



TESIS DOCTORAL

TÍTULO (en español)

NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LESIONES PLANTARES POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

NOMBRE Y APELLIDOS DEL AUTOR/A

ALBERTO ALDANA CABALLERO

PROGRAMA DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Modelización y Experimentación en Ciencia y Tecnología (R007)

Conformidad del director/a y codirector/a en su caso (Deben constar nombres y apellidos)

RAQUEL MAYORDOMO ACEVEDO

FÉLIX MARCOS TEJEDOR

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y codirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

AÑO DE LECTURA

2023

TESIS DOCTORAL

**NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN
LESIONES PLANTARES POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.**

Alberto Aldana Caballero

Programa de Doctorado en Modelización y Experimentación en
Ciencia y Tecnología (R007)

Universidad de Extremadura

2023

*“Tu pie forma parte de la
infraestructura de almacenar
conocimiento.”*

-Ter, 2021.

AGRADECIMIENTOS

Una página en blanco se me parece a un desierto, y eso se presta a dos cosas: un sentimiento abrumador y otro estimulante por las posibilidades creativas que te ofrece algo en blanco, virgen, nuevo e inexplorado. Aventurarse en el doctorado se me antoja a una experiencia similar, algo desértico que te hace estar abrumado por todo lo que es, y estar excitado por las infinitas posibilidades que ofrece de forma simultánea.

Esa exploración comienza en 2017 con mi primer viaje a Plasencia para ver las primeras tentativas e ideas de proyectos con Félix, mi director de tesis. En aquel entonces un viejo conocido, aunque a veces me gusta más pensar en él como un cazatalentos, porque tiene una capacidad sobresaliente para detectar las capacidades de la gente e hilar a largo plazo el desarrollo profesional que puede realizar una persona, un grupo de estudiantes o, el tiempo ha demostrado, incluso una facultad entera. A él tengo que agradecerle que yo me reenganchara con el mundo académico en un momento de re-descubrimiento personal. Agradecerle que creyera en el proyecto, ya no sólo de tesis, sino en el mío profesional y un poquito también en el mío personal, porque un poco sí me conoce, y sabe lo que realmente me llama y me llena. Gracias, Félix.

Conocí ese día a Leticia, quien me animó a pedir el contrato de investigación de la Fundación Valhondo, que acabé obteniendo e hice maletas desde Reino Unido a España a dedicarme a investigar. Gracias por ello, pero también por el ocio compartido, las tapas, las clases de TRX y por los consejos.

Por suerte, el camino no lo realizaba sólo con la guía de Félix. A su lado, codo con codo, estaba y está Raquel Mayordomo, mi directora de tesis. Le agradezco haber apostado por la causa de hacer todo cuanto esté en su mano para que yo consiguiera el objetivo de convertirme en doctor en el proyecto de tesis en el que yo creía, y con el que estaba emocionado. Que creyera y crea en mí y en mis posibilidades, que permitiera que trabajase a mi ritmo, y

por apoyarme en todo momento, por su esfuerzo en asentir a cada idea y cada experimento que le proponía, que por su parte conllevaba un coste (a menudo de paciencia). Gracias por todo, Raquel.

No puedo dejar de lado agradecerle que, no sin esfuerzos, dirija un pequeño y humilde, pero funcional laboratorio de investigación, porque en él se dio cabida a la mejor familia de investigadores con la que conviví mis primeros años de tesis, y por la que estoy profundamente agradecido.

A Esther, en primer lugar, porque en ella encontré un espejío en el que mirarme. Por los días de poyata compartida, por ser la persona que necesitaba para hacer ameno el proceso y por hacerlo más fácil con sus consejos y su guía. Para mí guardaré siempre momentos como el de colocar la vitrina nueva, las mañanas comentando Juego de Tronos, por enseñarme técnicas de “chicle y chancla” y en general todo lo vivido. Gracias. En segundo lugar, a Pablo González, porque él llegó y revolucionó el laboratorio, le necesitábamos para equilibrar la rectitud, para hacerlo más desordenado, caótico y liberador. Encendiste la chispa en el laboratorio, me incluiste en los planes para volver a creer en esta ciudad que tanto me dio cuando fui estudiante, e hiciste que el laboratorio fuera un poquito un hogar. Para siempre quedan los momentos del *skyline* de placas, la virgen del matraz, las sesiones de fotos en bata y las llamadas de teléfono fingidas. Gracias.

