



Detección y genotipificación del virus del papiloma humano HPV

Práctica Electiva 2022

Alumna: Ma. Florencia Invaldi.

Directora a cargo: Bqca. Silvina María Martínez.

Contenido

Marco teórico: Virus papiloma humano HPV	2
Introducción	2
Tropismo	2
Estructura	2
Clasificación de genotipos	4
Ciclo de replicación del HPV	4
Historia Natural de la infección	6
Epidemiología	7
Patogenia	8
El HPV en la génesis del cáncer	9
Diagnóstico	11
Planteamiento y justificación del estudio	15
Materiales y métodos	16
Resultados y discusión	24
Conclusión	28
Bibliografía	29

Marco teórico: Virus papiloma humano HPV

Introducción

Los virus papiloma están ampliamente distribuidos en la naturaleza; infectan piel y mucosas en sus huéspedes naturales produciendo lesiones epiteliales proliferativas (verrugas) que por lo general regresan espontáneamente. (Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection – Fact Sheet , 2018)

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer ha establecido que ciertos tipos de HPV son carcinogénicos en humanos. Esto marca un hito, señalando a la infección por HPV como condición necesaria para la génesis del tumor. Es decir, que la infección del virus, no es suficiente para el desarrollo neoplásico, pero si influye en el mismo; además se han descripto otros factores que modulan el potencial oncogénico viral. (Carballal, 2014)

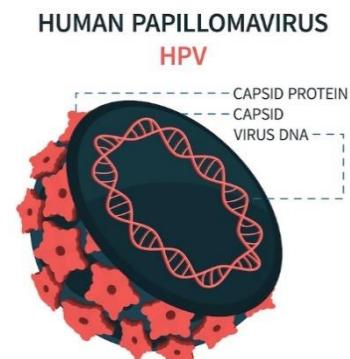


Fig.1 Estructura del HPV.

Tropismo

Los mismos, infectan y replican en el núcleo de células epiteliales. No se propagan en sistemas de cultivos celulares convencionales debido a que su ciclo replicativo requiere células con cierto grado de diferenciación, rasgo que pierden las células propagadas in vitro. Son altamente específicos de especie y tejido (Carballal, 2014).

Estructura

Los HPVs son miembros la familia Papovaviridae. Los virus papiloma no poseen envoltura, son virus desnudos y presentan una cápside proteica de simetría icosaédrica, compuesta por capsómeros. Esto brinda al virión una forma casi esférica al ser observado por microscopia electrónica (Carballal, 2014).

Gracias al estudio de análisis se reveló:

-La cápside está formada por dos proteínas estructurales, L1 y L2. La cápside encierra al genoma viral y lo protege durante la transmisión de la enfermedad.

-El genoma está constituido por una molécula de ADN doble cadena circular, covalentemente cerrada, conocido como episoma. Su ADN contiene alrededor de 8000 pares de bases. En contraste con los cromosomas de mamíferos, toda la información genética de estos virus está contenido en una sola de las dos cadenas de ADN apareadas.



Todos los ADN secuenciados de los distintos HPV evidencian una gran similitud en su organización genómica. El genoma puede ser dividido en 3 regiones: región temprana E, región tardía L y región larga de control LCR. (Carballal, 2014) y (Sendagorta-Cudosa, 2019).

- a) La región (E) temprana codifica genes que son necesarios para el ciclo viral y con un papel importante en la transformación celular (E1, E2, E4, E5, E6 y E7).
- b) La región tardía (L) codifica las proteínas de la cápside L1 y L2.
- c) La región de control larga (LTR) no codificante, que contiene el origen de la replicación y los sitios de unión al factor de transcripción, contribuye a regular la replicación del ADN, controlando la transcripción del gen viral.

La expresión de E6 y E7, junto con E1, E2, E4 y E5, son esenciales para la replicación del genoma viral y la síntesis y liberación de viriones, pero también desempeñan un papel clave en la transformación celular.

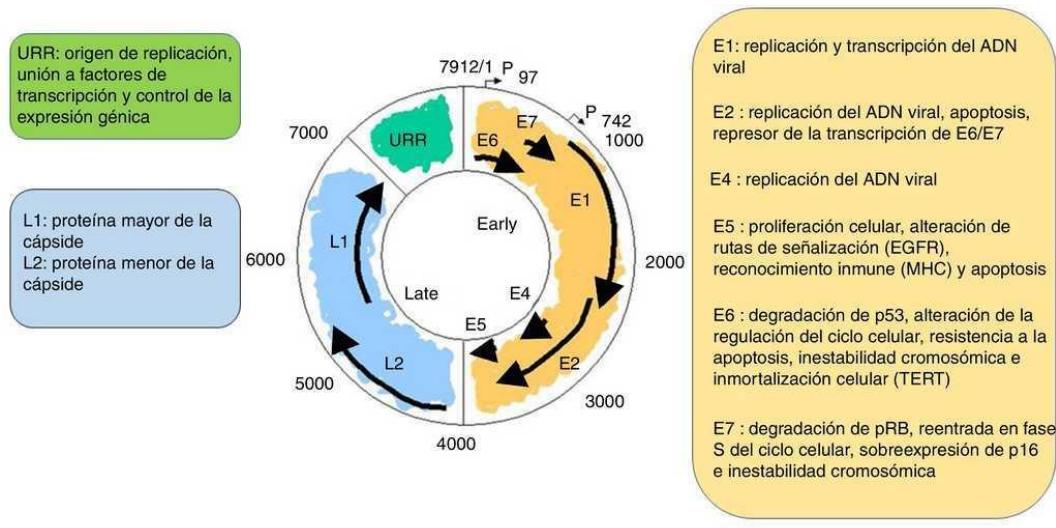


Fig. 2. Estructura del papilomavirus humano y función de sus proteínas virales. Sendagorta-Cudosa, E., Burgos-Cibriánb, J., & Rodríguez-Iglesiasc, M. (2019). Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *El Sevier FORMACIÓN MÉDICA CONTINUADA: INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL*, Vol. 37(N°5), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.010>



Clasificación de genotipos

En los humanos se han identificado más de 100 tipos distintos de HPV. Aquellos que infectan el tracto anogenital son alrededor de 40 tipos y han sido subdivididos en dos grupos sobre la base de su potencial oncológico. (Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection – Fact Sheet , 2018).

- HPV de bajo riesgo (HPV 6, 11, 42, 43 y 44) comúnmente presentes en lesiones benignas como condilomas o neoplasias intraepiteliales de bajo grado, con mínimo riesgo de progresión maligna.
- HPV de alto riesgo (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, etc.) que bajo la forma de infección persistente pueden conducir al cáncer.

Ciclo de replicación del HPV

El HPV se transmite por contacto sexual. La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es considerada la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente (Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection – Fact Sheet , 2018).

Se estima que 4 de cada 5 personas van a contraer uno o varios de los tipos de HPV en algún momento de sus vidas. La infección comienza con la llegada del HPV a la capa basal a través de micro traumas o abrasiones, que comprometen la barrera epitelial. Estas son las únicas células del epitelio capaces de dividirse, por lo que constituyen el blanco obligado del virus que intenta inducir lesiones en las que pueda persistir. Una vez ingresado y descapsulado, el genoma viral migra hacia el núcleo celular. Así se establece la infección, que puede ser latente o productiva. La mayoría de las infecciones son transitorias y se eliminarán en una media de 8 meses, sin embargo, se puede hacer persistente cuando la infección se prolonga durante más de 2 años. (Carballal, 2014)

- Infección latente: luego de la inoculación, se estima que existe un periodo variable (1 a 8 meses), llamado latencia. El virus está presente en la célula, pero no manifiesta signo citopático, el genoma se replica solo cuando la célula basal infectada se divide y lo hace en forma autónoma.
- Infección productiva: el virus comienza a replicarse en forma independiente de la división celular y produce un alto número de copias mediante la expresión de los genes temprano en la capa basal del epitelio. A medida que el epitelio se va diferenciando, el virus inicia la expresión de los genes tardíos en capas intermedias y superficiales. El ensamblado de los genomas y las cápsides da lugar a las partículas virales completas o viriones, por lo que esta forma de infección resulta altamente transmisible.

