobre VPH asociados a verrugas cutáneas, sobre todo de verrugas no genitales, uno de los estudios más completos y más mencionados en la literatura es el realizado por Rübber y cols. en Alemania, en el cuál se analizaron 202 muestras de verrugas cutáneas en el que reporta a VPH 2, 27 y 57 como los genotipos más frecuentes. (Rübber 1997)

Álvarez Ruíz y cols. llevaron a cabo un estudio en 21 pacientes españoles con verrugas cutáneas encontraron a VPH 2 y 57 como los más frecuentes en estas lesiones con un 38.4% (5/13) de frecuencia y 61.9% (13/21) de éxito en la detección. (Alvarez Ruíz S 2004)

En Japón, Hagiwara y cols. en un estudio de 213 pacientes con verrugas cutáneas reportan a los genotipos VPH 1, 4, 65 y 27 como los de mayor prevalencia con 44.1% (94/213), 16.4% (35/213), 14.1% (30/213) y 6.1% (13/213) respectivamente. Este estudio se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con 5 juegos de oligonucleótidos y así lograron un 100% de éxito en la detección y tipificación. (Hagiwara K 2005)

Un estudio realizado en verrugas cutáneas de pacientes con y sin infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) por Porro y cols. en Brazil reporta una prevalencia de VPH de 64% en los pacientes infectados contra una prevalencia del 79% en el grupo no infectado. En el grupo infectado se encontró VPH 2 con 38%, VPH 57 con 31% y VPH 27 con 12%, mientras que en el grupo no infectado por VIH se encontró a VPH 57 con 36%, VPH 27 con 27% y VPH 2 con 14%. (Porro AM 2003)

Estudios mas recientes incluyen los realizados por Köler y cols. donde comparan entre pacientes alemanes la presencia de genotipos de VPH en verrugas comunes y plantares de pacientes transplantados (OTR) contra pacientes inmunocompetentes (ICC). En este estudio se tuvo un éxito en la detección en muestras de los pacientes ICC del 92.6% (38/41) mediante una PCR anidada con los iniciadores MY09/11 y MYN9/10 y PCR con iniciadores CN1F/R y CN3F/R; reportan a VPH 27 como el más frecuente con un 26.3% (10/38), seguido por VPH 57 con 23.6% (9/38) y VPH 3 con 15.8% (6/38). (Köler A 2009)

En el estudio realizado por Lei y col. en China se analizaron biopsias de verrugas comunes de 48 pacientes, 27 embebidos en parafina y 21 tejidos congelados y reportan un éxito de detección del 85% con los iniciadores MY09/11 y 7 pares de iniciadores específicos para HPV 1, 2, 4, 7, 27, 57 y 67 diseñados por el autor. Las prevalencias de genotipos identificados por este grupo fueron: en primer lugar VPH 57 con 31.7% (13/48), seguido por VPH 1a con 29.3% (12/48), VPH 27 con un 17% (7/48) y VPH 5 con 12% (5/48). En la Tabla 1 se resumen la información aportada por los estudios previamente descritos. (Lei YJ 2009)

Tabla 1. Genotipos de VPH identificados en estudios de verrugas cutáneas no genitales.

Autor	Lugar y año de publicación	Tamaño de muestra	Tipo de muestra	Metodología utilizada	Genotipos más frecuentes (%)
Rübben y cols.	Alemania 1997	202	Verrugas comunes		2, 27 y 57
Porro y cols.	Brasil 2003	25 VIH positivos 14 VIH negativos	Biopsias de verrugas comunes	PCR con iniciadores MY09/11 y RK91, y secuenciación.	En VIH positivos: 2 (38%), 57 (31%) y 27 (12%) En VIH negativos: 57 (36%), 27 (27%) y 2 (14%)
Álvarez Ruiz y cols.	España 2004	21	Biopsias de verrugas comunes, palmoplantares, filiformes, mosaico y tipo butcher.	PCR con iniciadores MY09/11 y GP5/6, y secuenciación.	2 y 57 (38.4%) 7 y 10 (7.6%)
Hagiwara y cols.	Japón 2005	213	Afeitado de verrugas comunes	PCR con 5 pares de iniciadores (CPI, CPIIG, CPIIS, CPIII, CPIV, CPV y L1C1/C2), y secuenciación.	1 (44.1%) 4 (16.4%) 65 (14.1%)
Köler y cols.	Alemania 2009	41	Biopsias de verrugas comunes y plantares	PCR anidada con iniciadores MY09/11 y MYN9/10. PCR con oligos CN1F/R, CN3F/R. Hibridación en línea y secuenciación	27 (26.3%) 57 (23.6%) 3 (15.8%)
Lei y cols.	China 2009	48	27 biopsias en parafina y 21 biopsias congeladas de verrugas comunes	PCR iniciadores MY09/11 y primers tipo- específicos diseñados por autor; y secuenciación	57 (31.7%) 1a (29.3%) 27 (17%)

## 5. Las variantes intratipo de VPH2.

El análisis de las secuencias genómicas en los Papilomavirus han sido de utilidad para establecer árboles filogenéticos y hacen evidente la alta adaptación de éstos virus a su hospedero. Como se mencionó previamente, una variante intratipo en los Papilomavirus se define como una diferencia menor al 2% de la secuencia de las regiones conservadas del genoma de un aislado, como L1, y las del genotipo de referencia o *prototipo*; siendo de hasta 5% en regiones no codificantes como LCR. Es importante mencionar que la secuencia prototipo es aquella cuya secuencia genómica fue la primera reportada para ese genotipo, y no necesariamente la más ancestral evolutivamente hablando. Se considera que un aislado es nuevo cuando posee al menos un cambio en la secuencia. (De Villiers EM 2004; Bernard 2005; Sichero L 2006)

El análisis de las variantes intratipo en el VPH 16 ha mostrado que estos virus se agrupan en cinco grandes ramas: la Europea, las Africanas 1 y 2, la Asiática y la Asiático- americana. Esto indica que la diseminación de los VPH ha estado vinculada al movimiento de las poblaciones humanas y sugiere además una lenta tasa de mutación y un origen ancestral común. (Sichero L 2006) Estas características de las variantes genómicas de los VPH (el bajo número de variantes encontradas y su especificidad geográfica) se ha observado en estudios realizados en cáncer cérvicouterino, VCs genitales, VCs no genitales y EV. (Deau MC 1993; Ho L and Rosenbaum S 1993; Heinzl PA 1995; Chan SY 1997)

La secuencia prototipo del VPH 2 [VPH 2a] consta de 7860 pb, fue identificada y caracterizada por G. Orth, M Favre y O. Croissant en 1977, a partir de muestras de una paciente con verrugas comunes múltiples en las manos. (Orth G 1977) El primer análisis de variantes en VPH en VCs no genitales fue realizado por Chang y cols., en éste se analizaron 286 pb de un segmento de LCR para VPH 2, 27 y 57. El estudio abarcó el análisis de 75 pacientes de Alemania, Japón y Singapur con verrugas comunes; 27 resultaron positivos a VPH 2. Se

reportaron 7 variantes de VPH 2 y ninguna muestra con la secuencia prototipo. (Chan SY 1997) Los cambios en la LCR de estas variantes se muestran en la Tabla 2.

