

Estudio de variantes intra-tipo del virus del papiloma humano tipo 16, por análisis nucleotídico de la región MY09-MY11

Mg Scs. Jhon Fredy Cruz Gómez, Lusmary Márquez, Militza Quintero Vega, Marco Bastidas, Dr. Juan Puig Pons

LABIOMEX, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

RESUMEN

Objetivo: Identificar variantes intratipo de VPH16 mediante el análisis de la región MY09/ MY11 del gen L1, en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental Labiomex, Universidad de Los Andes. Mérida.

Métodos: Estudio descriptivo de corte transversal donde se procesaron 45 muestras del área genital, 38 femeninas y 7 masculinas, que presentaron infección por VPH16. Se realizó un análisis polimórfico de cadena sencilla del ADN (SSCP) con la finalidad de descubrir diferencias polimórficas de intratipo, se analizaron los diferentes polimorfismos hallados por secuenciación automática, y se establecieron las relaciones filogenéticas y funcionales de las variantes encontradas.

Resultados: Se logró detectar tres variantes intratipo de VPH16 de la región MY09/ MY11 del gen L1. Las variantes corresponden a sustituciones nucleotídicas sinónimas. Se determinó que las 3 variantes detectadas de VPH16 pertenecen a la clase europea.

Conclusiones: El análisis polimórfico de la región L1 permitió determinar la presencia de variabilidad intratipo en el gen L1 de VPH16. Todas las variaciones fueron de tipo mutación puntual, no se detectaron inserciones ni deleciones. Se logró identificar la secuencia del clon referencial VPH16, lo cual resulta importante para el desarrollo de sistemas de diagnóstico, tipificación y vacunas.

Palabras clave: Virus de papiloma humano. Cáncer. Variantes intratipo. PCR. RFLP. SSCP. Filogenia.

SUMMARY

Objective: Identify variants of HPV-16 intratyping by analyzing the region MY09 / MY11 L1 gene, in the Laboratory of Experimental Biology and Medicine LABIOMEX, Universidad de Los Andes. Merida.

Methods: Cross sectional study in which 45 samples were processed in the genital area, 38 female and 7 male, with infection by HPV16. Polymorphic analysis was performed on single stranded DNA (SSCP) in order to discover intratipo polymorphic differences were analyzed different polymorphisms found by automatic sequencing and phylogenetic relationships were established and functional variants found.

Results: Intratipo able to detect three variants of HPV16 in the study population in the region MY09 / MY11 L1 gene. Variants correspond to nucleotide substitutions synonymous. It was determined that 3 of HPV16 variants detected belong to the European class.

Conclusion: The analysis of the polymorphic region MY09/ MY11 allowed determining the presence of intratipe variability in the HPV16 L1 gene. All variations were kind of mutation, there were no insertions or deletions. We identified the sequences of HPV-16 reference clone, which is important for the development of diagnostic systems, characterization and vaccines.

Key words: Human papilloma virus. Cancer. Intratipe variants. PCR. RFLP. SSCP. Phylogeny

INTRODUCCIÓN

Actualmente está confirmado el rol etiológico de la infección con papilomavirus humano en el desarrollo del cáncer cervical (1). A pesar de ello, la infección no es causa suficiente y depende en cierto modo de

cofactores para la evolución de la enfermedad, tales como el uso prolongado de anticonceptivos orales, alto número de embarazos, fumar, coinfecciones con HIV, *Chlamydia trachomatis* e inmunosupresión. Al