El HPV no mata la célula que infecta, sino que, por el contrario, convive con ella; mientras va ocurriendo la maduración natural del epitelio, el virus se va multiplicando. Finalmente, la descamación de

estas células conteniendo viriones sirve como vector de transmisión. La infección productiva se manifiesta morfológicamente con signos citopáticos como coilocitosis, hiperplasia, acantosis, etc. y clínicamente con el desarrollo de lesiones proliferativas. (Carballal, 2014)

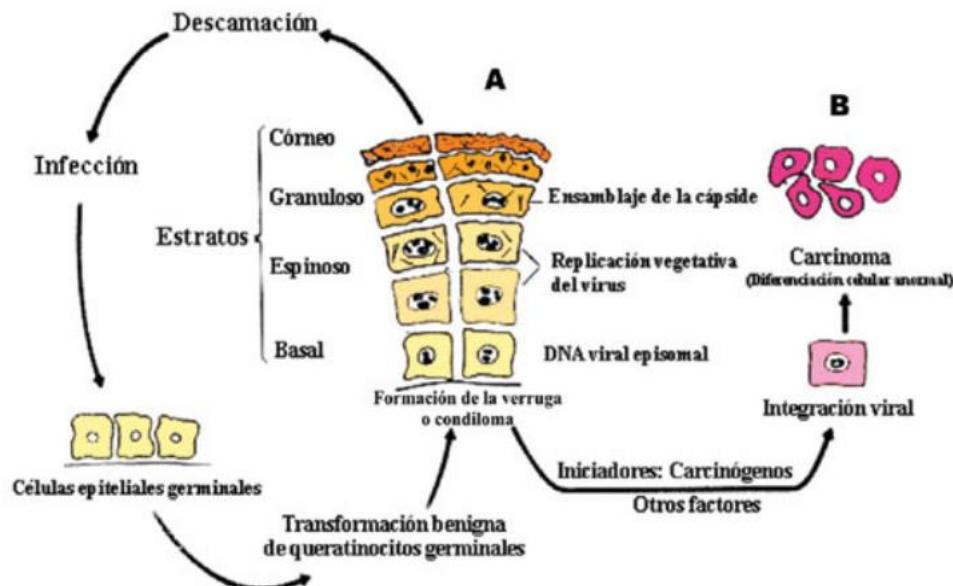


Fig. 3. Ciclo de la infección por HPV en el epitelio. Potencial oncogénico viral. La representación esquemática muestra el ingreso del virus en el estrato basal donde se inicia la expresión de los genes tempranos. El genoma viral replica muy lentamente como un plásmido, al ritmo de la división celular, siendo distribuido homogéneamente en el núcleo de las células hijas y manteniendo un bajo número de copias. A: lesión benigna, a medida que se va diferenciando el epitelio, se completa la expresión del genoma viral mediante la síntesis vegetativa del ADN en el estrato espinoso y la síntesis de las proteínas de la cápside en el estrato granulosum que finalmente son ensambladas con los genomas virales generando el virión. Esto se manifiesta clínicamente con la formación de la verruga o condiloma. B: lesión preneoplásica y neoplásicas, en conjunto con los cofactores propios del hospedador y del medio ambiente, ciertas infecciones producidas por los tipos de HPV de alto riesgo, pueden conducir a una desregulación del ciclo celular, induciendo proliferación anárquica. Fuente: Carballal, G. & Oubiña, J. (2014). Virología Médica. 4ta Edición. Corpus Libros Médicos y Científicos. Buenos Aires.

El aumento de la capacidad oncogénica de los genotipos de alto riesgo, y particularmente del tipo HPV 16, reside en la actividad de las oncoproteínas E6 y E7. Aunque la actividad E6 y E7 está presente en los tipos de alto y bajo riesgo, su papel en los tipos de bajo riesgo se limita a aumentar la capacidad y la producción viral y es en gran medida insuficiente para desencadenar el desarrollo de lesiones preneoplásicas y cáncer.

Los genotipos de HPV de alto riesgo han desarrollado varios mecanismos para evitar la respuesta inmune del huésped, que es importante para la persistencia viral y la progresión a enfermedades neoplásicas asociadas al HPV. Una de las primeras estrategias para evitar la detección es mantener un perfil muy bajo. El



ciclo del HPV es exclusivamente intraepitelial y no lítico, por lo que evita la señal proinflamatoria asociada. Como resultado, el reclutamiento de células presentadoras de antígenos, como las células de Langerhans, y la liberación de citoquinas que median la respuesta inmune están ausentes o son muy bajas después de la infección por HPV. Otros mecanismos de la evasión inmunológica del HPV incluyen la regulación de la señalización del interferón, la inhibición de las células de Langerhans por la actividad de E6 y E7, la inhibición de las moléculas de adherencia, como la CDH1, y la modulación de las vías de señalización intracelular. (Carballal, 2014).

Historia Natural de la infección

La historia natural de la infección por HPV explica la prevalencia de la infección por HPV en mujeres en la población general. Debido a que la infección es transmitida por vía sexual y es usualmente transitoria, la prevalencia de estas infecciones es más frecuente y es mucho más alta entre aquellas mujeres sexualmente activas que se encuentran en su segunda década de la vida. En un estudio, dos tercios de adolescentes infectadas con genotipos de HPV de bajo riesgo aclaron su infección espontáneamente en un periodo de 12 meses, y más de la mitad de aquellas infectadas con genotipos de alto riesgo también presentaron aclaramiento de la infección. A los 23 meses, más del 80% habían aclarado su infección. Con el incremento de la edad, las mujeres tienden a tener menos nuevas parejas sexuales, y la prevalencia disminuye. Después de los 45 años de edad, las infecciones por HPV de alto riesgo tienden a estabilizarse, y menos del 5% de las mujeres en la población general son ADN-positivas para HPV de alto riesgo. La prevalencia de positividad cae a menos del 3% en mujeres con un resultado de citología cervical normal. (González Martínez, 2014) y (Schiffman M. &, 2003).

La prevalencia máxima de infecciones transitorias con tipos cancerígenos de HPV (línea azul de Fig. 4) ocurre entre las mujeres durante la adolescencia y 20 años, después del inicio de la actividad sexual. La prevalencia máxima de las condiciones precancerosas cervicales ocurre aproximadamente a los 10 años más tarde (línea verde de Fig. 4) y la prevalencia máxima de cánceres invasivos entre los 40 y 50 años de edad (línea roja de Fig. 4). (Los picos de las curvas en Fig. 4 no son dibujados a escala).

El modelo convencional de prevención del cáncer de cuello uterino se basa en rondas repetidas de exámenes citológicos, incluidos frotis de Papanicolaou y colposcopia (pequeñas flechas azules en Fig. 4). Las estrategias alternativas incluyen la vacunación contra el HPV de adolescentes (flecha grande beige en Fig. 4), una o dos rondas de detección del HPV en las edades máximas de condiciones precancerosas tratables y cáncer temprano (grande flechas de color marrón rojizo en Fig. 4), o ambos. (Schiffman M. &, The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. , 2005)

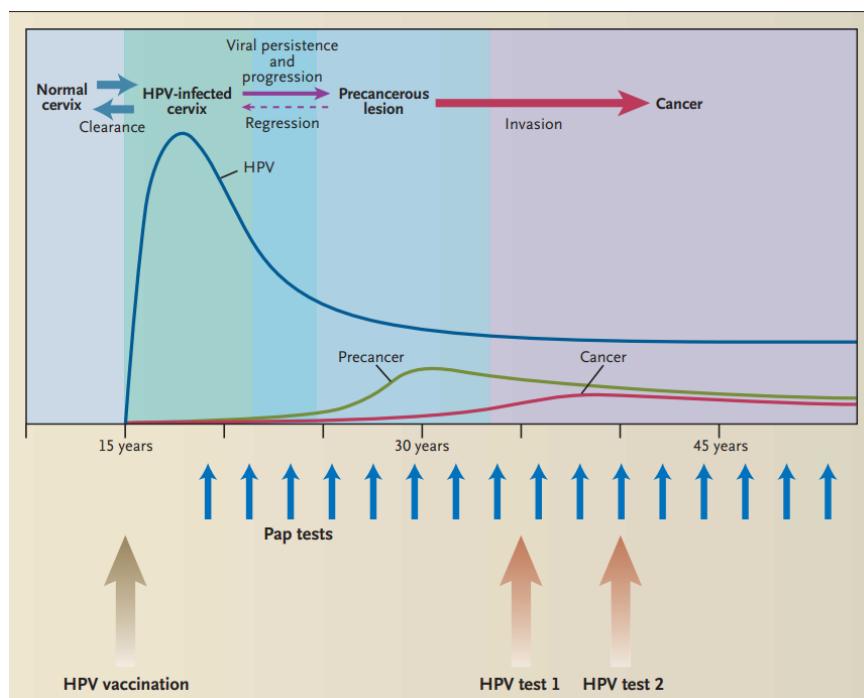


Fig. 4. Historia Natural de infección del HPV y su progresión a cáncer.

Schiffman, M., & Castle, P. E. (2005). The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. *New England Journal of Medicine*, 353(20), 2101–2104.