Hablando de quienes te ayudan a solventar baches experimentales, debo agradecer a la Dra. Benito-Sánchez por recibirme en una ocasión en su laboratorio del Centro de Investigación del Cáncer para resolverme dudas, momento que considero realmente de inflexión después largo tiempo de experimentos frustrados.

Con el proyecto ya caminando, es fácil caer en la soledad del doctorado y olvidar que hay muchos tantos explorando sus propios desiertos. Por suerte vi que esos investigadores no estaban solos, sino que se unían. Y crearon un lema: “SAL DE LA CUEVA”. Y yo me di cuenta de que ser investigador predoctoral es mucho más

cuando te rodeas de la gente adecuada. Y aquí agradezco a ADUEX su existencia, por ser un punto de unión.

ADUEX trajo un conjunto de personas aún más destacadas. Una broma al candidato a la presidencia le hizo por alguna razón interpretar que yo era alguien de confiar. Y así lo hizo cuando me propuso formar parte de su Junta Directiva. Dos veces. Agradecido por haber compartido tanto y haber aprendido tanto de él. Por encontrar en él un referente como científico, como amigo, como entusiasta de ocios alejados del mainstream, del software libre, duck go, R, y como jugador de pádel aficionado. Gracias, Javier Vaquero.

Allí alguien me adoptó sin pedir permiso ni perdón como su *gemelier* particular. A Sonia Mota le agradezco mucho en este desierto inhabitado. Por los dramas, los podcast telefónicos, las horas en cursos que aumentaban nuestro afán por los desinfectantes, los consejos en momentos necesarios y por todas las veces que me contaba como le iba, y al colgar, sin ella saberlo, pensaba: “Venga, yo también quiero publicar como lo hace Sonia.”

Junto a estos dos, el grupo entero de *Los dramitas*. A todos vosotros y vosotras, gracias. Hicisteis del trayecto algo mágico, salvasteis la cuarentena con vinos y videollamadas, y por eso y mucho más os estaré siempre agradecido. Especialmente a Guada, que somos familia investigadora. A Olga, porque simplemente referente. A Sergio y Selene, por vuestro humor y ayuda con los procesos del STAB y mis secuencias. A Jimmy, porque es otro referente y a todos los demás, también gracias.

Hay una persona más, que me la dejo para este otro punto en el camino. Porque como en todo desierto, llega el oasis. Siempre tuve claro que mi tesis doctoral iría con estancia en el extranjero. A Claudia, por haber sido mi compañera de estancia al otro lado del Atlántico, aunque estuviéramos separados literalmente por diferentes zonas horarias dentro del mismo continente. Gracias por todo ello y por tus podcast de notas de voz.

Paro aquí a agradecer a la Universidad de Castilla-La Mancha y a las ayudas para el personal docente-investigador, por brindarme la oportunidad económica y laboral de haber hecho realidad mi estancia predoctoral. Con esta ayuda, tras innumerables obstáculos burocráticos y de salud pública derivados de una pandemia, puse rumbo destino a Calgary, Canadá. Gracias al Dr. Guido Van Marle, por haberse interesado desde el principio por acoger a un investigador predoctoral para un proyecto en virus del papiloma humano, en un momento en el que su laboratorio de virología estudiaba vacunas para el SARS-Cov2. Gracias por el entusiasmo, por haberme acogido y haberme hecho sentir como si estuviera en casa, por las ideas, la motivación, por el equipo investigador que ha creado en su laboratorio, pero más importante, gracias por mostrarme el tipo de investigador senior al que aspiro algún día a parecerme. Entre las personas que conformaron mi familia canadiense, no puedo eludir a Michelle Chen, hemos forjado algo que guardaré siempre dentro de mí, como en mi propio y particular USB, gracias por todo. Gracias también a Dan por enseñarme tanto, a Steph y Layla. A Rupali, Jane y Brayden. A todo el mundo de la oficina de *trainees* y a Donna por su paciencia con la burocracia. Gracias a todos los actores que hicisteis mi estancia tal y como fue, eso sí que fue un tesoro descubierto, un oasis, una tierra prometida.