parecer también juegan un papel importante factores inmunológicos del hospedero y factores propios de los tipos virales de papilomavirus tales como: la carga viral, integración viral y actualmente se considera a la variante de tipo viral como otro factor de riesgo (2). El rápido incremento del número de papilomavirus aislados obligó a establecer un sistema de clasificación taxonómica dentro de la familia *Papillomaviridae*. Este sistema de clasificación tiene como objetivos: establecer una relación entre los tipos virales, comparar el término tipo contra los términos taxonómicos género y especie, los cuales son usados para la sistemática de todos los organismos biológicos y son frecuentemente aplicados en virología, y también investigar las relaciones entre la clasificación taxonómica y las propiedades biológicas y patológicas del virus (3). El empleo de la secuencia nucleotídica para establecer relaciones entre papilomavirus, surgió hace 20 años, cuando E. M de Villiers, del Centro de Investigación Alemán del Cáncer en Heidelberg, Alemania, integró un sistema de clasificación y los nuevos tipos de papilomavirus son registrados en este centro solo si se confirma que el genoma ha sido completamente clonado a fin de corroborar que tiene la organización genética típica de los papilomavirus y la secuencia nucleotídica del gen *L1* difiere en más de un 10 % con respecto a otro tipo viral (4). Actualmente, la taxonomía oficial de los VPH está basada únicamente en la comparación de la secuencia nucleotídica del ORF *L1*, debido a que es el gen más conservado dentro del genoma viral y aun así, esta región presenta ligeras diferencias nucleotídicas que han permitido establecer la taxonomía. También se han empleado otros genes que han conducido a asociaciones taxonómicas similares pero no idénticas (5). Los estudios filogenéticos sugieren que estos virus, de origen monofilético (6), co-evolucionaron con la especie humana, por lo que se especula un origen africano (7); mientras que la diversificación de las variantes de cada tipo viral estuvo enlazada con la evolución y la migración del humano moderno, hace más de 200 mil años (8). Esta hipótesis sugiere que todo el espectro de enfermedades asociadas a las infecciones con VPH tales como: cáncer anogenital, verrugas genitales y laríngeas, han acompañado al humano a lo largo de su evolución (5). En los últimos años se ha podido establecer comparaciones entre secuencias de un mismo tipo viral junto con una secuencia referencial o prototipo y se ha determinado que un mismo tipo viral puede presentar diferentes genotipos que varían entre sí, en un 2 % en la región *L1*. Estas variantes intratipo, han demostrado poseer

una limitada diversidad genómica, lo cual sugiere una baja tasa evolutiva. Incluso, la aparente ausencia de recombinación inter e intratipo, aunado a que la replicación de estos virus depende estrechamente de la maquinaria celular hospedera con la que está en sincronía, puede colaborar con la limitada diversidad genómica de las variantes virales (5,9). En los últimos años, diversos estudios sugieren que las diferencias biológicas y funcionales entre las variantes intratipo, pudieran tener impacto en la etiología del cáncer, debido a variaciones en sus secuencias nucleotídicas, las cuales, tendrían un efecto considerable en la regulación de la replicación y la transcripción de las proteínas virales. Variaciones en la secuencia de los genes *E6* y *E7* podría ser de importancia funcional al modificar la estructura terciaria de estas proteínas y por ende, su función transformante. Las variaciones en el gen *L1* podrían alterar la habilidad del hospedador para responder inmunológicamente a los epítopes específicos de las variantes así como también, influir en el ensamblaje de la partícula viral (5,10,11). Ho y col. (1993) al analizar la secuencia de la región LCR de una colección mundial de variantes de VPH16, lograron identificar 5 ramas filogenéticas distintas, denominadas clases, que corresponden con las áreas geográficas de las que fueron obtenidas (7). Estudios posteriores de análisis de secuencia de las regiones genómicas *E6*, *LCR*, *L2* y *L1* ampliaron y complementaron estos resultados. Estos datos demuestran una fuerte co-variación de secuencias dentro de los aislados de VPH16 y sugieren que las variaciones nucleotídicas en una región genómica pueden usarse para distinguir linajes virales (12). El análisis de variantes intratipo a través del estudio de la secuencia nucleotídica del gen *L1*, es fundamental debido a que esta es la proteína principal de la cápside viral y por tanto, el primer antígeno a considerar para el desarrollo de vacunas y pruebas de diagnóstico (11).

MÉTODOS

Es un estudio descriptivo de corte transversal. Para el presente estudio se utilizaron muestras de ADN extraídas a partir de cepillados y biopsias del área genital de 45 pacientes, 7 hombres y 38 mujeres, que asistieron a la consulta pública y privada de la población merideña con edades comprendidas entre 18 y 56 años de edad, los cuales acudieron voluntariamente a consulta ginecológica y urológica en diversos centros asistenciales privados de la ciudad de Mérida, y se les practicó, previo consentimiento informado, un examen de tipificación de VPH. Para

la recuperación de las células epiteliales en el cepillo citológico, se agregó solución salina 0,8 % y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Se retiró el cepillo citológico y la solución se centrifugó a 11 000 g por 10 min en una micro-centrífuga Eppendorf 5424, se descartó el sobrenadante y se recuperó el paquete celular correspondiente a las células epiteliales (13).