Epidemiología

Se estima que más de un 80% de las personas sexualmente activas contraerán la infección por HPV alguna vez en la vida. La máxima incidencia de dicha infección ocurre dentro de la primera década después del inicio sexual, generalmente entre las edades de 15 a 25 años (Carballal, 2014).

La infección es generalmente transitoria, consiguiéndose un aclaramiento habitualmente en menos de un año. Sin embargo, en pacientes con el sistema inmune deteriorado (pacientes con infección por el VIH o trasplantados) se ha descrito una mayor dificultad para la eliminación del virus, siendo así la infección más persistente (mediana de infección de 2 años). Los principales grupos de riesgo para la infección por VPH son personas inmunodeprimidas y personas con un mayor número de contactos y parejas sexuales. (Sendagorta-Cudósa, 2019).

La infección es escasamente inmunógena, por lo que la infección por un determinado genotipo no protege de las causadas por otros genotipos o incluso de reinfecciones ante la reexposición al virus. Esto conlleva que, en casos de múltiples contactos sexuales, puede existir un solapamiento entre aclaramientos y reinfecciones, condicionando una cronificación de la infección. (Sendagorta-Cudósa, 2019).

La gran importancia de la infección por HPV reside en ser el agente etiológico de gran cantidad de neoplasias, siendo el responsable del 100% de cánceres cervicales, 87% de cáncer anal, 20% de cáncer orofaríngeo y entre un 10-30% de otros carcinomas escamosos (vagina, vulva y pene). (Sendagorta-Cudósa, 2019) y (Facts, 2018).

Patogenia

-Lesiones cutáneas

Las lesiones inducidas por el HPV en piel se caracterizan por hiperplasia de las papilas dérmicas; las verrugas son generalmente benignas y regresan espontáneamente por acción del sistema inmune del hospedador. Su frecuencia aumenta en niños mayores y adultos jóvenes. Las formas más comunes de presentación son vulgar, plana y plantar localizadas en rostro, manos y pies. (Carballal, 2014).



Fig. 5. Lesión en pie de HPV. Fuente: Fouéré, S., & Biver Dalle, C. (2016). Lesiones cutáneas y mucosas asociadas al virus del papiloma humano. EMC Dermatología El Sevier, Vol. 50(N°1 Pág. 1–12).
[https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(16\)76333-3](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(16)76333-3)

-Lesiones anogenitales

La mucosa del tracto anogenital (cervix vagina, vulva, pene, ano) puede ser infectada por numerosos tipos de HPV, dando lugar a lesiones que difieren en su clínica, histología y riesgo de progresión maligna. En base a estas características se dividen en 3 grupos:

- Verrugas o condilomas anogenitales que afectan genitales externos y están asociadas preferentemente con HPV 6 y 11. En estas lesiones benignas, el contenido de ADN celular es diploide, muestran un alto grado de regresión y la infección es transmisible.
- Lesiones preneoplásicas de distinto grado de gravedad (SIL): lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) y lesiones de alto grado (HSIL).
- Carcinoma invasor (escamoso o glandular), lesión maligna con capacidad metastásica, en la que se detectan los tipos virales de alto riesgo.



En las lesiones precancerosas o cancerosas hay baja replicación viral por lo cual, la detección del antígeno de cápside es menor. Estas lesiones se caracterizan por la desorganización de la arquitectura tisular con una atipia nuclear que crece con el grado de gravedad de la lesión (Carballal, 2014).

La zona de transformación del cuello uterino, donde se reúnen los epitelios del ectocérvix y el endocérvix, muestra una mayor susceptibilidad a este virus. Esto se debe, en parte, a la marcada influencia hormonal y la activa división celular que la convierten en el blanco preferido del virus y el sitio donde se establecen más frecuentemente las lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino.

El HPV en la génesis del cáncer

En una célula normal, la proliferación es regulada estrictamente por genes promotores del crecimiento, denominados protooncogenes, contrabalanceados por genes que restringen la proliferación conocidos como genes supresores de tumores. Cualquier alteración en este equilibrio llevaría a iniciar una cascada de eventos que culminaría en una transformación maligna. (Álvarez Aldana, 2012)

Es en la ruptura de ese equilibrio en donde participa el HPV de alto riesgo. El mismo, posee en su genoma secuencias con capacidad transformante: los oncogenes E6 y E7. Son considerados los genes más importantes en la estimulación de la proliferación y transformación celular. E6 y E7 interfieren activamente en el ciclo celular, apoptosis y mantenimiento de la estabilidad cromosomal al interactuar con las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB, respectivamente. (Álvarez Aldana, 2012) .

Las proteínas tempranas E6 y E7 desempeñan su papel principal en el proceso carcinogénico a través de la inhibición de los supresores de tumores p53 y pRB. (Fig. 6 y 7).

La desregulación del ciclo celular, la activación de la actividad de la telomerasa y la inestabilidad genómica crean un entorno favorable para la transformación de las células epiteliales.

La integración del HPV también puede impulsar el proceso carcinogénico a través de la inactivación de la expresión de E2, el principal inhibidor de E6 y E7, y la interrupción de los genes del huésped debido a la inserción de la secuencia viral en el cromosoma de la célula. (Álvarez Aldana, 2012).

• • •

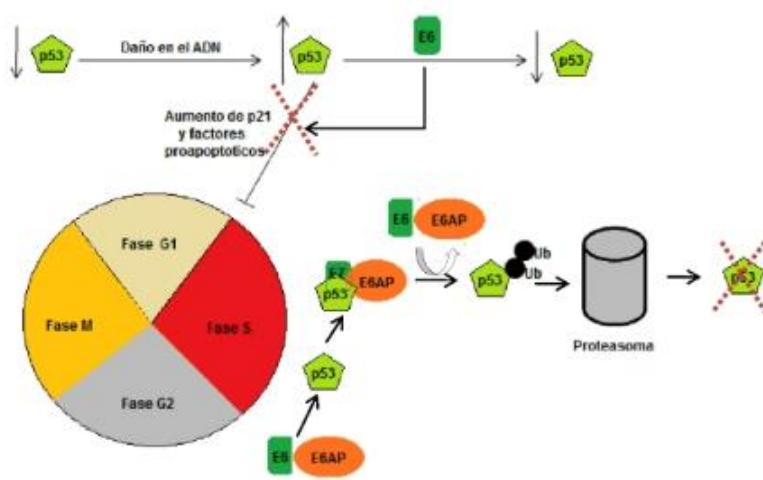


Fig. 6. Desregulación del ciclo celular por la acción de la proteína viral oncogénica E6. E6 inhibe la función de p53, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina en asociación con la proteína celular asociada a E6. Fuente: Álvarez Aldana, A., Sepúlveda Arias, J. C., & Siller López, F. (2012).

CARCINOGENESIS INDUCIDA POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO. *Investigaciones Andina Scielo*, Vol.14(N°24). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012481462012000100007

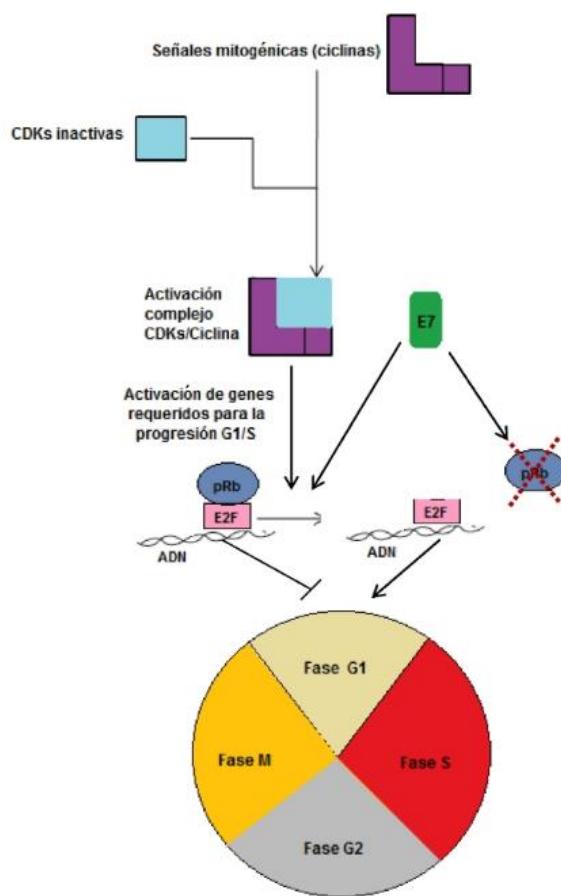


Fig. 7. Desregulación del ciclo celular por la acción de la proteína viral oncogénica E7. De unión de E7 con pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación.