En la búsqueda de factores asociados con el desarrollo de verrugas comunes gigantes que desarrollan cuernos cutáneos o *cornu cutaneum*, tumores en su mayoría benignos hiperqueratósicos que asemejan los cuernos de un animal, Lei y cols. aislaron y caracterizaron dos variantes de VPH 2, con base en el genoma completo: CN-SC1 y CN-HB1. (Lei YJ 2007) Posteriormente, en 2009 este mismo grupo de investigadores, identificó éstas mismas variantes a través del análisis de un segmento de 1057 pb de la LCR, en muestras de verrugas comunes; encontraron 2 muestras con VPH 2a, 1 muestra con HVP2-CV1, que corresponde a CN-SC1, y 2 muestras con HPV2-CV2 que corresponde a CN-HB1. (Lei YJ 2009) Los cambios en la LCR se muestran en la Tabla 3.

Wang y cols. en China secuenciaron otros dos aislados de VPH 2 a partir de cuernos cutáneos. Estos aislados, HPV2-C1 y HPV2-C2, comparten 99.58% y 99.74% de identidad con VPH 2a, respectivamente; los cambios se muestran en la Tabla 2. Los autores analizaron las implicaciones de los cambios en las regiones codificadoras virales y encontraron que había una asociación entre las mutaciones en el genoma y la severidad de la enfermedad. (Wang W 2007)

Tabla 2. Cambios nucleotídicos en LCR de variantes y aislados descritos de VPH2.

Variantes reportadas	Posición (nt) con respecto a VPH2a											
	7298	7320	7350	7351	7352 Ins	7564	7621	7706	7720	7725	7726	7768
HPV2a	C	T	G	T		G	T	T	G	T	C	G
HPV2-C2	C	T	G	T		A	T	Δ	C	T	C	G
HPV2-C1	T	C	G	T	T	A	T	Δ	C	T	C	A
CN-SC1	T	C	T	G	T	A	T	Δ	C	T	C	A
CN-HB1	C	T	G	T		A	T	Δ	C	T	C	G
G1	?	?	?	?		A	T	T	C	T	C	G
G12	?	?	?	?		A	T	Δ	C	T	C	G
G13	?	?	?	?		A	Δ	Δ	C	T	C	G
G7	?	?	?	?		A	T	Δ	C	T	T	G
J10	?	?	?	?		G	T	Δ	C	C	C	G
S5	?	?	?	?		G	T	T	G	C	C	G
G10	?	?	?	?		G	T	Δ	C	T	C	G

Nota. "Δ": Deleciones. nt: nucleotido."?": nucleótido desconocido.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las verrugas cutáneas virales son una patología de la piel muy frecuente, siendo las verrugas vulgares el tipo clínico predominante. En México no hay estudios que describan la infección por VPH y los genotipos más frecuentes en verrugas cutáneas. El conocer los factores asociados al desarrollo y persistencia de las verrugas cutáneas nos ayudará a encaminar los esfuerzos terapéuticos hacia una mayor eficiencia en la eliminación de éstas lesiones con menores repercusiones estéticas, emocionales y económicas a los pacientes, así como también sentará los precedentes para futuras investigaciones.

### III. HIPÓTESIS

*El genotipo 2 del Virus del Papiloma Humano es el de mayor frecuencia en Verrugas Cutáneas que padece la población mexicana.*

### IV. OBJETIVOS.

#### A. Objetivo General.

Estudiar los genotipos de VPH presentes en biopsias de verrugas de pacientes con diagnóstico clínico de verrugas cutáneas.

#### B. Objetivos específicos.

Identificar los genotipos de VPH en pacientes con verrugas cutáneas.

Conocer el perfil clínico de los pacientes con verrugas cutáneas.

Analizar las variantes genómicas del genotipo más frecuente.

### V. DISEÑO EXPERIMENTAL.



**A. Tipo de Estudio.**

Este es un estudio prospectivo, transversal, descriptivo y observacional.

**B. Población de Estudio.**

Pacientes con verrugas cutáneas virales que acudieron a consulta en el Centro Dermatológico de Mérida Yucatán y soliciten la remoción quirúrgica de la verruga, en el periodo comprendido entre Septiembre de 2010 y Marzo de 2011.

**C. Criterios de Inclusión.**

Pacientes con diagnóstico clínico de verrugas cutáneas.

Pacientes que firmen la carta de consentimiento informado.

**D. Criterios de exclusión.**

Pacientes que no acepten entrar en el estudio.

**E. Criterios de eliminación.**

Pacientes en cuyas muestras no se pueda llevar a cabo los experimentos, por la cantidad de material biológico o por dificultades técnicas en el procesamiento de la muestra.

**VI. METODOLOGÍA.**

Las muestras fueron tomadas por remoción quirúrgica por un dermatólogo y posteriormente son colocadas en una solución de transporte *Preservcyt*, se almacenaron a 4 °C hasta su transporte al Laboratorio de

Virus y Cáncer del Instituto de Nacional de Cancerología en donde se conservaron congeladas (-20°C) hasta su procesamiento.

#### **A. Extracción de ADN.**

La extracción de ADN se realizó mediante una técnica libre de fenol-cloroformo descrita por Forslund y cols. la cual fue descrita específicamente para verrugas y lesiones de la piel y se lleva a cabo de la siguiente manera: La muestra se incuba toda la noche con 1 ml de buffer de lisis (10 mM Tris- HCl, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.8) con 4% de SDS y proteinasa K (200 µg/ml). Posteriormente se toman 300 µl del lisado para extracción y el resto se conserva a -70 °C para posteriores estudios. A estos 300 µl se añaden 120 µl de NH<sub>4</sub>Ac y se mezcla en vortex por 20 seg y se centrifuga por 15 min a 17,600 g. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipita el ADN con 900 µl d etanol por 2 hrs a -20 °C, se centrifuga por 10 min a 17,600 g. La pastilla resultante se lava con 500 µl de etanol al 95%, después se deja secar la pastilla y se disuelve en 100 µl de buffer TE. Estas muestras en ocasiones se encuentran muy queratinizadas y no se lisan completamente después de la incubación a 37 °C, en estos casos la muestra también se hizo pasar por un homogeneizador para posteriormente volver a someter a lisis con proteinasa K a 37 °C toda la noche. (Forslund O 1999)

#### **B. Calidad e integridad de ADN.**

El ADN extraído se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop. La integridad del ADN obtenido se evaluó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 268 pb del gen constitutivo de β- globina humana empleando los oligonucleótidos PC04 y GH20.(Sotlar K 2004) La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo 50 pmol de cada primer, Buffer 1X, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP y 1 U de Taq polimerasa. El programa de amplificación es el siguiente: una desnaturalización inicial de 9 min a 95 °C, 38 ciclos de 95 °C por 1 min, 55°C por 1 min, y a 72 °C por 1 min, seguido por una elongación final a 72 °C por 5 min. Como control

positivo se utilizó ADN de células 293T. Como control negativo en cada ensayo se agregó una reacción con mezcla de reacción de PCR sin ADN.