Extracción de ADN: La extracción del ADN se realizó según el protocolo de Blin y Stafford (14), al cual se le realizaron algunas modificaciones. El paquete celular se resuspendió en 200 µL de tampón de Lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.2; EDTA 2 mM; y NaCl 400 mM), 20µL de SDS 10 % y 8 µL de Proteinasa K (10 mg/mL). Se incubó a 55 °C durante 2 h. Seguidamente, se agregaron 200 µL de Chelex-100 al 5 % y se calentó por 10 min a 95 °C. Se centrifugó 10 000 rpm por 10 min en una centrifuga Eppendorf 5424 y se tomaron 400µL de la capa superior a la cual se le añadieron 2 volúmenes de etanol puro en frío y 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10M, se dejó precipitar el ADN a -20 °C durante 12 h. Se centrifugó para bajar el precipitado y se resuspendió el ADN en 200 µL de tampón TE 10 mM pH 8.

Amplificaciones por PCR: Las muestras de ADN se sometieron a una PCR que amplifica un fragmento del gen de la β-globina, para determinar la calidad del ADN (15). La detección y tipificación de VPH se realizó en un estudio previo mediante el sistema de PCR MY09/MY11(13). Se amplificó la región L1C1 del gen L1 de VPH16 utilizando los oligonucleótidos L1C1/L1C2, desarrollados por Yoshikawa y col. (16), los cuales amplifican la región ubicada en la posición 5610-5863, originando un amplificado aproximado de 250 pb. La mezcla de reacción consistió en tampón de PCR 1X, 2.0 mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 25pmoles de cada uno de los iniciadores y 0,5U de Taq polimerasa (Invitrogen). Para las reacciones se utilizó un termociclador Eppendorf *Mastercycler ep gradient S* con el siguiente programa de amplificación: 1 min a 94 °C, 30 seg a 44 °C y 30 seg a 72 °C. Los resultados fueron observados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 6 % en tampón TBE 0,5X.

Análisis por PCR-SSCP: Una vez obtenidos los amplificados L1C1 de VPH16 se utilizó la técnica de PCR-SSCP para analizar las variaciones (17). El aparato de electroforesis utilizado fue una cámara de marca Hoffer SE 660 Amersham Bioscience, acoplada a un refrigerante Poly Science Moldel 90. Los vidrios fueron de 18 x 16 cm, y el grosor del gel fue 0,4 mm con una concentración de poliacrilamida 16 %. Los amplificados fueron desnaturalizados, empleando para ello el mismo volumen de tampón de carga para

SSCP (Formamida 95 %, EDTA 20mM y Azul de bromofenol 0,05 %), se sometieron a 95 °C durante 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo por 10 min. Se sometieron a electroforesis en un campo eléctrico a 1285 V y 30 W en una fuente de poder modelo EC 4000P series 90 por 6 h. Los patrones de SSCP fueron visualizados mediante tinción con nitrato de plata (18).

Se secuenciaron las isoformas encontradas por la PCR-SSCP, de la región L1C1 de VPH16, en un secuenciador automático (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Control de los tipos virales y clon referencial: La base de datos del Laboratorio Nacional Los Alamos, Nuevo México EE.UU, identificó, en 1994, el clon referencial de VPH16 (19). El número de acceso de la secuencia nucleotídica en la base de datos del GenBank es VPH16R (114/K): EU118173. El control de ADN empleado para los sistemas PCR MY09/11, RFLP, PCR-L1C1, SSCP y secuenciación consistió en amplificados de toda la región L1 de VPH16 clonado en el plásmido pGEM® T- Easy (20).

Análisis filogenéticos de las variantes de VPH16: Para realizar el análisis filogenético de las variantes detectadas de VPH16, fue necesario realizar un alineamiento múltiple entre las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio, la secuencia del clon referencial y las secuencias de las variantes reportadas en el trabajo de Yamada y col. (12); las cuales, permitieron establecer las principales clases filogenéticas. Para ello se empleó el programa MUSCLE y los resultados fueron exportados al programa MEGA 4.0, a fin de realizar el árbol filogenético bajo el método de máxima parsimonia (MP) que permite escoger y establecer las relaciones filogenéticas del árbol de una forma directa.

RESULTADOS

Sistema PCR-β-globina: Mediante este sistema de amplificación se pudo determinar la calidad del ADN purificado. Para todas las muestras se obtuvo un producto de PCR de la longitud esperada (260pb), indicando que el ADN estaba en condiciones adecuadas para someterlo a otras reacciones de PCR.