Fuente: Álvarez Aldana, A., Sepúlveda Arias, J. C., & Siller López, F. (2012). CARCINOGENESIS INDUCIDA POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO. *Investigaciones Andina Scielo*, Vol.14(N°24).

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-81462012000100007

El proceso carcinogénico, iniciado con la activación de E6 y E7, debe complementarse con la acumulación de alteraciones adicionales en el gen huésped para conducir al fenotipo invasivo del cáncer.



La variación genética viral, más allá del genotipo del VPH, podría explicar en parte las diferencias en el aclaramiento, la persistencia y el riesgo de desarrollar cáncer entre infecciones positivas para el mismo tipo. Los aislamientos de VPH del mismo genotipo se clasifican en linajes y sublinajes que están asociados con el riesgo de cáncer. (Sendagorta-Cudósa, 2019).

Alteraciones epigenéticas, que no implican mutación en los genes, como la metilación de genes supresores de tumores, relacionadas directa o indirectamente con la actividad E6 y E7, son eventos comunes durante los primeros pasos de la malignización epitelial y se han descrito como biomarcadores potenciales para el cáncer cervical. (Sendagorta-Cudósa, 2019).

Diagnóstico

En el laboratorio son utilizadas diversas técnicas para la detección de HPV presente en hombres y mujeres;

- Serología. Se ha desarrollado una gran variedad de pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra HPV, como por ejemplo ELISA.
- Determinación por biología molecular como reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada.

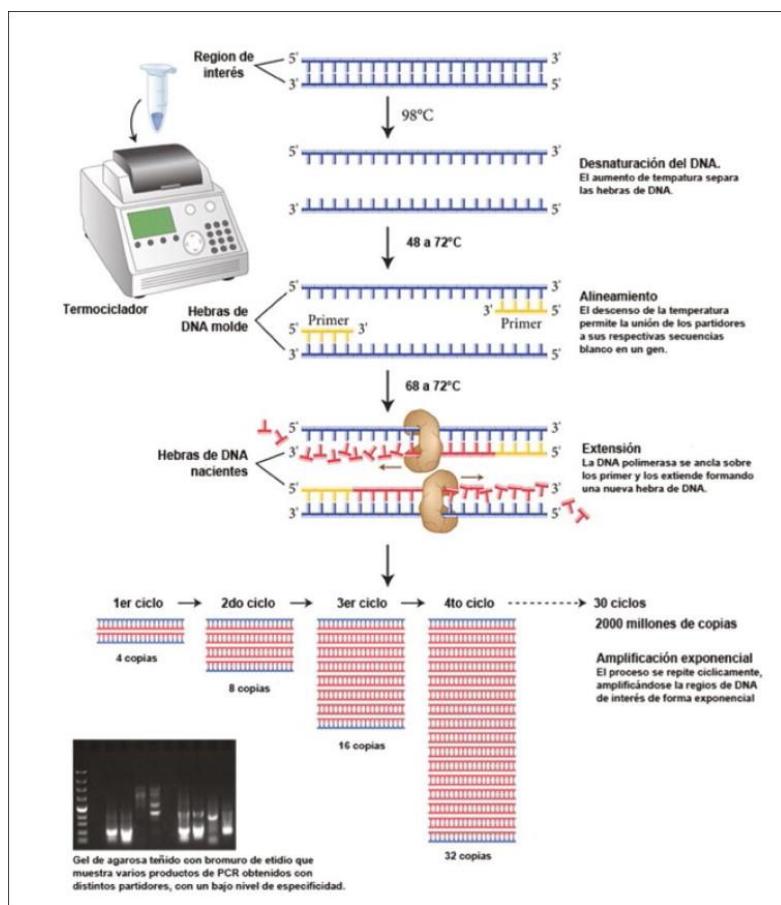


Fig. 8. Etapas de la PCR.

Fuente: Encina S., G. (2013). Biología Molecular en oncología: Lo que un clínico debiera saber. *REV. MED. CLIN. CONDES*, Vol. 24(N°4 (563–570)). https://www.researchgate.net/figure/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-o-PCR_fig3_273093462

En el Laboratorio Central de Redes y Programas de la Pcia. de Corrientes se utiliza para detectar y genotipificar el HPV la reacción en cadena de la polimerasa anidada o nested PCR. Este tipo de PCR permite aumentar la sensibilidad y la especificidad de la PCR.

La PCR anidada implica dos reacciones de amplificación secuenciales, cada una de las cuales utiliza un par diferente de cebadores. El producto de la primera reacción de amplificación se utiliza como molde para la segunda PCR, que se ceba con oligonucleótidos que se colocan en el interior del primer par de cebadores. El uso de dos pares de oligonucleótidos permite realizar un mayor número de ciclos, aumentando así la sensibilidad de la PCR. La especificidad mejorada de la reacción se deriva de la unión de dos conjuntos separados de cebadores a la misma plantilla diana. (Sotlar, 2004)

Concluidas ambas rondas de PCR, se emplean técnicas de electroforesis, que permiten separar los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa,



para fragmentos grandes y en acrilamida, para los más pequeños. El tamaño de los productos de la PCR viene determinado por un marcador de peso molecular de ADN, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido, y que se corre en el gel junto con los productos de PCR (Koltai, 2011).

La electroforesis consiste en aplicar un campo eléctrico a través del gel formado por una malla tridimensional de un polímero, agarosa o poliacrilamida.

Luego de la electroforesis es posible visualizar los amplicones mediante una sencilla tinción con un agente intercalante (GelRed¹), se intercala entre las bases nitrogenadas y se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. El gel se expone en un transiluminador donde es irradiado con luz ultravioleta (UV), allí el colorante absorbe esta luz UV y emite una fluorescencia roja-anaranjada mediante la cual se puede observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis (Fierro Fierro, 2000).

El ensayo utilizado para HPV fue diseñado para permitir la detección específica de un amplio espectro de genotipos del mismo, incluidos todos los tipos de alto riesgo (Fig. 9)

La PCR de primera ronda tiene como blanco de amplificación las regiones E6-E7, facilita la amplificación inicial del ADN genómico de todos los genotipos de HPV de las mucosas conocidos y proporciona material suficiente para volver a amplificarse en numerosas PCR anidadas con cebadores específicos de genotipo. (Sotlar, 2004)

¹GelRed es un colorante fluorescente ultrasensible, extremadamente estable y ambientalmente seguro para ácidos nucleicos diseñado para reemplazar el bromuro de etidio (EtBr), altamente tóxico para la tinción de dsDNA, ssDNA o RNA en geles de agarosa o geles de poliacrilamida.