La mayor parte de toda mi exploración predoctoral también fue en compañía de Pablo Cantero. Y no camino solo en forma de recurso literario, sino real. Para nosotros quedan los muchos kilómetros rodados entre nuestra vida placentina y nuestra vida bajo el techo de FacSalud. Por los viajes, las peleas por la playlist en el coche, por estar a través de una pantalla y también a 1.5m de distancia de seguridad camino al puerto, y por ser una persona casa. Gracias.

A todos mis compañeros de mi otra universidad, en especial a Inés y Laura, que han tenido mucha paciencia con este coordinador de título que sólo trataba de hacerlo todo lo mejor que podía pese a no abarcar a menudo con todo, y que gracias a ellas y su trabajo a menudo podía centrarme en la tesis.

Parte de esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de otros compañeros y compañeras de la podología, a los que agradezco mucho haberse prestado a colaborar con la parte logística de obtención de muestras de diferentes partes del país. Incluyo a G. Trejo, A. Reyes, E. Padilla, Dr. P Alfageme, A. Osorio, Dr. Navas-Harrison, E. Verjano, El centro de atención primaria La Data (SES) y la Clínica Podológica de la Universidad de Extremadura, con mención también a María y Maite por estar siempre tan atentas de los pacientes.

Dejo estas últimas líneas para agradecer a mi querida familia del *Sálvame*, que han estado ahí para absolutamente todo y con quien deseo seguir compartiendo la vida. Gracias a todas y todos, si incluimos las nuevas incorporaciones de tamaño pediátrico.

Gracias a mis *estampitas*, por sacarme de casa durante las vacaciones y fines de semana largos. Los que se eligen.

Y por último a toda mi familia, la que no se elige, si no la que te toca. Y agradecido estoy por la que tengo. A todos vosotros gracias, en especial a mi madre, que es de quien me gusta pensar que adquiriré el gusto por las palabras sobre el papel, el querer aprender y no querer dejar de hacerlo. Estoy convencido que esta tesis doctoral no habría llegado a donde lo ha hecho sin su apoyo y el de toda la familia.

A Catalina y Manuel, que seguro de alguna forma hoy hacen un guiño a este texto a su manera.

Gracias.

ACKNOWLEDGEMENTS.

A blank page is like a desert to me, and that leads to two things: an overwhelming and stimulating feeling simultaneously because of the creative possibilities of what something blank, new, virgin, and unexplored brings to you. Venturing into a PhD strikes me as a similar experience, something that makes you feel overwhelmed for all that it is but excited for the infinite possibilities it has.

The adventure begins in 2017 with the first time I went to Plasencia to touch base on the ideas and projects with Felix, my thesis supervisor. Back then an old acquaintance, but I like more thinking of him as a headhunter, because he has an outstanding ability to detect people's abilities and to anticipate the professional development that a person, a group of students or even, time has shown, an entire faculty, can carry out. I must thank him for making me come back to the academic world in a moment of self-discovery. I thank him for believing in the project, not only the thesis, but also my professional and a bit of my personal project too, since he knows me a bit, and he knows what I really like and what enlightens me. Thanks, Felix.

That day I met Leticia, who encouraged me to try to get one of the research contracts from Fundacion Valhondo, which I finally got, and I packed bags from UK to Spain to be a researcher. Thanks for that, but also for everything shared, the tapas, the TRX sessions and your advice.