Tipificación de VPH16 por PCR-RFLP: Mediante el sistema de PCR MY09/11 se pudo amplificar un segmento de aproximadamente 450 pb del gen L1 de VPH. En todas las muestras se obtuvo una sola banda, de señal intensa. El producto de PCR fue sometido a digestión con las enzimas DdeI y RsaI

(sistema RFLP) y cada muestra fue tipificada en base al patrón de digestión y estableciendo comparaciones con la base de datos de Bernard y col. (21).

Análisis PCR-SSCP: Se tipificaron 45 muestras como VPH16, estas muestras se sometieron a un análisis PCR-SSCP. Se definieron 6 isoformas electroforéticas distintas incluyendo el control interno, se seleccionó una muestra representativa de cada isoforma electroforética (Figura 1) y se procedió a secuenciar cada muestra. Las muestras seleccionadas fueron denominadas según la clave de la colección de nuestro laboratorio: LAB-control, LAB1256, LAB1242, LAB1193, LAB06-271 y LAB07-439.

En las muestras tipificadas con VPH16, se analizaron 360 nucleótidos (posición 6663-7023) obtenidos de la secuenciación de la región MY09/11 de L1. Se realizó un análisis de secuencia utilizando

el programa BLAST (22) que incluía la secuencia del clon referencial 114/K número de acceso al GenBank EU118173 (23). El resultado del alineamiento de las secuencias con el programa BLAST reveló que las muestras LAB-control, LAB06-271, LAB07-439 y LAB1193 presentaban una homología del 100 % con el clon referencial, las muestras LAB1242 y LAB1256 presentaban una homología de 99 % con el clon referencial, el análisis de homología de la secuencia nucleotídicas se muestra en el Cuadro 1.

A través de los resultados obtenidos en el BLAST y el alineamiento múltiple entre las secuencias nucleotídicas obtenidas y el clon referencial (Cuadro 1), en el segmento de 360 nucleótidos, se pudo detectar la presencia de tres variantes de VPH16. Una de ellas, presente en cuatro muestras: LAB control, LAB06-271, LAB07-439 y LAB1193 presentó una secuencia nucleotídica igual a la del clon referencial. La segunda variante, detectada en la muestra LAB1242, presentó una variación en la posición 6700 de una adenina por una guanina, que aún no ha sido reportada en la base de datos; mientras que la tercera variante identificada, presente en la muestra 1256, mostró el mismo tipo de variación pero en la posición 6883 y tampoco ha sido reportada. Ambas variantes difieren solo en el 1 % del clon referencial y pueden ser consideradas nuevas variantes virales de VPH16.

Árbol filogenético para las variantes intratipo VPH16

El árbol de la Figura 2 representa las relaciones filogenéticas intratípicas para las variantes de VPH16 detectadas. Se incluyeron las secuencias nucleotídicas de 28 *taxas* reportadas por Yamada y col. (12), el clon referencial y las secuencias de las muestras analizadas de VPH16. La tasa de replicación del análisis (test de Bootstrap) fue de 500. Se evaluaron las posiciones 1era+2da+3ra+no

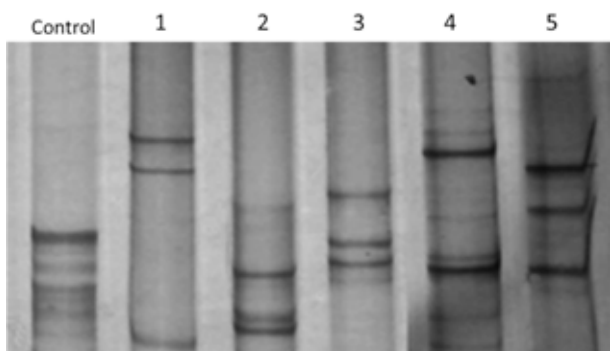


Figura 1. Resultados de la técnica SSCP de la región LIC1 para las muestras tipificadas con VPH16: control VPH16. Pozo 1: muestra 07-439. Pozo 2: muestra 06-271. Pozo 3: muestra 07-350. Pozo 4: muestra 1242. Pozo 5: muestra 1256.

Cuadro 1. Variaciones nucleotídicas detectadas en los aislados de VPH16. Se señalan los sitios 6700 – 6883 donde se presentan sustituciones nucleotídicas para las muestras LAB1242 y LAB1256.