• • •

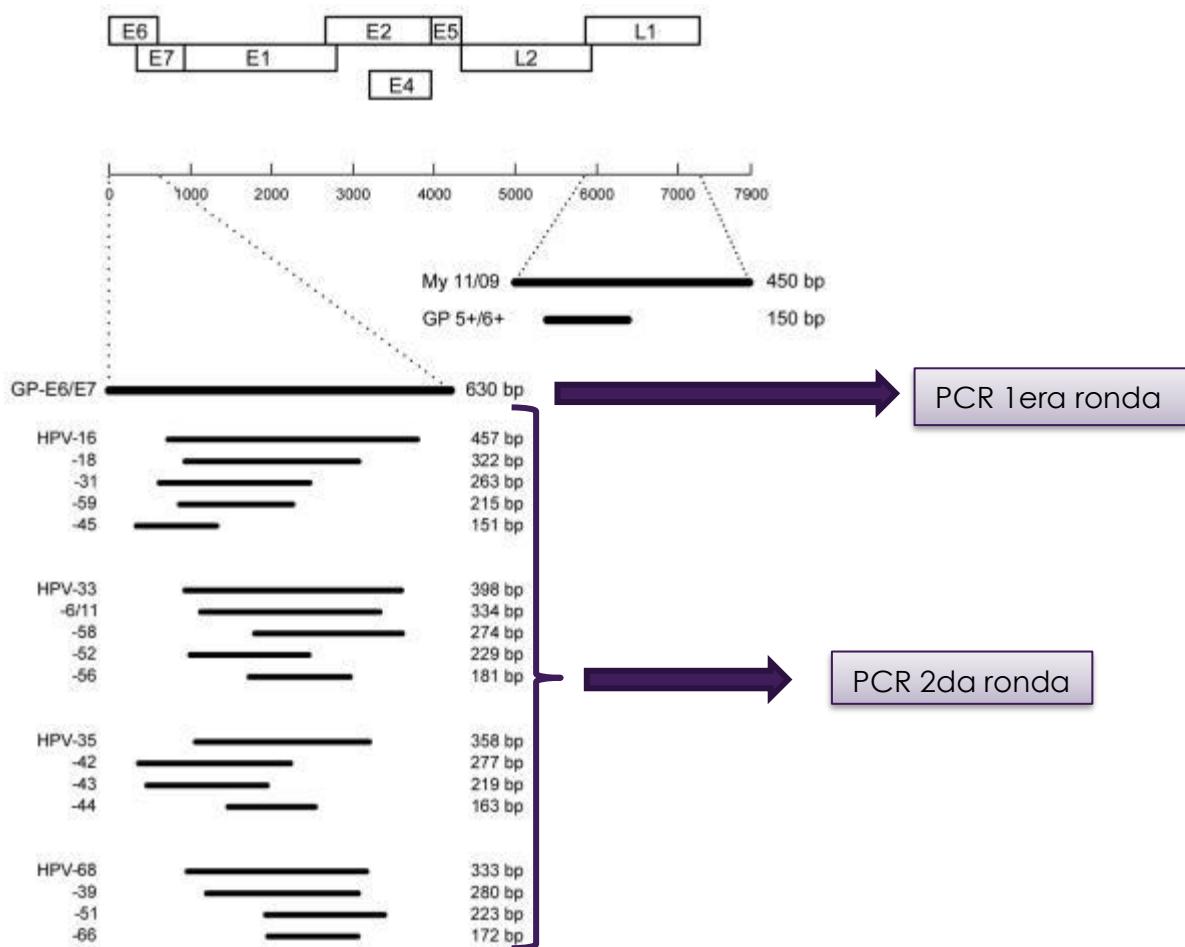


Fig. 9. Cebadores seleccionados para el estudio del HPV. Fuente: Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A & Otros. (2004). Detección y tipificación del virus del papiloma humano mediante E6 Nested Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42(Nº 7), 3176–3184. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>



Planteamiento y justificación del estudio

El Virus del Papiloma Humano HPV es una importante causa de morbilidad y mortalidad en mujeres y globalmente es una prioridad para la salud pública.

La infección por el HPV es muy común. Se estima que el 90% de las personas serán infectadas por el HPV durante su vida, poniéndoles en riesgo para una variedad de serios problemas de salud.

La mayoría de las infecciones por HPV serán resueltas espontáneamente por el sistema inmunológico, sin embargo, en aproximadamente un 10% de los casos la infección se convierte en persistente. La persistencia de la infección es un requisito para la progresión a cáncer.

Las infecciones por el HPV de riesgo alto persistentes causan cáncer: a veces el sistema inmunitario no logra controlar las infecciones por el HPV. Cuando una infección por el HPV de riesgo alto continúa durante muchos años, tal vez produzca cambios celulares. Si estos cambios no se tratan, empeoran con el tiempo y se convierten en cáncer.

En todo el mundo, la carga de los cánceres relacionados con el HPV es mucho mayor. Los HPV de riesgo alto causan cerca del 5 % de todos los cánceres en el mundo. Entre estos, se calcula que 570 000 mujeres y 60 000 hombres tienen un cáncer relacionado con el HPV cada año. El cáncer de cuello uterino es de los cánceres más frecuentes y una de las causas principales de muerte relacionada con el cáncer en los países de ingresos bajos y medianos, donde las pruebas de detección y el tratamiento de los cambios iniciales en las células del cuello uterino no están muy disponibles.

Estas consideraciones me han llevado a interesarme en la detección del HPV aplicando técnicas de biología molecular para su diagnóstico y genotipificación, y de esta manera poder determinar los genotipos que circulan entre los pacientes analizados en el presente estudio.



Materiales y métodos

Se analizaron muestras de pacientes que acudieron al Laboratorio Central de Redes y Programas con pedido médico para detección y genotipificación de HPV desde el 1 de febrero al 29 de abril del 2022. Se trabajó con un total de 99 muestras.

Las muestras analizadas fueron: cepillado endocervical en mujeres, cepillado genital en hombres y biopsias de verrugas.

La aplicación de técnicas moleculares se inició con el pretratamiento de la muestra y la extracción del ADN viral.

1. *Pretratamiento* de la muestra remitida (cepillo sumergido en Buffer fosfato PBS) consistió en agitar enérgicamente el cepillo para que todas las células recolectadas se desprendan del mismo. Luego, se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm y se trabajó con el pellet obtenido.

En el caso de biopsias de verrugas estas fueron tratadas con un buffer de lisis de tejido e incubado 1 hora a 37°C.

2. *Extracción del ADN* de la muestra.

La extracción incluyó el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basó en las características fisicoquímicas de la molécula. Se realizó la técnica de extracción de ADN por columna de sílice, utilizando “High Pure PCR Template Preparation Kit” de Roche.

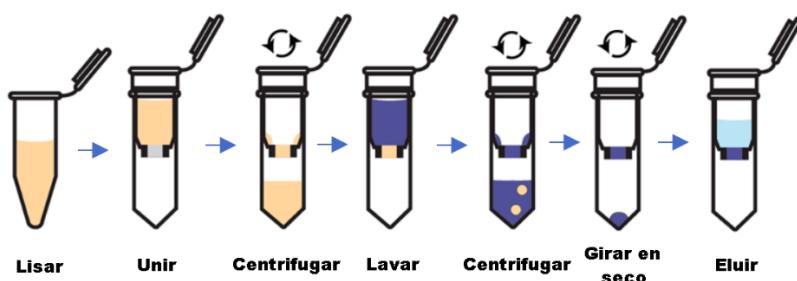


Fig. 10. Etapas de la extracción del ADN. Fuente: Shlesinger, R. (2021, 23 agosto). *¿Cómo encontrar un método de extracción de ARN que funcione para tu laboratorio?* AllScience. <https://www.allscience.com/blogs/articulos/como-encontrar-un-metodo-de-extraccion-de-arn-que-funcione-para-tu-laboratorio>

1). Se agregó 200 ul del pellet o de la biopsia degradada obtenido en el paso anterior a un tubo conteniendo 40 ul de proteinasa K y 200 ul de buffer de lisis. Se mezclo e incubo 10 minutos a 70°C.



Durante este proceso de lisis, las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación. (Alejos Velázquez).

2). Se agregó 100 ul de isopropanol y se homogeneizó. Esto produce la precipitación del ADN viral. Se pasó la mezcla a una columna. Se centrifugó 1 minuto a 8000g.

3). Se descartó el eluido. Se agregó a la columna 500 ul de Inhibitor Removal Buffer. Este buffer permite la unión del ADN a la columna de silice. Se centrifugó 1 minuto a 8000g.

4). Se descartó el eluido. Se agregó a la columna 450 ul de Wash Buffer, para eliminar restos celulares, proteínas, etc. Se centrifugó 1 minuto a 8000g. Se repitió el proceso dos veces.

5). Se descartó el eluido. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se dejó secar centrifugando 1 minuto a 12000g para eliminar restos de buffers y alcohol.

6). Se pasó a la columna a un tubo eppendorf rotulado. Se agregó 60 ul de buffer de elusión. Se dejó reposar 5 minutos para permitir la hidratación de la columna y se centrifugó 1 minuto a 8000g. El eluido contiene el ADN viral.

Al pasarlo a la columna, el ADN cargado negativamente se adsorbió o unió a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a esta durante la remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios; para finalmente ser liberado gracias al buffer de elusión y así se obtiene el ADN libre. (Alejos Velázquez).



Fig. 11, 12 y 13. Elementos utilizados para la extracción del ADN. Fuente: elaboración propia.



Una vez obtenido el material genético, se determinó el rendimiento mediante espectrofotometría. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm. Mientras que, hidratos de carbono absorben a 230nm y proteínas a 280 nm.

Para estimar la pureza del ADN se consideró la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol. Dichas mediciones se realizaron con el equipo Nanodrop². (Alejos Velázquez).

3. *Amplificación anidada (nested-PCR)*

Se realizó una amplificación de 1º ronda de la región E6/E7 del genoma de HPV. Luego el producto de esta primera PCR se expuso a una 2º ronda de amplificación con cebadores específicos de genotipo para lograr la tipificación exacta de las infecciones por HPV.

Se realizaron 4 PCR multiplex de 2da ronda. Para cada una de estas PCR se utilizaron mezclas de primers específicos para cada genotipo (tabla N°2).

- PCR 1º grupo: mezcla de primers específicos para genotipos 16, 18, 31 59 y 45
- PCR 2º grupo: mezcla de primers específicos para genotipo 33, 6/11, 58, 52 y 56.
- PCR 3º grupo: mezcla de primers específicos para genotipo 35, 42, 43 y 44.
- PCR 4º grupo: mezcla de primers específicos para genotipo 68, 39, 51 y 66.