Luckily, I was not only venturing into this just with Felix's guidance. To his side, Raquel Mayordomo, also my thesis supervisor. I thank her for her commitment to do everything she could so I could get my objective of becoming a doctor with the research project I believed in and was excited with. For believing in me and my possibilities, for allowing me to work at my own pace, and her efforts always saying yes to any idea and any experiment I proposed and that would have a cost (frequently even her patience). Thanks for everything, Raquel.

I cannot leave behind that, not without efforts, she leads a small and humble, but functional research lab, one that was the room for the best family of researchers I could live with in that space during my first few years of my PhD.

Firstly, Esther, because in her I found a mirror I could look myself in. For every day sharing bench, for being the person I needed to make the whole process more uplifting and easier with her advice. I will always hold to me moments like when we got the new cabinet in the lab, every morning commenting Game of Thrones and for teaching me “chewing-gum and flip-flops” techniques in the lab. Thank you. Secondly, Pablo González, because he arrived and brought the craziness into the lab. We needed him to balance righteousness, to make it more messy, chaotic, and liberating. You sparked the light in the lab, included me in your plans to make me believe again in this city that once gave me so much as an undergrad, and made of the lab a place a bit like home. I will remember moments like the petri dishes skyline, the Flask Virgin, the photo sessions wearing our coats and the pretended telephone calls. Thanks.

Talking about people that help you solve experimental issues, I must thank Dr. Benito-Sánchez for welcoming me once in her lab at the Cancer Research Center to help me with some doubts, a moment that I consider to be a pivotal moment after spending a long time with failed experiments.

With the project finally going places, it is easy to fall into the solitude of the PhD and forget about many others that are also exploring their own deserts. Luckily, I saw that those researchers were not alone, on the contrary, they gathered. And they created a motto “GET OUTTA THE CAVE”. And I realized that being a predoctoral researcher was much more when you surround yourself with the right people. And here I thank ADUEx for existing, for being a binding point.

ADUEx brought in an even more outstanding bunch of people. A silly joke I made to the next candidate to the presidency

of ADUEX, somehow made him think that I was someone to trust. And that he did when he proposed to me to be part of the Directive Board. Twice. I am thankful for having shared so much and learned so much from him. For finding in him a reference as a scientist, as a friend, and as an enthusiast of things out of the mainstream, free software, duck go, R and as a paddle amateur. Thank you, Javier Vaquero.

Someone else that day adopted me without permission nor apologies as her *gemelier*. To Sonia Mota I thank a lot in this inhabited desert. For the dramas, the telephonic podcasts, the hours in courses that increased our love for disinfectants, the advice when needed, and for all those times we would hang a call, and without her knowing I would think – *“Come on! I also wanna publish like Sonia does”*.

Alongside with these two, all the rest of *Los dramitas*. To all of you, thanks. You made the journey something magical, saved the quarantine with wine and videocalls, and for that and much more I will always be thankful. Specially to Guada, because we are research family. To Olga, because she is simply a referent. To Sergio and Selene, for your humour and your help with everything involving the STAB and my sequences. To Jimmy, because he is another referent, and in general to all of you.

There is one more person, that I leave apart here. Since, as in every desert, there will always be an oasis. I always knew that my PhD had to have an international stay. To Claudia, for being my mate during my stay on the other side of the Atlantic Ocean even though we were literally separated enough to be in different time zones in the same continent. Thanks for all of it and for your voice notes podcasts.

I take this chance to thank the University of Castilla-La Mancha, where I have my current job as a professor, for the opportunity and funding to make my research stay a reality. With this and after lots of paperwork and public health obstacles derived from a global pandemic, I set destination to Calgary,

Canada. Thanks to Dr. Guido van Marle for being interested since the very beginning in hosting a predoctoral researcher with a project in Human Papillomavirus in a moment when in his virology lab a vaccine for the SARS-Cov-2 was being studied. Thanks for the enthusiasm, for welcoming me, and having made me feel at home, for the ideas, the motivation and for the whole research team you have created in your lab, but most importantly, thanks for showing me the type of senior researcher I aspire to be like one day. Among other people that composed my Canadian family, I cannot elude Michelle Chen, we have forged something that I will keep saved forever in me, as a peculiar USB of my own, thanks for everything. Thanks also to Dan for teaching me so much, to Steph and Layla. To Rupali, Jane and Brayden. To everyone in the trainee's office, to Donna for her patience with bureaucracy. Thanks to every single one of you that had a part in making my stay the way it was. That really was a discovered treasure, an oasis in the desert, a promised land.