### C. Detección de VPH.

La detección de VPH se realizó utilizando la técnica de PCR mediante un ensayo anidado (NPCR) con los pares de oligonucleótidos: HPV2/B5 como oligos externos y CN1F/R y CN2F/R como oligos internos. Inicialmente se realizó la NPCR y las muestras que resultaron negativas se probaron con los iniciadores C4F/F y finalmente con el par MY09/11. (Surentheran T 1998; Harwood CA 1999; Sotlar K 2004) Las características de estos iniciadores se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Característica de oligonucleótidos empleados y productos obtenidos.**

Oligonucleótido	VPH que detecta	Secuencia(5' - 3')	Región de VPH que amplifica	Tamaño del amplificado
HPV2	Amplia gama de VPH cutáneos Par externo	TCNMGNGGNCANCCNYTNGG	L1	~650
B5		AYNCCRTTRTTRTGNCCTG		
CN1F	Grupo E (1, 41, 63) Internos	AATARGTTWGATGATGCWGAA	L1	~309 – 328
CN1R		AKRTARTCWGGATATTTGCA		
CN2F	Grupo A4 (2, 27, 57) Internos	GGGGATATGGTTGAAACAGGT	L1	~294
CN2R		CAGAGGACACCATAGAGCCA		
CN4F	Grupo B2 (4, 48, 50, 60, 65)	GGAGATACAGAAAATCCT	L1	~ 330 – 335
CN4R		SHATCTCCATAGATATCTTT		
MY11	Amplia gama de mucosos y cutáneos	GCMCAGGGWCATAAYAAAYTGG	L1	~650
MY09		CGTCCMARRGGAWACTGATC		

La PCR anidada con los iniciadores HPV2/B5 y CNs se estandarizó con las condiciones de reacción y programa de amplificación descritos en la Tabla 4 y Tabla 5.

Tabla 4. Condiciones de reacción para la NMPCR.

Reactivo	PCR iniciadores Externos	PCR iniciadores Internos
	Concentraciones por reacción	
Buffer de PCR	1x	1x
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	1.7 mM
dNTPs	200 µM	200 µM
Taq DNA polimerasa	1 U	1 U
Oligonucleótido Sentido	50 pmol	50 pmol
Oligonucleótido Reverso	50 pmol	50 pmol
Agua para PCR	cbp 50 µl	cbp 30 µl
ADN	150 ng aprox.	3 µl de amplificado externo.

Tabla 5. Programa de amplificación para NMPCR.

Proceso	PCR amplificado externo HVP2/B5			PCR anidado interno CNs		
	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	4 min	94 °C	1	4 min	94 °C
Desnaturalización	35	45 seg	94 °C	35	30 seg	94 °C
Alineamiento		45 seg	52 °C		30 seg	47 °C
Elongación		45 seg	72 °C		30 seg	72 °C
Elongación final	1	10 min	72 °C	1	10 min	72 °C

La amplificación con iniciadores MY09/11 se llevó a cabo con las siguientes condiciones de reacción:

Buffer 1X, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 50 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa y 150 ng de ADN; con el siguiente programa de amplificación: Desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, 25 ciclos de

amplificación de 94 °C por 1 min, 52 °C por 2 min y 72 °C por 1 min, seguido por un ciclo de elongación final de 6 min a 72 °C.

Como control positivo se usaron 100 ng de plásmido de VPH 57 para el amplificado externo, muestras previamente tipificadas por secuenciación positivas a VPH 1 y VPH 2 y ADN de la línea celular SiHa (positiva a VPH16) para el par MY09/11. Como control negativo se utilizó agua grado PCR y 100 ng de ADN de células 293T.

#### **D. PCR para determinación de variantes de LCR en muestras VPH2 positivas.**

Se amplificó un segmento de 1057 pb que abarcan parte de L1, todo LCR y un segmento de E6. Los oligos empleados para la amplificación del segmento fueron publicados por Lei y cols. son P5 y P6, estos oligos amplifican una región que abarca de los nucleótidos 6934 hasta 88 de la secuencia reportada para VPH2a. Las condiciones de amplificación son: Buffer 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 20 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa y 150 ng de ADN; con el siguiente programa de amplificación: Desnaturalización inicial de 6 min a 94 °C, 34 ciclos de amplificación de 94 °C por 30s, 45 °C por 45s y 72 °C por 30s, seguido por un ciclo de elongación final de 7 min a 72 °C. (Lei YJ 2009)

#### **E. Secuenciación para genotipificación y análisis de variantes.**

La genotipificación se realizó por secuenciación directa de los respectivos amplificados. La purificación se realizó utilizando un protocolo Exo-SAP, en el cuál se mezclaron 10 U de ExoI y 20 U de SAP con 5 μl del producto de PCR y se sometió a una temperatura de 37 °C por 15 min y posteriormente a 80 °C por 15 min. El marcaje se realizó con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

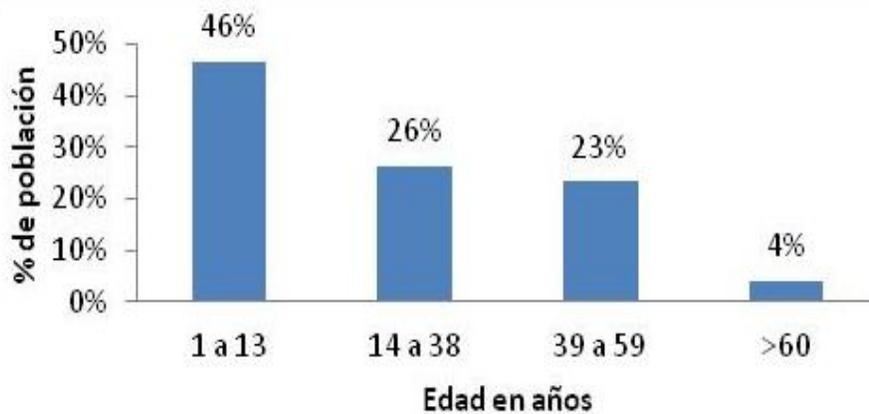
**F. Análisis de resultados.**

La observación de los amplificadores se llevó a cabo mediante Electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite 2.01 y se compararon con las reportadas en la base de datos GenBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). La determinación de variantes se llevó a cabo mediante alineamientos múltiples utilizando el programa ClustalX 2.0.12. El árbol filogenético se construyó utilizando el programa MegAlign Lasergene DNASTAR. El análisis de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva, calculando porcentajes y frecuencias. Se elaboró una base de datos en el programa Excel de la paquetería de Microsoft Office 2007. Se realizó la prueba de  $\chi^2$ .

## VII. RESULTADOS.

### A. Características de la población.

Se recolectaron 107 muestras de verrugas cutáneas de pacientes procedentes del estado de Yucatán (97) y del Distrito Federal (10) en el periodo correspondiente del mes de Septiembre del 2010 a Marzo del 2011. Se obtuvo información clínica de 100 de estas muestras, siendo el 49% de pacientes masculinos y 51% pacientes femeninas. La edad media es de 23.9 años con un rango de 3 a 73 años. La distribución de edades de los pacientes se muestra en la Figura 4.