² Espectrofotómetros de micro volumen con tecnología patentada de retención de muestras que miden volúmenes tan pequeños como 0.5 µL, permite pipetear una muestra directamente sobre una superficie de medición óptica.



Tabla N°1. Genotipos de HPV incluidos en cada grupo de PCR de 2º ronda.

Primer cocktail	HPV genotype	Amplicon (bp)	Sequence (5'-3')	Position (bp)
I	16	457	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	141-161
			CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	597-573
	18	322	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	170-190
			GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	491-470
	31	263	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	137-158
			CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	399-378
	59	215	CAA AGG GGA ACT GCA AGA AAG	159-179
			TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	373-354
	45	151	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG	82-101
			ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	232-213
II	33	398	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	172-192
			GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	569-549
	6/11	334	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	201-220
			TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	534-515
	58	274	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC	297-317
			GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	570-550
	52	229	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG	178-197
			CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	406-383
	56	181	GTG TGC AGA GTA TGT TTA TTG	294-314
			TTT CTG TCA CAA TGC AAT TGC	475-455
III	35	358	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C	157-178
			CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	514-493
	42	277	CCC AAA GTA GTG GTC CCA GTT A	85-106
			GAT CTT TCG TAG TGT CGC AGT G	361-340
	43	219	GCA TAA TGT CTG CAC GTA GCT G	102-123
			CAT GAA ACT GTA GAC AGG CCA AG	320-298
	44	163	TAA ACA GTT ATA TGT AGT GTA CCG	248-271
			TAT CAG CAC GTC CAG AAT TGA C	410-389
	IV	68	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG	4049-4068
			GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	4381-4362
IV	39	280	GAC GAC CAC TAC AGC AAA CC	213-232
			TTA TGA AAT CTT CGT TTG CT	492-473
	51	223	GAG TAT AGA CGT TAT AGC AGG	319-339
			TTT CGT TAC GTT GTC GTG TAC G	541-520
	66	172	TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT	353-372
			AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	520-501

Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A & Otros. (2004). Detección y tipificación del virus del papiloma humano mediante E6 Nested Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42(N° 7), 3176–3184.

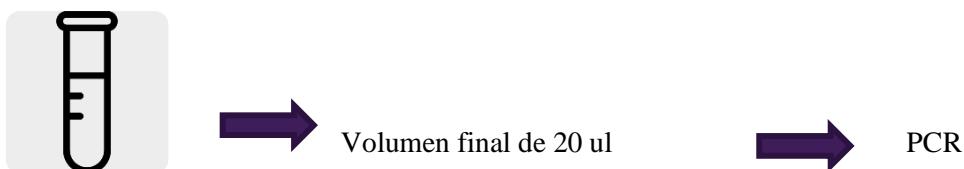
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>



PCR 1º Ronda

Se ensayó una primera PCR para cada muestra a analizar, con un control positivo y agua como control de no templado (NTC). **El protocolo utilizado fue:**

	VOLUMEN 1X
Agua Free	11,56 ul
Buffer 10X	2 ul
MgCl ₂ 25Mm	2,4 ul
dNTPs 10 Um	0,4 ul
Coctel de primers GPE6/E7	0,5 ul
Taq polimerasa	0,14 ul
Vol final MIX	17 ul
ADN	3 ul



1er protocolo de ciclado

- Desnaturalización: 94 °C durante 1 min
- Anillado: 40 °C durante 1 min y,
- Elongación: 72 °C durante 2 min.

Para un total de 40 ciclos de amplificación. El primer ciclo fue precedido por un paso de desnaturalización de 4 min a 94°C. El último ciclo fue seguido por un paso adicional de elongación de 10 min a 72°C.



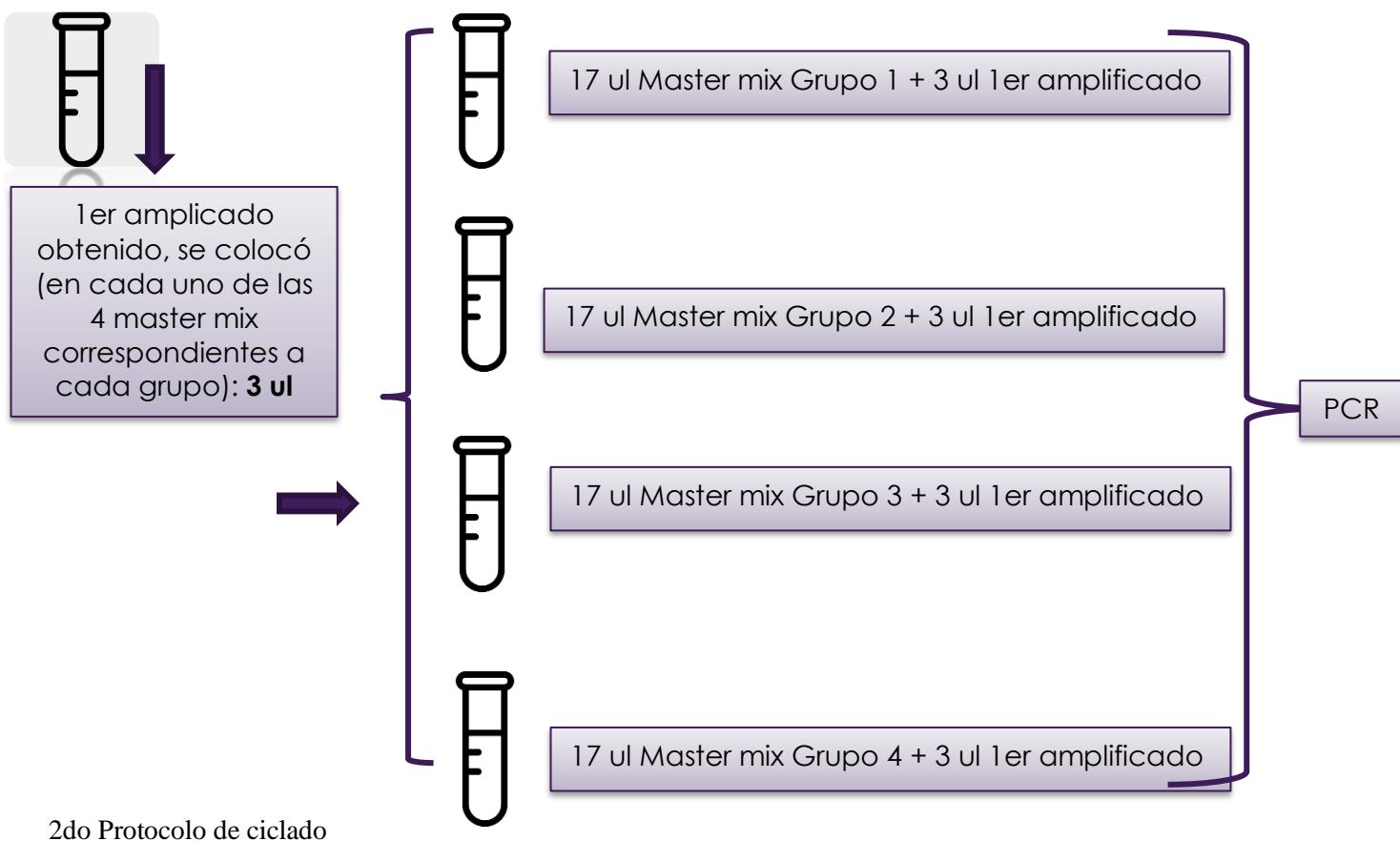
Fig. 14. Elementos necesarios para PCR round 1. Se evidencia el armado del master mix principal, trabajando con 2 muestras y ambos controles.

Elaboración propia.

PCR 2da ronda: El 2do protocolo utilizado fue:

	VOLUMEN 1X
Agua Free	10,96 ul
Buffer 10X	2 ul
MgCl ₂ 25Mm	2 ul
dNTPs 10 Um	0,4 ul
Coctel de primers I, II, III Y IV	1,5 ul
Taq polimerasa	0,14 ul
Vol final MIX	17 ul
1er amplificado	3 ul

Este protocolo se realiza para cada grupo de genotipo, es decir, cada muestra o control que se amplificó en primera ronda, se utilizó como molde para cada una de las PCR de segunda ronda. Ver esquema a continuación.



35 ciclos de:

- 94 °C durante 30 segundos,
- 56 °C durante 30 segundos y,
- 72 °C durante 45 segundos.

El primer ciclo estuvo precedido por un paso de desnaturación de 4 min y el último ciclo fue seguido por un paso de elongación de 4 min.