Most of my PhD exploration has also been in company of Pablo Cantero. And I am not talking about exploring as a literary device, but for real. For all the kilometers that we shared together travelling back and forth between Plasencia and going to work at FacSalud. For the travels, our fights over the playlist in the car, for being on the other side of the screen but also at 1.5m of safety distance walking up to *el Puerto* and for being a "home" person. Thank you.

To all my colleagues from the other university, especially Inés and Laura, who had so much patience with this coordinator of the degree that only tried to do his best despite sometimes not juggling very well all the work, and thanks to them and their work sometimes I could focus properly on my thesis.

Part of this thesis would have not been possible without the collaboration of other podiatrists to who I am very grateful for collaborating in the logistic part of obtaining samples from different parts of the country. I include G. Trejo, A. Reyes, E. Padilla, Dr. P Alfageme, A. Osorio, Dr. DJ Navas-Harrison, E.

Verjano, the SES Primary Care Center La Data and the Podiatry Clinic of the University of Extremadura, specially to María and Maite for always thinking of me with the patients' consultations.

These last few lines to thank my dear *Sálvame* family, that has always been there for absolutely everything and I want to keep sharing my life with you all. Thank you all, including the newly pediatric size addition of members.

Thanks to my *estampitas*, for taking me out during holidays and long weekends. The ones you choose.

And lastly, to my family, the ones you do not choose. I am grateful for the one I have. To all of you, thank you, especially my mother, from who I like thinking I acquired the interest in words over paper and for always wanting to learn. I am convinced that this doctoral thesis would have not come to completion without her support and the support of the whole family.

To Catalina and Manuel, who I am sure they somehow nod in approval to this text.

Thank you.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
1.1. La piel plantar.....	8
1.2. Virus del papiloma humano (VPH).....	10
Estructura viral.....	10
Estructura genómica.....	11
Clasificación y tipos de VPH.....	14
1.3. Etiopatogenia de la infección plantar por VPH.....	19
Infección y ciclo viral del virus.....	19
Latencia y evasión inmunitaria.....	22
La infección plantar.....	23
Factores de riesgo.....	25
Datos epidemiológicos de la infección plantar.....	27
1.4. Diagnóstico clínico de lesiones plantares por VPH.....	28
1.5. Diagnóstico diferencial.....	30
1.6. Manejo de las lesiones por virus del papiloma humano. ...	31
Métodos físicos.....	32
Métodos químicos.....	33
Métodos farmacológicos e inmunoterápicos.....	34
Resección quirúrgica.....	35
1.7. Justificación de la necesidad de implementar pruebas complementarias en el diagnóstico de lesiones plantares por VPH.	36
OBJETIVOS GENERALES.....	38
CAPÍTULO I.....	39
Revisión sistemática de las técnicas diagnósticas para infecciones por VPH y su implementación en lesiones plantares.....	39

RESUMEN	40
INTRODUCCIÓN	41
OBJETIVOS	43
MÉTODO	44
Criterios de inclusión.....	44
Datos de estudio	44
Fuentes de información	44
Estrategia de búsqueda	45
Proceso de selección.....	46
RESULTADOS	48
Manifestaciones clínicas diagnosticadas.	50
Métodos diagnósticos para las infecciones por VPH.	51
Métodos diagnósticos para las infecciones plantares.	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO II	57
<i>Evaluación del diagnóstico visual por parte de Podólogos de lesiones plantares producidas por VPH y la necesidad pruebas complementarias.</i>	57
RESUMEN	58
INTRODUCCIÓN	59
OBJETIVOS	61
MÉTODO	62
Diseño del cuestionario de evaluación del diagnóstico visual.	62
Sujetos de estudio y criterios de inclusión.	63
Análisis estadístico.	63
RESULTADOS	64
Consideración de la necesidad de pruebas complementarias.	64
Evaluación del diagnóstico visual.	65
Años de experiencia en el diagnóstico visual.	65
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	69
CAPÍTULO III	70