Muestra	Secuencia de la región MY09/MY11 del gen L1 de VPH16	
	6700	6883
EU118173.1	agaaactacaataaaaatactaa.....	aggcacactagaagatactt
LABcontrol	agaaactacaataaaaatactaa.....	aggcacactagaagatactt
LAB06-271	agaaactacaataaaaatactaa.....	aggcacactagaagatactt
LAB07-439	agaaactacaataaaaatactaa.....	aggcacactagaagatactt
LAB1193	agaaactacaataaaaatactaa.....	aggcacactagaagatactt
LAB1242	agaaactacaataaaaatactaa.....	aggcacactagaagatactt
LAB1256	agaaactacaataaaaatactaa.....	aggcacactagaagatactt

codificante. De los 360 posiciones nucleotídicas evaluadas, 9 representaron cambios nucleotídicos y 8 de ellas fueron sitios informativos parsimoniosos, obteniendo una robustez superior a 64 %. Como puede observarse en este árbol filogenético, se pudo reproducir las principales clases filogenéticas del tipo viral VPH16 como son: europea, africana 1, africana 2, norteamericana y asiática-americana. De acuerdo a este árbol, el clon referencial, representado en este estudio por las muestras: LABcontrol, LAB06-271, LAB1193 y LAB07-439, así como también las nuevas variantes nucleotídicas detectadas: LAB1242 (sustitución nucleotídicas tipo A6700G) y LAB1256 (sustitución nucleotídicas de tipo A6883G) están incluidas dentro de la clase europea.

DISCUSIÓN

La proteína mayor de la cápside de los papilomavirus, codificada por el gen *L1*, es el blanco principal para la respuesta neutralizante por anticuerpos, los cuales se enlazan, específicamente, a epítopos conformacionales de superficie (24). Cambios en la secuencia nucleotídica de *L1* podrían inducir alteraciones estructurales, que no solo modificarían el reconocimiento por anticuerpos, sino también, podrían alterar el ensamblaje de la partícula viral (25). Debido a que esta investigación constituye el primer estudio sobre la variabilidad intratipo de VPH16 en Venezuela; era importante determinar, empíricamente, la presencia de este tipo de variabilidad en los tipos virales más frecuentes en esta región del país. Es por ello que se empleó la técnica SSCP para determinar la presencia de variabilidad intratipo en el gen *L1*. Para obtener óptimos resultados mediante la SSCP, uno de los parámetros a considerar es el tamaño del fragmento que se quiere analizar, el cual debe no debe exceder los 250pb (26) es por esta razón que se seleccionó la región *L1C1*, de 250pb. Ubicada en la zona N-terminal del gen *L1*, específicamente en la posición 5 610-5 863, esta región es empleada como otro método de diagnóstico del virus reportando resultados confiables (27).

Los resultados obtenidos mediante la técnica SSCP para la región *L1C1*, reveló patrones de migración distintos entre las muestras tipificadas con el mismo tipo viral. Estos resultados sugieren que la región *L1C1* es una zona que presenta variación nucleotídica intratipo. El análisis de homología con el programa BLAST de los 360 nucleótidos obtenidos de la región MY09/11 de las muestras tipificadas con VPH16, indicó la presencia de 3 diferentes variantes

nucleotídicas. Una de ellas, la variante del clon referencial, estuvo presente en 4 muestras. Esta secuencia referencial pertenece a un aislado alemán del linaje europeo (12), clado considerado como el más prevalente pero el menos oncogénico entre las 5 clases filogenéticas (28). Las otras dos variantes detectadas, aún no han sido reportadas en la base de datos del GenBank.

Para realizar los análisis filogenéticos de las variantes de VPH16 detectadas, fue necesario trabajar en base a las variantes reportadas por Yamada y col. (12) el cual alineó las secuencias de 3 690 nucleótidos pertenecientes a las regiones *E6*, *L2*, *L1* y *LCR*, con 92 sitios parsimoniosos, los cuales aportan la información para el diseño del árbol. Es posible reproducir este árbol tomando en cuenta solo una pequeña porción nucleotídica de la empleada por este autor. Esto es posible fundamentalmente a que los ORFs presentan prácticamente una divergencia similar, debido a que la presión evolutiva es equivalente a lo largo de todo el genoma; sin embargo, la región reguladora se desvía ligeramente de esta afirmación por no codificar una proteína vital para el virus, es capaz de acumular y tolerar mutaciones (4).