Fig. 15. Armado de los tubos para la 2da round de PCR. Se evidencia 4 eppendorf a la izquierda para el armado de los 4 master mix; y a la derecha los tubos listos para amplificar por 2da vez. En este caso se trabajó con 2 muestras y los controles. Elaboración propia.



4. *Corrida electroforética* de los productos amplificados.

Se realizó una corrida electroforética del producto de amplificación de las PCR de 2º ronda.

- Se preparó geles de agarosa al 2,5% (1 gramo de agarosa en 40 ml de buffer TBE (TRIS-BASE, ácido bórico, EDTA),
- Se colocó el gel para solidificar y se agregó un peine para formar los pocillos.



Fig. 16. Preparado del gel, en cuba con peines. Elaboración propia.

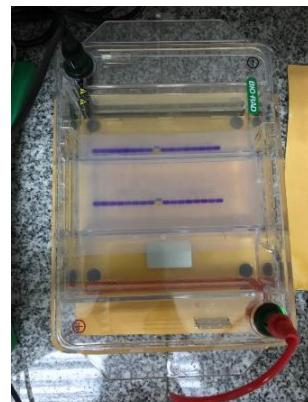
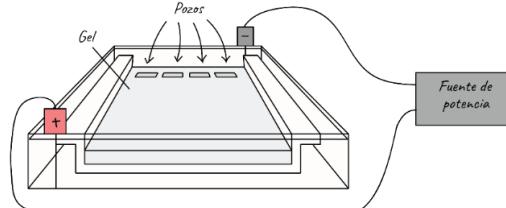


Fig. 17 y 18. Cuba con gel y muestras sembradas. Elaboración propia.

Se sembraron los productos amplificados con Gel Red (por pocillo de 8 a 10 ul del amplificado). Se configuró la cuba para un período de 35 minutos a 100 voltios. Finalmente, se revelaron las bandas en transiluminador UV.

Para el análisis de los datos se utilizó una planilla de cálculo de Microsoft Excel de Microsoft Office. En la misma se plasmaron los datos obtenidos de los pacientes que acudieron en esos meses establecidos, se realizó análisis estadístico y finalmente se confeccionaron distintos gráficos.



Resultados y discusión

Al observar las corridas bajo luz UV se evidencian fragmentos (correspondientes a aquellos productos amplificados), los cuales se comparan con un marcador de peso molecular (teniendo en cuenta a que grupo pertenece); haciendo uso de la tabla N°2 se determina a que genotipo corresponde cada uno de dichos fragmentos.



Fig. 18. Corrida electroforética en gel de agarosa revelada con GelRed bajo transiluminador UV. Se ve la corrida de 2 muestras y ambos controles (para los 4 grupos de genotipos mencionados). La muestra 1 se corrió

en la calle 1, 5, 9 y 13. La muestra 2 se corrió en la calle 2, 6, 10 y 14.

Se puede observar que en la calle 1 hay una banda, que, comparando con el marcador de peso molecular, sería de 215 pb. Así mismo, en la calle 2 se ve la misma banda. Ambas bandas corresponderían al genotipo 59 (grupo 1). En la calle 5 se evidencia una banda de 274pb, que corresponde al genotipo 58. Mientras que en la calle 6 se evidencia una banda de 215pb, es decir genotipo 52. Ambos constituyen genotipos del grupo 2.

En la calle 9 y 10 no se ven bandas, siendo negativo para genotipos del grupo 3. Al igual que para la calle 13 y 14. Los controles negativos (calle 3, 7, 11 y 15) y los positivos (4, 8, 12 y 16) funcionaron correctamente.

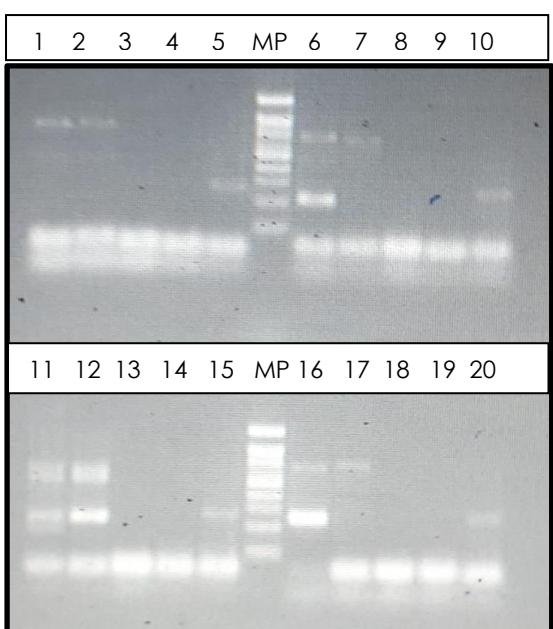


Fig. 2. Corrida en gel de agarosa revelada con GelRed bajo transiluminador UV. Se ve la corrida de 3 muestras y ambos controles (para los 4 grupos de genotipos mencionados). La muestra 1 se corrió en la calle 1, 6, 11 y 16. La muestra 2 se corrió en la calle 2, 7, 12 y 17. La muestra 3 se corrió en la calle 3, 9, 13 y 18.

La muestra 1 posee una banda en la calle 6 (grupo 2) correspondiente a una banda de 229pb, que corresponde al genotipo 52. A su vez posee una banda en calle 16(grupo 4), de 280 pb, correspondiente a genotipo 39 y una banda en calle 11(grupo 3), de 219pb, correspondiente a genotipo 43.

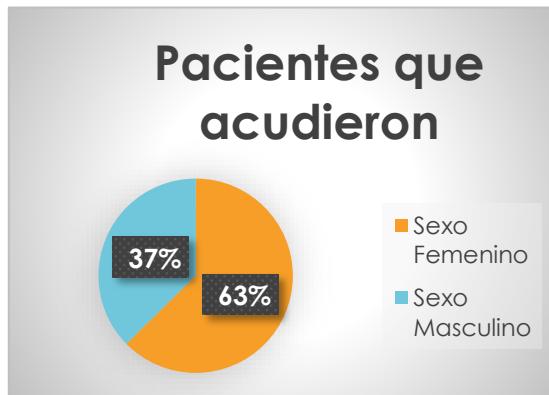
La muestra 2 posee una banda de 219 pb en calle 12 (grupo 3) correspondiente a genotipo 43. La muestra 3 es no detectable para los 4 grupos de genotipos. Los controles funcionan correctamente.



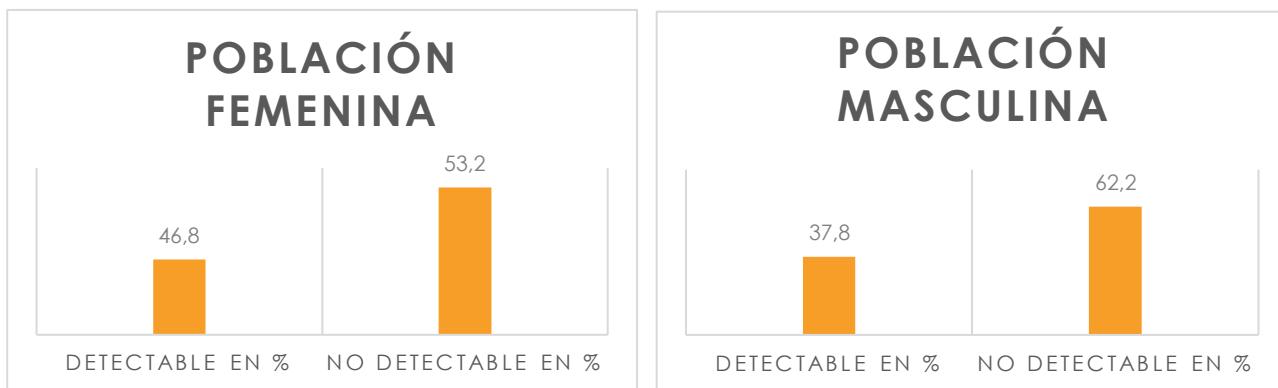
	Sexo Femenino	Sexo Masculino
Número total	62	37
% total	62,6	37,4
Detectable (en números)	29	14
Detectable en %	46,8	37,8
No detectable (en números)	33	23
No detectable en %	53,2	62,2

Del total de muestras analizadas (N=99), se evidenció un 43,43% (**n=43**) de pacientes (hombres y mujeres) con resultado detectable de HPV. Estos resultados son similares a los reportados por Sijvarger, Gonzalez y colaboradores en Ushuaia en 2006, donde su prevalencia de infección fue del 41%.