Implementación clínica de un método multiplex PCR para la detección de VPH en lesiones plantares y distribución de genotipos en diferentes áreas geográficas de España. 70

RESUMEN 71

INTRODUCCIÓN 72

Replicación del ADN y fundamentos de la PCR. 73

OBJETIVOS 77

MÉTODO 78

Consideraciones bioéticas. 78

Obtención de muestras. 78

Variables sociodemográficas. 79

Extracción de ADN. 80

Controles internos y construcción de plásmidos. 81

Método de detección de VPH mediante Multiplex PCR. 81

Secuenciación y genotipado. 83

Ensayos de validación de la técnica. 84

Análisis estadístico 86

RESULTADOS 88

Método de detección de VPH Multiplex-PCR y validación. 89

Distribución de genotipos. 91

DISCUSIÓN 93

CONCLUSIONES 99

CAPÍTULO IV 100

Desarrollo de una prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección y genotipado de VPH en lesiones plantares y su uso a partir de escamas de tejido lesional.

..... 100

RESUMEN 101

INTRODUCCIÓN 102

Fundamentos de la amplificación isotérmica mediada por bucle. 104

Resultados de la reacción de LAMP. 111

Bondades y limitaciones de la técnica LAMP. 113

OBJETIVOS 115

MÉTODO 116

Consideraciones bioéticas. 116

Muestra y criterios de inclusión. 116

Extracción de ADN. 117

Controles internos	117
Detección de ADN viral por multiplex PCR y secuenciación Sanger.	119
Ensayos de cuantificación de la carga viral.....	119
Ensayos LAMP con ADN purificado.	120
Experimentos de abordaje de uso clínico de LAMP.....	121
Ensayos LAMP con tejido de escamas de piel.	122
Ensayos de sensibilidad analítica.....	122
Análisis estadístico	123
RESULTADOS	124
Ensayos de la carga viral.	124
Grado de confianza o robustez del ensayo LAMP	124
Abordaje de uso clínico del ensayo LAMP.	125
Robustez del uso de tejido como diana en la LAMP.....	125
Límite de detección.	126
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES	132
GENERAL CONCLUSIONS	133
CONCLUSIONES GENERALES.....	135
REFERENCIAS	137
CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS.....	159
Scientific papers.....	159
Other contributions.	160
ANEXOS	161
ANEXO I – DOCUMENTO DE APROBACIÓN BIOÉTICA.....	162
ANEXO II – DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. .	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representación esquemática de la epidermis plantar. ..9	9
Figura 2 - Representación del ensamblaje de L1 y L2 y conformación de cápside viral.11	11
Figura 3 - Estructura organizativa del genoma del VPH.a12	12
Figura 4 - Esquema de nivel de homología y organización taxonómica del VPH.16	16
Figura 5 - Árbol filogenético de 88 tipos de VPH a partir de sus genes L1 de referencia.17	17
Figura 6 - Etiopatogenia de la infección, ciclo del virus y expresión proteica.21	21
Figura 7 - Presentaciones clínicas de lesiones plantares por VPH.24	24
Figura 8 - Signos clínicos de las lesiones plantares.28	28
Figura 9 - Curso clínico de tratamiento mediante quemadura con ácido nítrico.34	34
Figura 10 - Diagrama de flujo del proceso de selección de estudios.49	49
Figura 11 - Ítem 3 y 4 de evaluación diagnóstica visual de lesiones plantares.62	62
Figura 12 - Pruebas diagnósticas de elección por participantes con predisposición a su uso.64	64
Figura 13 - Representación esquemática simplificada de la PCR. 75	75
Figura 14 - Resultados de Multiplex PCR en gel y PCR gen de β Globina.....83	83