En este trabajo se realizó la filogenia analizando solo 360 nucleótidos correspondientes a la región MY09/11; por tanto, en este análisis se discriminó gran cantidad de nucleótidos contando solo con 8 sitios parsimoniosos, los cuales fueron suficientes para reproducir las 5 clases reportadas por Yamada y col. (12), pero no para llegar a distinguir las sub-clases P, As y G131 de la clase europea que se presentaron dispersos dentro del clado (Figura 2). De acuerdo a este árbol, las variantes detectadas se agrupan en el clado europeo. Como era de esperarse, las variantes que presentaron la secuencia del clon referencial se ubicaron a igual distancia evolutiva del prototipo; mientras que las variantes presentes en las muestras LAB1242 y LAB1256, que varían en un nucleótido del clon referencial, la distancia fue de 0,3 %, índice que está dentro del rango reportado para la distancia máxima intratipo de 2,5 % para regiones codificantes, la distancia máxima intratipo en una región no codificante como la región *LCR*, puede llegar a 5 % (9), lo cual indica que esta región puede presentar mayor número de variaciones que pueden alterar la capacidad transcripcional y posiblemente el potencial oncogénico y continuar perteneciendo al mismo tipo viral.

Las variantes de VPH16 del clado europeo son las más prevalentes a nivel mundial; mientras que las variantes Africana y Asiática-América son menos