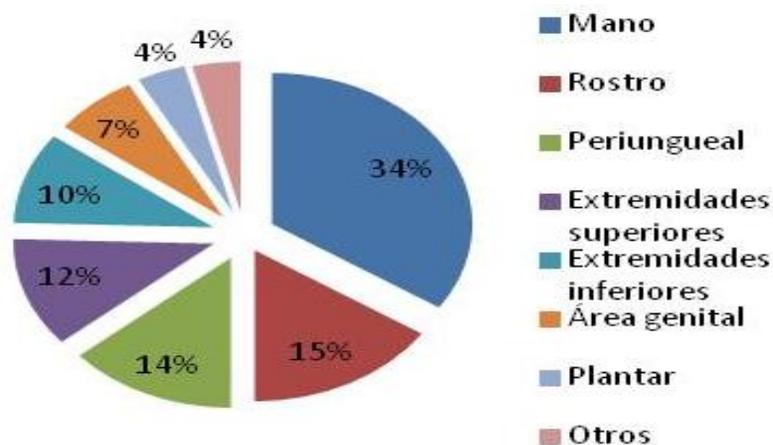


**Figura 4. Las VCs son más frecuentes en la infancia y pubertad de la población estudiada.**

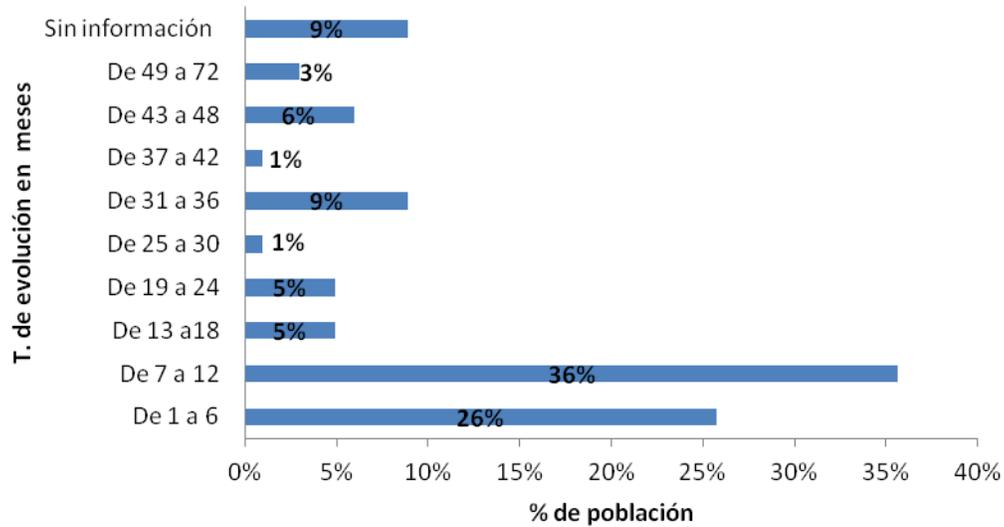
El primer grupo de edad (1-13 años) corresponde a niños y preadolescentes, el segundo grupo comprende adolescentes y adultos jóvenes (14-38 años), el tercer grupo corresponde a adultos mayores y el último grupo a tercera edad.

Podemos observar como el porcentaje de personas con verrugas cutáneas es mucho mayor en la niñez y pre-adolescencia, disminuyendo en adolescentes y adultos, siendo mucho menos frecuente en la vejez para esta población.

En lo que respecta a la diseminación de lesiones se encontró un 45% de verrugas únicas contra un 51% de verrugas múltiples en este grupo de estudio. La localización anatómica más frecuente fue en manos (48%), con importante referencia a las lesiones periungueales (14%) (Figura 5). El tiempo de evolución es el tiempo que paciente presenta la VC desde su aparición hasta el día en que se toma la muestra, en nuestra población es en su mayoría de entre 1 y 12 meses (Figura 5).



**Figura 5. Las manos son el sitio anatómico en el que se desarrollan VCs con mayor frecuencia en la población estudiada.**

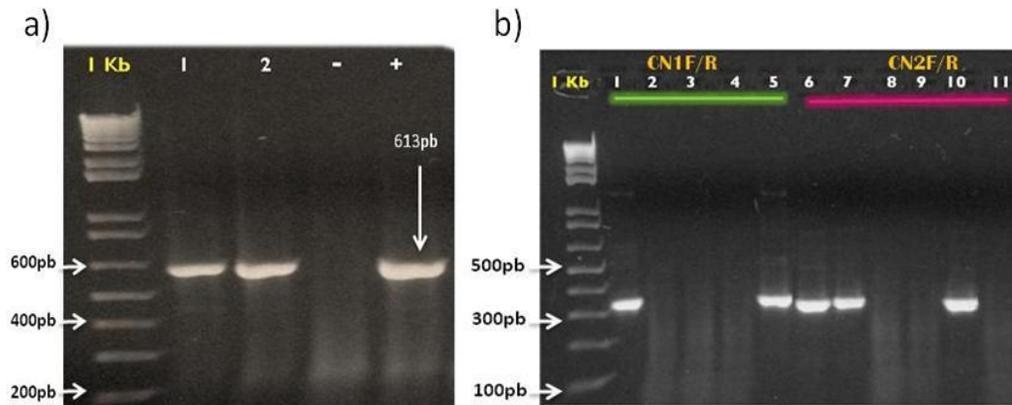


**Figura 6. El 35% de nuestra población presenta Verrugas Cutáneas con una persistencia de un año.**

Se muestra el tiempo de evolución en meses, el mayor tiempo para nuestra población es de 6 años

#### **B. Detección de VPH.**

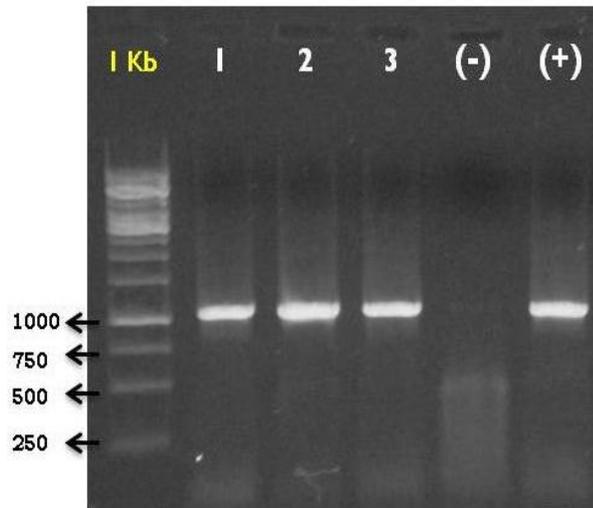
Se eliminaron 5 muestras de las 107 recolectadas en este estudio. Se estandarizó la NPCR para la detección de VPH con los iniciadores externos HVP2/B5 utilizando una muestra positiva a VPH2 como control positivo. Para la estandarización de los iniciadores internos CN1F/R y CN2F/R, se clonaron y purificaron plásmidos de VPH1 y VPH57 para usarlos como control positivo (Figura 7).



**Figura 7. La PCR anidada múltiple hace más eficiente la detección de VPH cutáneos.**

**a)** Detección de VPH con iniciadores externos HVP2/B5, 1 y 2 son muestras positivas, (-) es control negativo sin ADN y (+) es control positivo VPH2 ~613pb. **b)** Detección de VPH con iniciadores internos CN1F/R (1 a 5), CN2F/R (6 a 11), 1- 3, 6-8 son muestras, 5 es control positivo pVPH1 336pb, 10 es control positivo pVPH57 314pb, y 4 y 9 son control negativo sin ADN.