Figura 15 - Datos de lesiones plantares.	88
Figura 16 - Distribución geográfica de genotipos de VPH.	92
Figura 17 - Representación esquemática de alineamiento de primers en una LAMP.	106
Figura 18 - Generación de la estructura de inicio LAMP.	108
Figura 19 - Extensiones a partir de la estructura de inicio de bucles.	110
Figura 20 - Resultados positivos en gel de agarosa y detección directa visual por turbidez.....	111
Figura 21 - Hallazgos para resultados inconclusos e infección múltiple.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Características observables de la infección por diferentes tipos de VPH y riesgo de oncogenicidad. (9,19–22).....	18
Tabla 2 - Motivos de exclusión por revisión de abstract y textos completos.....	50
Tabla 3 - Manifestaciones clínicas que cursan con infección por VPH en los estudios incluidos.	51
Tabla 4 - Sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas utilizadas en lesiones producidas por VPH.	53
Tabla 5 - Eficacia y funcionamiento de las técnicas diagnósticas en lesiones producidas por VPH (sin parámetros específicos).	54
Tabla 6 - Comparativa y grado de acuerdo entre técnicas diagnósticas para infecciones por VPH.....	55
Tabla 7 - Técnicas diagnósticas para las lesiones plantares por VPH.....	52
Tabla 8 - Evaluación del diagnóstico visual de lesiones plantares por VPH (diagnósticos correctos e incorrectos).	65
Tabla 9 - Años de experiencia y frecuencia de error diagnóstico de lesiones plantares.	66
Tabla 10 - Hábitos de riesgo, tratamientos previos y localización de las lesiones.	89
Tabla 11 - Análisis probit y C95 para límite de detección para HPV-1.	90

Tabla 12 - Análisis probit y C95 para límite de detección para HPV- 27.	90
Tabla 13 - Intra e inter-reproducibilidad y nivel de acuerdo.	91
Tabla 14 - Frecuencias de genotipos de VPH.	91
Tabla 15 - Relación de genotipos de referencia para el diseño de plásmidos de control.	118
Tabla 16 - Medias de número de copias virales para cada genotipo.	124
Tabla 17 - Nivel de acuerdo entre LAMP y PCR+Secuenciación.	124

RESUMEN.

El virus del papiloma humano (VPH) causa infección en piel y mucosas con diferentes entidades clínicas que pasan por lesiones de progresión neoplásica, hasta por tumores benignos de piel cutánea, como el caso de las lesiones plantares, que cursan, entre otros signos y síntomas, con dolor e impotencia funcional. El diagnóstico de estas lesiones plantares, es empíricamente visual, sin embargo, cabe la posibilidad de que existan dificultades en el diagnóstico y que las pruebas complementarias disponibles para establecer diagnósticos diferenciales sean escasas o no estén ampliamente implementadas. Es en este contexto que surge la justificación de esta tesis doctoral, que tiene por objetivo realizar un estudio en profundidad de las posibilidades diagnósticas para las lesiones plantares por VPH y explora las técnicas de detección de ADN viral mediante PCR multiplex convencional, así como la optimización y mejora con técnicas moleculares de amplificación isotérmica mediada por bucle para adaptar los métodos diagnósticos a la casuística particular de la práctica de la podología en España.

Con base a estos objetivos, y los resultados obtenidos, se demuestra que el diagnóstico visual puede llevar a un porcentaje alto de errores diagnósticos y que la literatura apoya la investigación en técnicas moleculares, por lo que la implementación del método multiplex permitió esclarecer este hecho, al tiempo que nos da a conocer la realidad de distribución de genotipos del virus, siendo HPV-1 seguido de HPV-27, -2 y -57 los más comunes, con distribución geográfica asimétrica. Estos datos permitieron un mejor ajuste de la técnica de amplificación isotérmica que exitosamente mostró una sensibilidad y rendimiento analítico óptimo para convertirse en candidata para su uso como prueba complementaria al diagnóstico de estas infecciones en el pie.