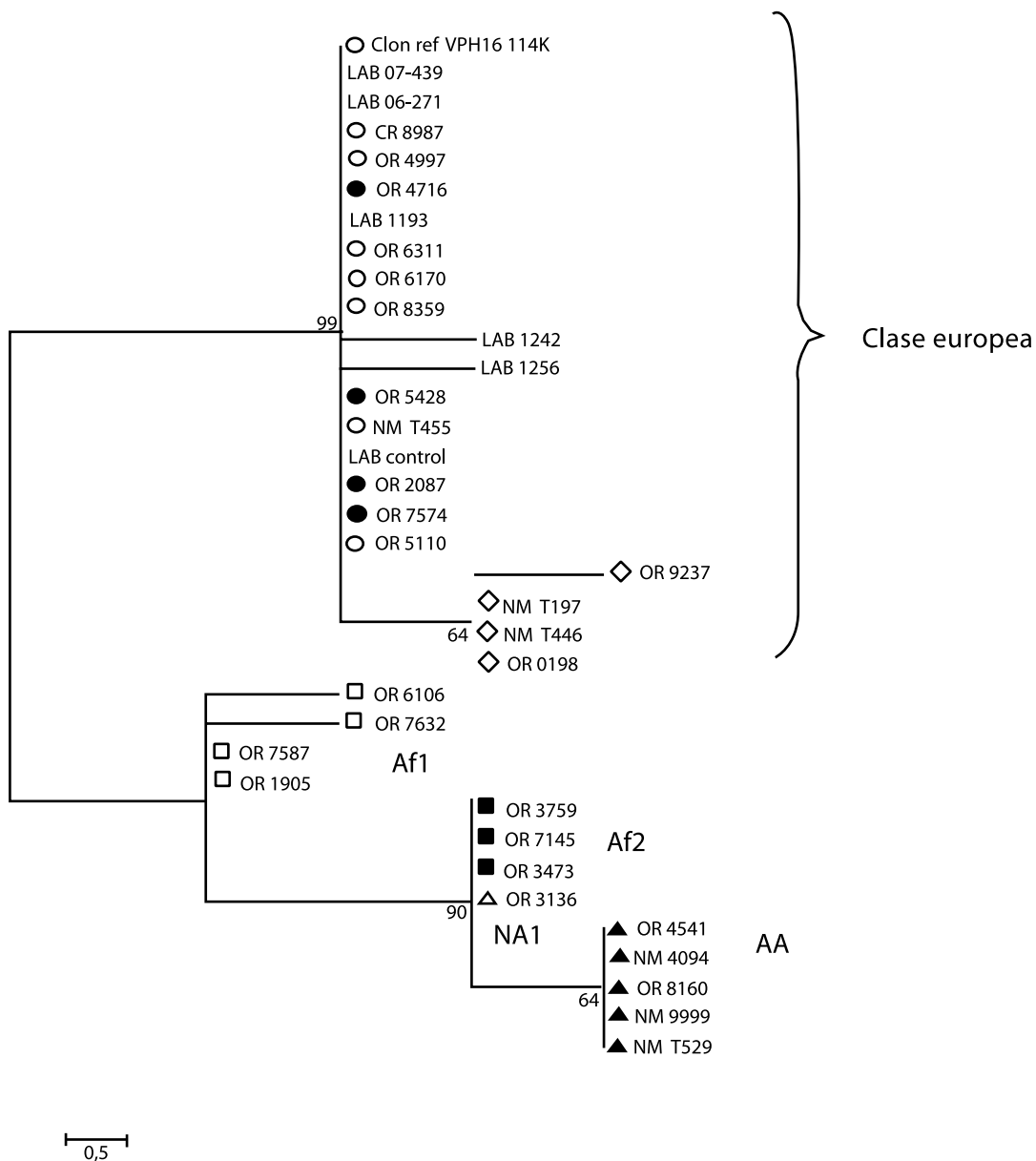


Figura 2. Filogenia para variantes de VPH16 basado en análisis de parsimonia para las secuencias nucleotídicas de la región MY09/11 detectadas junto con las variantes reportadas por Yamada y col. (12). Las muestras que comienzan por las letras LAB son las variantes detectadas en este estudio Las variantes con círculos blancos pertenecen a la subclase europea P. Los círculos negros a las variantes de la subclase europea As. Los rombos blancos a la subclase europea G131. Las variantes con cuadrado blanco pertenecen a la clase Af1. Los cuadrados negros a la clase Af2. El triángulo blanco a la clase NA1 y los triángulos negros a la clase AA. Los números indican la robustez del nodo para 500 réplicas.

prevalentes, pero están relacionadas con propiedades biológicas y epidemiológicas alteradas, resultando en un incremento de la carcinogénesis. Sin embargo, se debe considerar que esta afirmación está sesgada, ya que estas variantes casualmente tienen una alta

prevalencia en países de Latinoamérica, África y parte de Asia, regiones que poseen otros cofactores como un deficiente sistema de salud pública y alta tasa de nacimientos los cuales podrían alterar esta conclusión (21). En México, el 88 % son variantes

Asiática-Americana, lo cual posiblemente contribuya con los elevados índices de cáncer cervical (29); mientras que en Argentina, el 74 % son europeas y 26 % otras clases, principalmente Africana pero no se ha establecido relación entre cáncer y clases (30).

Agradecimientos

Al CDCHT-ULA por el financiamiento para el presente estudio por el proyecto H-1270-09-07-EM y con ayuda del FONACIT a través del programa "Plan de desarrollo de Talento Humano".

Al Personal Técnico y Obrero de LABIOMEX-ULA.

A todos los médicos que contribuyeron con la recolección de las muestras en sus respectivas consultas, en especial a la Dra. Adriana Rodríguez.

REFERENCIAS

- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:690-698.
- Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de G A, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24(Suppl 3):1-10.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17-27.
- Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, et al. Papillomavirus Subtypes Are Natural and Old Taxa: Phylogeny of Human Papillomavirus Types 44 and 55 and 68a and -b. *J Virol.* 2005;79:6565-6569.
- Bernard HU, Calleja-Macias I, Terence D. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Inter J Cancer.* 2006;118:1071-1076.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M. Molecular Variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol.* 1992;66:2057-2066.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, et al. The Genetic Drift of Human Papillomavirus Type 16 Is a Means of Reconstructing Prehistoric Viral Spread and the Movement of Ancient Human Populations. *J Virol.* 1993;67:6413-6423.
- Ong CK, Chan SY, Saveria-Campo M, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: An ancient phylogenetic root in Africa and intratype Diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* 1993;67:6424-6431.
- Stewart ACM, Eriksson AM, Manos MM, Muñoz N, Bosch FX, Peto J, et al. Intratype Variation in 12 Human Papillomavirus Types: A Worldwide Perspective. *J Virol.* 1996;70:3127-3136.
- Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez AC, et al. Human Papillomavirus Type 16 Variants and Risk of Cervical Cancer. *J N Cancer Inst.* 2001;93:315-318.
- Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, et al. Human papillomaviruses type 16 variant analysis of E6, E7 y L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north india. *J Clin Microb.* 2008;46:1060-1066.
- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA. Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in United States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6, L2, and L1 Coding Segments. *J Virol.* 1995;69:7743-7753.
- Quintero VM, Cruz GJF, Bastidas M, Márquez L, Pons P. Detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2008;68:25-31.
- Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 1976;3(9):2303-2308.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-1354.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cáncer Res.* 1991;82:524-531.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1989;86:2766-2770.
- Cruz J, Quintero M, Fernández L, Condezo G, Bastidas M, Puig J. Distribución del polimorfismo del codón 72 del gen p53 en lesiones de cuello uterino. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2010;70(1):31-36.
- HPV Sequence Database 1994 disponible en <http://hpv-web.lanl.gov/>
- Fernández, L. Clonamiento y secuenciación parcial de la proteína L1 de diferentes virus del papiloma humano encontrados en el Estado Mérida, Venezuela. 2009 Memoria para optar por el grado de Magister scientiae en Biología Molecular. Universidad de Los Andes. Labiomex.
- Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32(Suppl):1-6.
- NCBI. BLAST. Programa de alineamiento de secuencias en Internet. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Kimbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissman L, et al. Efficient self-assembly of human

- papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 1993;67:6929-6936.
24. Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Molecular Cell.* 2000;5:557-567.
 25. Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND, Zhao R. Crystal Structures of Four Types of Human Papillomavirus L1 Capsid Proteins. *J Biol Chem.* 2009;282:31803-31811.
 26. Mitterski B, Kruger R, Wintermeyer P, Epplen JT. PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations in large scale screening projects. *CCTS* 2000;3:211-218.
 27. Asato T, Maehama T, Nagai Y, Kanazawa K, Uezato H, Kariya K. A Large Case-Control Study of Cervical Cancer Risk Associated with Human Papillomavirus Infection in Japan, by Nucleotide Sequencing-Based Genotyping. *JID.* 2004;189:1829-1832.
 28. Slichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Inter J Cancer.* 2007;120:1763-1768.
 29. Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52 y 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2005;79:13630-13640.
 30. Tonón S. Distribución heterogénea de variantes de virus papiloma humano tipo 16 en mujeres aborígenes guaraníes con distinto grado de lesiones de cervix residentes en Misiones, Argentina. 2005. Disponible en: www.siicsalud.com/dato/dat048/06406028.htm

Salud oral durante el embarazo y a lo largo de la vida

La salud oral es un componente importante de la salud general y se debe mantener durante el embarazo y a través de la vida de la mujer. El mantenimiento de una buena salud oral puede tener un efecto positivo en las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y otros trastornos. En 2007-2009, el 35 % de las mujeres estadounidenses informaron de que no habían consultado al odontólogo en el último año y el 56 % de las mujeres no visitaron al dentista durante el embarazo. El acceso a la atención dental está directamente relacionado con el nivel de ingresos, las mujeres más pobres tienen menos probabilidades de haber recibido atención dental. La higiene bucal materna óptima durante el período perinatal puede disminuir la cantidad de caries que producen las bacterias orales transmitidas al bebé durante el comportamiento de los padres, tales como compartir cubiertos. Aunque algunos estudios han demostrado una posible asociación entre la infección periodontal y el parto prematuro, la evidencia ha demostrado una mejoría en los resultados después de un tratamiento dental durante el embarazo. Sin embargo, estos estudios no manifestaron ninguna preocupación por la seguridad de los servicios dentales durante el embarazo. Para potenciar la salud general y el bienestar de las mujeres rutinariamente debe aconsejar sobre el mantenimiento de buenos hábitos de salud oral durante toda la vida, así como la seguridad y la importancia del cuidado de la salud bucal durante el embarazo.

Se concluye que el cuidado dental regular es un componente clave para una buena salud oral y general. A pesar de la falta de evidencia de que los servicios de salud bucal prenatal mejoran los resultados del embarazo, una amplia evidencia muestra que el cuidado de la salud bucal durante el embarazo es seguro y debe ser recomendado para mejorar la salud oral y general de la mujer. Mejorar la salud oral de la mujer puede reducir la transmisión de bacterias potencialmente cariogénicas a los bebés y reducir el riesgo futuro de los niños de la caries. Para muchas mujeres, los gineco-obstetras son los profesionales de la salud frecuentemente más visitados, lo que brinda una oportunidad única para educar a las mujeres durante toda su vida, incluso durante el embarazo, sobre la importancia de la atención dental y la higiene bucal.

Traducido por R Pérez D'Gregorio de: ACOG, The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Health Care for Underserved Women. Committee Opinion. Number 569, agosto 2013. Disponible en: http://www.acog.org/Resources_And_Publications/Committee_Opinions/Committee_on_Health_Care_for_Underserved_Women/Oral_Health_Care_During_Pregnancy_and_Through_the_Lifespan