A partir de ésta técnica se detectó VPH en el 96.0% (96/100) de las muestras. Mediante secuenciación directa de las muestras usando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing se tipificó el 91.7% (88/96) de las muestras positivas a VPH. El genotipo 2 es el más frecuente con el 66.7% de las muestras positivas a VPH (64/96); el segundo en frecuencia es VPH57 con 13.5% (13/96), seguido por VPH3 con un 4.2% (4/96), VPH1, VPH27 y VPH11 con un 2.1% (2/96) cada uno; y VPH6 y VPH65 ambas con 1.0% (1/96). Con respecto al total de la población estudiada, es decir a las 102 muestras de pacientes con VCs, las prevalencias de VPH en verrugas comunes son 54.0%, 13.0% y 4.0% para VPH2, VPH57 y VPH3 respectivamente (Figura 8.) En las muestras VPH57 positivas fue posible identificar el subtipo VHP57c por diferencias en la secuencia nucleotídica de la región analizada, VHP57c es más frecuente que VHP57 con 9.4% (9/96) y 4.2% (4/96) respectivamente.



**Figura 9. Amplificados de LCR en muestras VPH2 positivas.**

Carriles 1, 2 y 3 son muestras VPH2 positivas, Carril (-) control negativo con 150ng ADN de células 293T, Carril (+) muestra control positiva a VPH2.

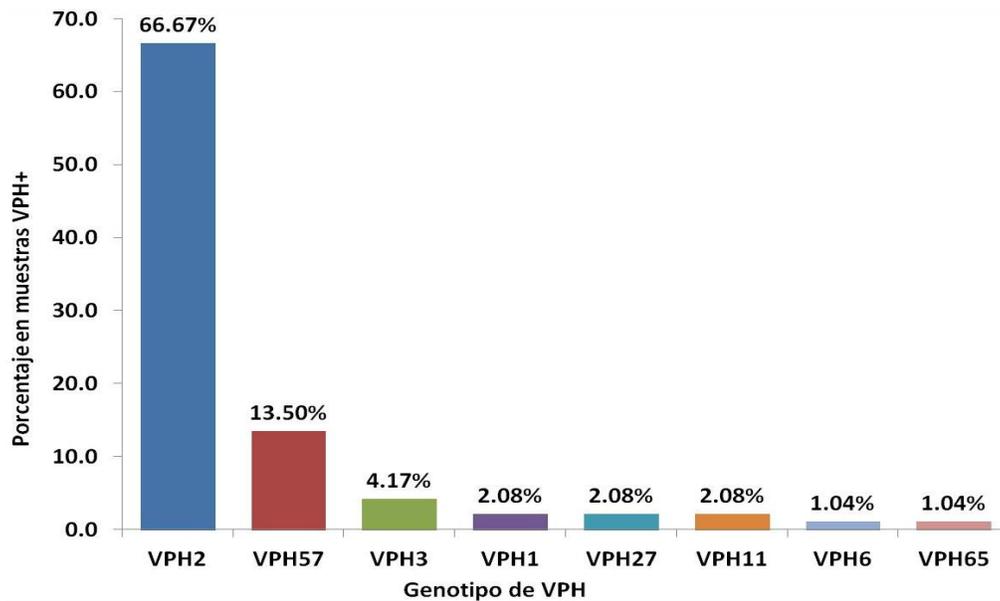
Con la intención de obtener toda la secuencia de LCR se secuenciaron los amplificados por duplicado en dirección sentido y antisentido. A causa de la escasez de material para analizar las muestras al final del estudio logramos obtener la secuencia analizable de la LCR de 18 de las 64 muestras VPH2 positivas. Se identificaron 3 nuevas variantes de LCR, las denominamos VMEX1, VMEX2 y VMEX3, ninguna de las muestras analizadas correspondió a alguna variante previamente reportada o la secuencia prototipo. En la Figura 10 se muestra el cromatograma y la comparación en GenBank con la secuencia prototipo.



**Figura 10. Una inserción de T en la posición 7350' es constante en las variantes identificadas en nuestra población.**

En esta imagen se muestra una inserción de T presente en las tres nuevas variantes putativas. En la parte superior se muestra la comparación con VPH2a a través del programa BLASTN (NCBI) y en la parte inferior el cromatograma analizado a través de Chromas Lite 2.01.

En la Tabla 6 se muestran los cambios identificados en las muestras, comparadas con la prototipo (VPH2a) y las variantes reportadas por Chang y cols. Lei y cols. y Wang y cols. (Chan 1997; Lei YJ 2007; Wang 2007)



**Figura 8. Distribución de los genotipos de VPH.**

El genotipo VPH2 es el más frecuente en Verrugas Comunes en nuestra población

### **C. Variantes en LCR de VPH2.**

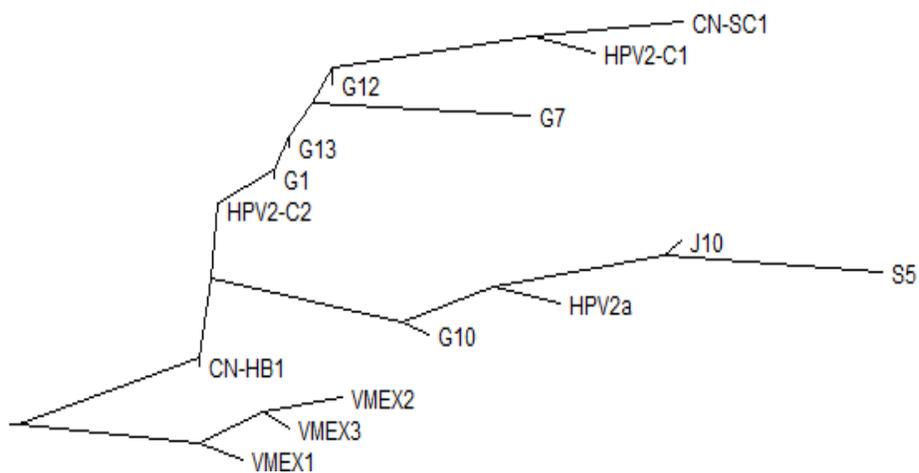
Para la determinación de variantes para VPH2, genotipo más frecuente encontrado en población, se utilizaron los oligos P5 y P6 que amplifican un fragmento de 1057 pb que abarca un segmento de L1, LCR y parte de E6. En la Figura 9 se observan las bandas de los amplificados.

Tabla 6. Se identificaron 3 nuevas variantes putativas en la población mexicana, ninguna secuencia coincide con la prototipo.