Se pudo observar que es mayor el porcentaje de mujeres (63%) que concurren para la determinación realizada (sobre el porcentaje de los hombres 37%). Ver gráfico siguiente;



Se evidenció que dentro de la población femenina que acudió, un mayor porcentaje es no detectable (siendo de 53,2%) sobre los detectables (de 46,8%). Así mismo, en la población masculina analizada, se evidenció que un mayor porcentaje es no detectable (siendo de 62,2%) sobre los detectables (de 37,8%). A continuación, se puede observar los gráficos de dicho análisis;



Del total de pacientes con resultado detectables, he llevado a cabo su genotipificación. A partir del mismo, se evidenció un 41,8% de genotipos de alto riesgo y un 58% de genotipos de bajo riesgo.

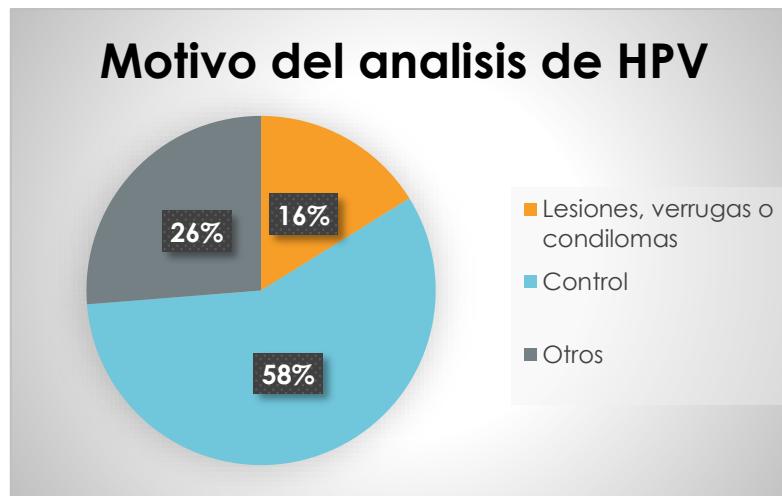


Este resultado se diferencia de los obtenidos en otras investigaciones como las reportadas por García, Schmitt y colaboradores en 2010 en Bogotá, donde genotipos de alto riesgo, como el HPV 16, es el más frecuente.

	%
Genotipo de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59)	41,8
Genotipo de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44)	58



Además, es importante destacar que de los 99 pacientes que acudieron, el 16% (n=16) de ellos concurrieron debido a la presencia de lesiones, verrugas o condilomas; 57% (n=57) de ellos acudieron por control por evidencia de actividad viral en el estudio de Papanicolaou o resultados previos positivos y el 26% (n=26) restante por otras razones, como ser: adenomas, tumores, candidiasis, etc.



De los 16 pacientes que concurrieron con lesiones o verrugas, 7 de ellos dieron un resultado detectable.
De los 57 que acudieron por control, 25 dieron resultado detectable.

Con respecto a la detección de infecciones simples y mixtas; se obtuvo un 58,13% (n=25) de frecuencia de infección simple y un 41,8% (n=18) de infecciones mixtas, mientras que García, Schmitt y colaboradores obtuvieron frecuencias de 19,4% para infecciones simples y de 80,6% para infecciones múltiples.



Esta diferencia puede deberse a la distinta sensibilidad de las técnicas empleadas y a que la técnica utilizada en este estudio evalúa 19 tipos virales, en comparación con 48 tipos virales detectados por los estudios citados.

Por último, entre los pacientes que acudieron, es importante destacar las edades:

Rango de edades (años)	Número de pacientes	Número de Detectables
19 a 29	32	14
30 a 39	35	15
40 a 49	17	8
50 a 59	9	2
61 a 74	6	4

Se puede observar un mayor número de pacientes entre las edades de 20 a 49 por ser el rango etario de generalmente mayor actividad sexual. En el rango de 19 a 29 años no estaría justificado el pedido de análisis molecular para HPV porque, como se mencionó anteriormente, la infección es generalmente transitoria y existe una alta tasa de reinfecciones que no justifican la búsqueda del virus en edades tempranas porque generan un gasto innecesario en salud pública siendo recomendable la búsqueda del virus recién a partir de los 30 años. (Schiffman, The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. , 2005) y (Schiffman M. &, 2003)

A su vez, se evidencia un 86,04% (n=37) de resultados detectables en ese mismo rango etario. Este resultado es semejante a los vistos por Sonaja en Venezuela en el 2013.

Conclusión

Se logró detectar y genotipificar el HPV en las muestras analizadas, realizando satisfactoriamente todas las etapas desde la extracción y purificación del ADN viral hasta la aplicación de la Nested PCR

Por medio de este estudio adquirí habilidad en la búsqueda bibliográfica y destreza en el área de biología molecular, interiorizándome en la técnica y metodología para diagnóstico de HPV usado en nuestra región.

Bibliografía

- Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. C., & Cornejo Romero, A. (s. f.). *Extracción y purificación de ADN* (Nº 26). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- Álvarez Aldana, A., Sepúlveda Arias, J. C., & Siller López, F. (2012). CARCINOGENESIS INDUCIDA POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO. *Investigaciones Andina Scielo*, Vol.14(Nº24). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-81462012000100007
- American Cancer Society. (2020). *VPH y cáncer*.
<https://www.cancer.org/es/saludable/causas-del-cancer/agentes-infecciosos/vph/vph-y-cancer.html>
- Carballal, G. & Oubiña, J. (2014). Virología Médica. 4ta Edición. *Corpus Libros Médicos y Científicos*. Buenos Aires.
- Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection – Fact Sheet (2018). <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm>
- Encina S., G. (2013). Biología Molecular en oncología: Lo que un clínico debiera saber. *REV. MED. CLIN. CONDES*, Vol. 24(Nº4 (563–570)).
https://www.researchgate.net/figure/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-o-PCR_fig3_273093462
- Fierro Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, Mexico D.F. ISBN: 978-607-8246-72-4
- Fouéré, S., & Biver Dalle, C. (2016). Lesiones cutáneas y mucosas asociadas al virus del papiloma humano. EMC Dermatología El Sevier, Vol. 50(Nº1 Pág. 1–12).
[https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(16\)76333-3](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(16)76333-3)
- García, D. A., Schmitt, M., Cid-Arregui, A. & otros (2010). Genotipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de cepillados cervicales de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. Vol. 61 (Nº4).
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342010000400004
- González Martínez, G., & Núñez Troconis, J. (2014). Historia natural de la infección por el virus del papiloma humano: una actualización. *Invest Clin* 55(1): 82 - 91.
<http://ve.scielo.org/pdf/ic/v55n1/art09.pdf>
- Koltai T. (2011). Manual de biología molecular: Técnicas de laboratorio.
- National Cancer Institute. Cancer Stat Facts (2018). <http://seer.cancer.gov/statfacts/>



- Romero, E. S., & Salvador, Z. (2019, 17 octubre). *¿Qué es el virus del papiloma humano? - Tipos, contagio y vacunas.* Reproducción Asistida ORG.

<https://www.reproduccionsistida.org/hpv-virus-del-papiloma-humano/>

- Ryan, K. M., Phillips, A. C., & Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current opinion in cell biology*, 13(3), 332-337.

- Sanoja, L. M. (2013). Detección y tipificación del virus del papiloma humano mediante reacción en cadena de polimerasa, en muestras cervicales de estudiantes: Universidad de Carabobo. Venezuela. *Comunidad y Salud Scielo*, Vol. 11(Nº2).

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-32932013000200002

- Schiffman, M., & Castle, P. E. (2005). The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. *New England Journal of Medicine*, 353(20), 2101–2104.

<https://doi.org/10.1056/nejm058171>

- Schiffman, M., & Kjaer, S. K. (2003). Chapter 2: Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia. *JNCI Monographs*, 2003(31), 14–19.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003476>

- Sendagorta-Cudósa, E., Burgos-Cibriánb, J., & Rodríguez-Iglesiasc, M. (2019). Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *El Sevier FORMACIÓN MÉDICA CONTINUADA: INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL*, Vol. 37(Nº5), 324–334.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.010>

- Shlesinger, R. (2021, 23 agosto). *¿Cómo encontrar un método de extracción de ARN que funcione para tu laboratorio?* AllScience. <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/como-encontrar-un-metodo-de-extraccion-de-arn-que-funcione-para-tu-laboratorio>

- Sijvarger, C. C., & González, J. V. (2006). Epidemiología de la infección cervical por virus Papiloma humano en Ushuaia: Argentina. *Revista Argentina de Microbiología Scielo*, Vol. 38(Nº1). http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412006000100005&script=sci_arttext

- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A & Otros. (2004). Detección y tipificación del virus del papiloma humano mediante E6 Nested Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42(Nº 7), 3176–3184. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>