		Posición (nt)											Nuevas Variantes Putativas		
		7298	7320	7350/Ins	7379	7434	7564	7621	7651	7706	7720	7725		7800	7841
V a r i a n t e s	J10	?	?	?	?	?	G	T	T	Δ	C	C	C	?	
	S5	?	?	?	?	?	G	T	T	T	G	C	C	?	
	G10	?	?	?	?	?	G	T	T	Δ	C	C	C	?	
	G7	?	?	?	?	?	A	T	T	Δ	C	T	C	?	
	G13	?	?	?	?	?	A	Δ	T	Δ	C	C	C	?	
	G1	?	?	?	?	?	A	T	T	T	C	C	C	?	
	G12	?	?	?	?		A	T	T	Δ	C	C	C	?	
	CN-SC1	T	C	G	T	A	A	T	T	Δ	C	C	C	A	
	HPV2-C1	T	C	T	T	A	A	T	T	Δ	C	C	C	A	
	HPV2-C2	C	T	Δ	T	A	A	T	T	Δ	C	C	C	A	
	CN-HB1	C	T	Δ	T	A	A	T	T	Δ	C	C	C	A	
	HP2a	C	T	Δ	T	A	G	T	T	T	G	C	C	A	
M U E S T R A S	LCRVM93	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	V M E X 1
	LCRVE16	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVE15	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM27	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM81	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM10	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM86	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM63	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM35	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM16	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
	LCRVM37	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	?	
	LCRVM88	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	?	
	LCRVM91	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	?	
	LCRVM76	C	T	T	T	G	A	T	C	Δ	C	C	T	?	
	LCRVM32	C	T	T	C	G	A	T	C	Δ	C	C	T	G	V M E X 2
	LCRVM61	C	T	T	C	G	A	T	C	Δ	C	C	T	G	
	LCRVM92	C	T	T	C	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	
LCRCV1	C	T	T	C	G	A	T	C	Δ	C	C	T	A	V M E X 3	

"Δ": deleción, nt: nucleótido, "?" : nucleótido desconocido, Ins: Inserción.

En la figura 11 se muestra el árbol filogenético construido usando el programa MegAling Lasergene DNASTAR empleando las secuencias de los aislados descritos por Lei y cols., Wang y cols., las variantes descritas por Chang y cols. y las variantes descritas en el presente estudio. (Chan SY 1997; Lei YJ 2007; Wang W 2007)



**Figura 11. Las variantes encontradas en nuestra población distan filogenéticamente de las variantes descritas.**

Las variantes descritas por Chang y cols. (1997) son: G1, G7, G10, G12 y G13 (encontradas en pacientes alemanes), J10 (encontrada en un paciente japonés) y S5 (identificada en un paciente de Singapur). HPV2-C1 y HPV2-C2 son las variantes descritas por Wang y cols. (2007) y CN-HB1 y CN-SC1 las descritas por Lei y cols. (2007)(Lei YJ 2007) ambos en China. VMEX1, VMEX2 y VMEX3 son las variantes identificadas en el presente estudio, podemos observar que se encuentran muy distantes de las reportadas previamente.

## VIII. DISCUSIÓN

Las VCs son una de las principales patologías dermatológicas y causa frecuente de consulta. El agente etiológico de las VCs es el Virus de Papiloma Humano, particularmente los genotipos denominados *cutáneos*. El estudio de los genotipos de VPH asociados al desarrollo de VCs se ha llevado a cabo desde los años 40's, encontrándose asociaciones entre las características histológicas de las verrugas y el genotipo infectante; sin embargo son más de 30 los genotipos identificados.

Se encuentran pocos reportes epidemiológicos sobre VCs en el mundo. En nuestro país no existe un reporte epidemiológico nacional sin embargo podemos estimar, a partir de los estudios realizados en la Ciudad de México (Magaña GM 1995; Cruz Pérez DMC 2011) que esta patología afecta al 3.6% de los mexicanos que acuden al Departamento de Dermatología, esta cifra es menor al 4% reportado en pacientes japoneses. (Hagiwara K 2005) El presente estudio es el primero en reportar la detección y genotipificación de VPH en VCs México. La población estudiada comprendió pacientes ambulatorios que asistieron a consulta dermatológica y con diagnóstico de VCs de entre 3 a 73 años. Concordando con estudios realizados previamente (Hagiwara K 2005), la mayoría de los pacientes infectados por VPH cutáneos y afectados por VCs, son niños de entre 6 y 10 años, siendo evidente una disminución de VCs en los grupos de mayor edad. El comportamiento infantil que promueve infecciones, el contacto físico frecuente por la convivencia en los centros educativos y la respuesta inmune menos eficiente en niños son factores que podrían dar explicación a este hecho.

Se ha propuesto que el estado del sistema inmune sea el principal factor determinante en la presentación clínica de las VCs, es decir el grado de diseminación, la persistencia y recidiva de las lesiones al tratamiento. Estudios llevados a cabo en verrugas cutáneas de pacientes mexicanos y alemanes identificaron una predisposición genética de los pacientes con polimorfismos HLA-DR3, HLA-DR9, HLA-QDA\*30101 y HLA-

QDB\*0302 del complejo mayor de histocompatibilidad y el desarrollo de VCs. (Spelten B 2004; Sánchez Barrientos 2009) Además, en apoyo a estas afirmaciones se han descrito casos de pacientes con desarrollo de verrugas gigantes o cuernos cutáneos asociados a VPH2; el análisis molecular de los virus aislados en estos pacientes no presentan diferencias significativas en relación a los identificados en pacientes con verrugas comunes. (Lei YJ 2007; Wang W 2007)

En el presente estudio no encontramos asociación entre el genotipo infectante y grado de diseminación, ni entre genotipo infectante y persistencia de lesiones.

Con base a las experiencias en lo que respecta a la detección de VPH en muestras de lesiones cervicales preneoplásica, en la cantidad de genotipos descritos en VCs, y en los pocos estudios publicados, decidimos utilizar oligonucleótidos degenerados con el fin de tener un mayor éxito en la detección y poder identificar diversos genotipos de VPH. A partir de ésta estrategia logramos detectar VPH en el 96% (96/100) de las muestras y se logró tipificar el 91.7% (88/96), muy similar a lo obtenido por Ifner y cols y ligeramente menor al 92.4% obtenido por Hagiwara y cols. (Ifner 2003; Hagiwara K 2005)

Consistente con lo publicado previamente, se identificó VPH6 y VPH11 únicamente en muestras de origen genital. En verrugas plantares de acuerdo a lo reportado por Orth y cols. se esperaba identificar en al VPH1 principalmente; sin embargo se identificó únicamente VPH 2 y 57 en este tipo de VCs; VPH1 se encontró escasamente presente en las muestras analizadas. (Orth G 1977)

En general los genotipos de mayor prevalencia son VPH2 con 56.9%, VPH57 con 11.8% y VPH3 con 5.9%, éstas prevalencias son similares a lo reportado por Rübbers y cols. en Alemania, Porro y cols., en Brazil y Álvarez y cols. en España, difieren de lo reportado por Hagiwara y cols. en Japón, Köler y cols. en Alemania y Lei y cols. en China, en éstos últimos podemos observar que los genotipos 1 y 27 se encuentran presentes con una mayor frecuencia que en nuestra población. Es difícil analizar y tratar de explicar las razones detrás de estas diferencias, ya que son pocos los estudios realizados además que difieren en cuanto al tipo de material utilizado

(biopsias, tejido embebido en parafina, etc), la metodología y otros factores; sin embargo es de sospechar la presencia de un componente poblacional genético o geográfico que esté influyendo en el desarrollo de VCs por VPH cutáneos en distintas regiones del mundo. (Rübben 1997; Porro 2003; Alvarez Ruíz 2004; Hagiwara 2005; Köler 2009; Lei 2009)

Es importante mencionar que los tratamientos dermatológicos actuales están enfocados en la destrucción del tejido vegetante y no al ataque al agente etiológico, dentro de los más comunes encontramos los tratamientos físicos que recurren principalmente a la remoción quirúrgica o destrucción con nitrógeno líquido, tratamientos químicos que utilizan queratolíticos como el ácido salicílico, así como a la reciente introducción de los moduladores de la respuesta inmunológica que emplea imiquimod. Estos hallazgos abren la posibilidad de búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas dermatológicas enfocadas a la eliminación del VPH; específicamente al genotipo 2 que en nuestra población se encuentra aproximadamente en el 60% de las VCs. Esto sería de gran impacto particularmente en pacientes con verrugas periungueales (82% positivas a VPH2) al ser estas muy dolorosas y con un tratamiento potencialmente perjudicial para el crecimiento de las uñas.

En lo que respecta al análisis de variantes del genotipo predominante, se identificaron tres nuevas variantes putativas de VPH2 en la población; es importante resaltar que ninguna de las secuencias identificadas en nuestra población concordó con la secuencia prototipo ni con las encontradas en otras regiones del mundo. VPH2a fue descrita por Orth y cols. y corresponde a un paciente alemán El único estudio enfocado a la búsqueda de variantes de genotipos cutáneos es el realizado por Chan y cols. en éste se analizan muestras de pacientes asiáticos específicamente de Alemania, Singapur, China y Japón. Esto resulta interesante puesto que no hay estudios previos realizados en población latina, estos hallazgos nos indican que las variantes en nuestra población divergen totalmente de las variantes asiáticas. (Orth 1977; Chan 1997)

Esto sugiere que, como ocurre con las variantes de tipos genitales de VPH, pudiera haber ocurrido co-evolución viral con los diferentes grupos humanos. No encontramos relación entre la presentación clínica de las

VCs (topología, diseminación o tiempo de evolución) y la presencia de alguna variante, en concordancia con los estudios realizados en China por Lei y Wang de igual manera estos hallazgos nos sugieren que el desarrollo y presentación clínica de VCs está determinado primordialmente por factores asociados al hospedero que por el virus en sí, será interesante realizar estudios más profundos al respecto. (Lei YJ 2007; Wang W 2007)

A través del análisis filogenético de las variantes de VPH descritas y las identificadas en este trabajo podemos observar que las variantes encontradas en México son mucho más alejadas de la prototipo y las identificadas en Europa y Asia. El estudio de variantes de VPH2 podrían ser un claro reflejo de las movilizaciones humanas en el planeta, probablemente de manera más clara que lo que se puede deducir de los estudios realizados en VPH16.

## IX. REFERENCIAS

- Alvarez Ruíz, S., Dauden, E., Alba, A. & García Díez, A. (2004). Presence of HPV DNA sequences in lesional and non-lesional skin warts in twenty patients. *J Am Acad Dermatol*, Vol 50 (3S), 108.
- Arenas Guzmán, R. (2009). Virosis cutáneas. En *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento* (pp. 805). México D.F.: McGraw-Hill.
- Bernard, H.U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. Vol 32S, S1- S6.
- Boily, J. & Laimins, L. A. (2011). Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*. Vol 19 (1), 33-39.
- Jiménez Vieyra, C.R. (2010). Prevalence of condyloma acuminata in women who went to opportune detection of cervicouterine cancer. *Ginecol Obstet Mex*. Vol 72 (2), 99-102.
- Cruz Pérez, D.M.C, Padilla Desgarennes, M.C., Alonzo-Romero Pareyón, L., Palma Ramos, A. & Peralta Pedrero, M.L. (2011). Tratamiento con candidina de pacientes con verrugas vulgares resistentes. *Dermatología Rev Mex*. Vol 55 (1), 9-16.
- Chan, S.Y., Chew, S.H., Egawa, K., Grussendorf-Conen, E.I., Honda, Y., Rüebben A., Tan, K.C. & Bernard, H.U. (1997). Phylogenetic analysis of the human papillomavirus type 2 (HPV-2), HPV-27, and HPV-57 group, which is associated with common warts. *Virology*. Vol 239, 296-302.
- De Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U. & zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*. Vol 324, 17-27.
- Deau, M.C., Favre, M., Jablonska, S., Rueda, L.A. & Orth G. (1993). Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Clin Microbiol*. Vol 3, 2918-26.
- Dong, H., Shu, D., Campbell, T.M., Frühauf, J., Soyer, P. & Hofmann-Wellenhof, R. (2011). Dermatoscopy of genital warts. *J Am Acad Dermatol*. 859-64.
- González Solís, E. (2007) *Genotipificación del VPH en condilomas acuminados de pacientes masculinos mexicanos*. Tesis del Diplomado en Dermatología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ferenczy, A. (1995). Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. *Am J Obstet Gynecol*. Vol 172(4), 1331-1339.
- Ganguly, N. & Parihar, S.P. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*. Vol 34 (1), 113-123.

- Gross, G., Pfister, H., Hagedorn, M. & Gissmann, L. (1982) Correlation between human papillomavirus (HPV) type and histology of warts. *J Invest Dermatol. Vol 78(2)*, 160-164.
- Hagiwara, K., Uezato, H., Arakaki, H., Nonaka, S., Nonaka, K., Nonaka, H., Asato, T., Oshiro, M., Kariy, K. & Hattori, A. (2005). A genotype distribution of human papillomavirus detected by polymerase chain reaction and direct sequencing analysis in a large sample of common warts in Japan. *J Med Virol. Vol 77*, 107- 112.
- Harwood, C.A., Spink, J.P., Suretheran, T., Leigh, M., De Villiers, E.M., McGregor, J.M., Proby, C.M. & Breuer, J. (2005). Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of Human Papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol. Vol 37(11)*, 3545- 3555.
- Heinzel, P.A., Chan, S.Y., Ho, L., O'Connor, M., Balaram, P., Campo, M.S., Fujinaga, S., Kiviat, N., Kuypers, J., Pfister, H., Steinberg, B.M., Tay, S.K., Villa, L.L. & Bernard, H.U. (1995). Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol. Vol 33*, 1746- 54.
- Ho, L., Chan, S.Y., Burk, R.D., Das, B.C., Fujinaga, K., Icenogle, J.P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara, P., Labropoulou, V., Mitrani-Rosenbaum, S., Norrild, B., Pillai, M.R., Stoerker, J., Syrjaenen, K., Syrjaenen, S., Tay, S.K., Villa, L.L., Wheeler, C.M., Williamson, A.L. & Bernard, H.U. (1993). The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and movement of ancient human populations. *J Virol. Vol 67*, 6413- 6414.
- IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. (2007) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 90: Human papillomaviruses*. Lyon France, IARC Press.
- Ifner, A., Klug, S.J., Blum, A., Stacncu, A., Wilczynski, S.P. & Ifner, T. (2003). The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancer of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res. Vol 63*, 7515- 7519.
- Iglesias Diez, L., Guerra Tapia, A. & Ortiz Romero, P.L. (2004) Cap. 9 Dermatitis por virus y rickettsias. En *Tratado de Dermatología*. (pp. 142-145). Madrid, España: McGraw-Hill.
- Jablonska, S., Majewski, S., Obalek, S. & Orth, G. (1997). Cutaneous warts. *Clin Dermatol. Vol 15*, 309-319.
- Jayasinghe, Y. & Garlan, S.M. (2006). Genital warts in children: what do they mean?. *Arch Dis Child. Vol 91*, 696- 700.
- Kilkenny, M., Merlin, K. & Young, R. (1998). The prevalence of common skin conditions in Australian school students: Common, plane and plantar viral warts. *Br J Dermatol. Vol 138*, 840-845.
- Köler, A., Meyer, T., Stockfleth, E. & Nindl, I. (2009). High viral load of human wart-associated papillomaviruses (PV) but not B-PV in cutaneous warts independent of immunosuppression. *Br J Dermatol. Vol 161*, 528-535.
- Lei, Y.J., Gao, C., Wang, C., Han, J., Chen, J.M., Xiang, G.C., Shi, Q., Jiang, H.Y., Zhou, W., An, R., Dong, C.F., Yuan, Y.K. & Dong, X.P. (2009). Molecular epidemiological study on prevalence of human papillomavirus in patients with common warts in beigin area. *Biomed Enviroment Science. Vol 22*, 56-61.

- Lei, Y.J., Wang, C., Gao, C., Jiang, H.Y., Chen, J.M., Han, J., Yuan, Y.K. & Dong, X.P. (2007). HPV-2 isolates from patients with huge verruca vulgaris possess stronger promoter activities. *Intervirology*. Vol 50, 353- 360.
- Lin, C., Lau, J.T.F., Ho, K.M., Lau, M.C., Tsui, H.Y. & Lo, K.K. (2010). Incidence of genital warts among the Hong Kong general adult population. *BMC Infectious Diseases*. Vol 10, 272- 277.
- Lowy, D.R. & Howley, P.M. (2001). Papillomavirus and their replication. En *Virology* (pp. 2197- 2264). Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins.
- Lipke, M. (2006). An Armamentarium of Wart Treatments. *Clin Med Res*. Vol 4 (4), 273-293.
- Magaña, G.M., Vázquez, R. & González, N.L. (1995). Dermatología pediátrica en el Hospital General. Frecuencia de las enfermedades de la piel del niño en 10,000 consultas; 1990- 1994. *Rev Med Hosp Gen Mex*. Vol 58 (3), 124- 130.
- Messing, A.M. & Epstein, W.L. (1963) Natural history of warts: A two year study. *Arch Dermatol*. Vol 87, 306.
- Moody, C. A. & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Rev Cancer* . Vol 10, 550-560.
- Orozco Topete, R., Villa, A., Leyva Santiago, J., Scholtes, C., Archer- Dubon, C. & Ysunza, A. (2008). Warts, malnutrition and sunshine. *Pediatric Dermatology*. Vol 25 (3), 395- 397.
- Orth, G., Favre, M. & Croissant, O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin wart. *J Virol*. Vol 24 (1), 108- 120.
- Plascencia, J.M. (2000). Cutaneous warts: Diganosis and treatment. *Dermatology*. Vol 27(2), 423- 434.
- Porro AM, Alchorne MMA, Mota GR Michalany N, Pignatari ACC, Souza IE. (2003). Detection and typing of human papillomavirus in cutaneous warts of patiens infected with human immunodeficiency virus tipe 1. *Br J Dermatol*. Vol 149, 1192- 1199.
- Rübber, A., Kalka, K., Spelten, B. & Grußendorf-Conen, E.I. (1997). Clinical features and age distribution of patiens with HPV 2/ 27/ 57- induced common warts. *Arch Dermatol Res*. Vol 289, 337- 430.
- Sánchez Barrientos, G.M. (2009) *Verrugas cutáneas por VPH asociadas a alelos del HLA DQ en población mexicana que acude a la consulta externa de dermatología en el hospital general "Dr. Manuel Gea González*. Tesis de la Especialidad en Dermatología. Universidad Nacional Autónoma de México
- Sichero, L. & Villa, L.L. (2006). Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Brazilian J Med & Biol Res*. Vol 39, 707- 717.
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollme, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R. & Bültmann, B. (2004). Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. Vol 42 (7), 3176- 3188.

Spelten, B., Grussendorf-Conen, E.I. & Rübber, A. (2004). Human leukocyte antigen class II alleles and natural history of HPV2/27/57-induced common warts. *Arch Dermatol Res.* Vol 296, 105- 111.

Surentheran, T., Harwood, C.A., Spink, P.J., Sinclair, A.L., Leigh, I.M., Proby, C.M., McGregor, J.M & Breuer, J. (1998). Detection and typing of human papillomaviruses in mucosal and cutaneous biopses from immunosupressed and immunocompetent patients and patients with epidermodisplasia verruciformis: a unified diagnostic approach. *J Clin Pathol.* Vol 51, 606- 610.

Wang, W., Wang, C., Xu, S., Chen, C., Tong, X., Liang, Y., Dong, X., Lei, Y.J., Zheng, X.G., Yu, J. & Wang, J. (2007). Detection of HPV-2 and identification of novel mutations by whole genome sequencing from biopsies of two patients with multiple cutaneous horns. *J Clin Virol.* Vol 39, 34- 42.

Turbay, Y. (2007). *Estudio comparativo del Imiquimod 5% y crema queratolítica al 10% en el tratamiento tópico oclusivo de las verrugas cutáneas*. Tesis del Posgrado en Dermatología. Universidad Occidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Venezuela.

zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology.* Vol 284, 260- 265.

## X. ANEXOS

### A. Anexo I. Carta de Consentimiento Informado. CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO “VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y VERRUGAS CUTÁNEAS”

Se me ha explicado en forma clara que el objetivo del estudio es evaluar los genotipos del virus de papiloma humano presentes en verruga cutáneas de la población mexicana. La información generada puede ser útil en el diseño de estrategias para el control del virus, pero el procedimiento no me perjudicará personalmente.

Mi participación consistirá en permitir que me tomen muestras de verrugas cutáneas. Se me dijo que probablemente se requerirán muestras especiales y que el material que se usará no es el mismo que se necesita para el control de mi tratamiento.

Es de mi conocimiento que los responsables de esta investigación son: el Dr. Alejandro García Carrancá, la Dra. María del Refugio González Losa, el Dr. José D. Cerón Espinosa y la Q.F.B. Martha D. Sánchez Barrios, y que cualquier duda o pregunta podrá ser contestada por ellos.

Toda la información que se obtenga de este estudio será confidencial y se consignará en el expediente correspondiente. No seré identificada en ninguna publicación o presentación parcial o total del estudio.

Mi participación en el estudio es voluntaria. Puedo negarme a participar o puedo suspender mi participación en cualquier momento, si así lo decido. En caso de que así lo haga, la atención que como paciente recibo de la Institución no se verá afectada.

He leído la información anterior y comprendo los propósitos del trabajo de investigación; también sé que no habrá riesgos directos o potenciales por mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad de que se me respondan las preguntas y aclaren las dudas. Por tanto, **DOY MI LIBRE CONSENTIMIENTO** para ser participante de este estudio y guardo una copia de esta forma de consentimiento.

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

FIRMA DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

TESTIGO: \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_