En conclusión, el diagnóstico complementario de lesiones plantares se ha evidenciado como necesario y los métodos de

detección molecular han mostrado ser robustos y sensibles, siendo la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) estudiada prometedora en el diagnóstico de estas lesiones en podología, dado que reduce el tiempo y los costes asociado a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Palabras clave: VPH, verruga plantar, multiplex PCR, LAMP, pie.

SUMMARY.

Human papillomavirus (HPV) causes infection of the skin and mucous membranes with different clinical entities that include lesions of neoplastic progression, and benign skin tumors, such as plantar lesions, which present clinically, among other signs and symptoms, with pain and functional impotence. The diagnosis of these plantar lesions is empirically visual; however, possibly, there are difficulties in the diagnosis and complementary tests available to establish differential diagnoses are scarce or not widely implemented. It is in this context that the justification for this doctoral thesis arises, which aims to carry out an in-depth study of the diagnostic possibilities for HPV plantar lesions and explores viral DNA detection techniques using conventional multiplex PCR, as well as seeks optimization and improvement with loop-mediated isothermal amplification molecular techniques to adapt these diagnostic methods to the reality of podiatric practice in Spain.

Based on these objectives, the results obtained show that visual diagnosis can lead to a high percentage of misdiagnosis and that the literature supports research in molecular techniques, so the implementation of the multiplex method allowed to clarify this fact, while, at the same time, revealed the reality of the distribution of HPV genotypes, being HPV-1 followed by HPV-27, -2 and -57 the most common types, with an asymmetric geographical distribution. These results allowed a better adjustment of the isothermal amplification technique that successfully showed optimal sensitivity and analytical performance to become a candidate to be used as a complementary test for the diagnosis of these foot infections.

In conclusion, the complementary diagnosis of plantar lesions has proven to be necessary and the molecular detection methods have shown to be robust and sensitive, with the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method being promising in the diagnosis of these lesions in podiatry, given that

reduces the time and costs associated with nucleic acid amplification techniques.

Keywords: HPV, plantar warts, multiplex PCR, LAMP, foot.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

BP: Del inglés, Bowenoid Papulosis; Papulosis Bowenoide.

Bst: Referente al organismo *Geobacillus stearothermophilus*.

CA: Del inglés, Condyloma acuminata; Condiloma acuminado.

CIALFB: Del inglés, CRISPR/Cas-Isothermal Amplification Based Lateral Flow Biosensor; Biosensor de flujo lateral basado en amplificación CRISPR/Cas-isotérmica.

CIN2+: Del inglés, Cervical Intraepithelial Neoplasia (grade 2+), Neoplasia Cervical Intraepitelial de grado 2+.

CMH-I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad I, también en inglés Major Histocompatibility Complex I (MHC-I)

COVID-19: Del inglés, Coronavirus Disease 2019; Enfermedad por coronavirus 2019.

CR: Del inglés, Concordance Rate; Grado de acuerdo/concordancia.

CRISPR/Cas: Del inglés, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas. Cas: Enzima endonucleasa asociada a CRISPR.

ddH₂O: Del inglés, double distilled H₂O; Agua doble destilada, o ultrapura.

DNA Pol III: Del inglés, DNA polymerase III (enzyme); (enzima) ADN polimerasa III.

DNA: Del inglés, Deoxyribonucleic Acid; *Ver* ADN.

E. coli DH5 α : *Escherichia Coli* DH5 α .

E1-7: Del inglés, early gene/protein 1-7; genes o proteínas de expresión temprana 1-7.

EGF: Del inglés, Epidermal Growth Factor; Factor de crecimiento epidérmico.

EPIs: Equipos de Protección Individual.

EV: Del inglés, Epidermodysplasia Verruciformis; Epidermodisplasia verruciforme.

F3/B3: Del inglés, Forward/Backward outer primer; *Primer* o cebador exterior a favor del sentido/inverso.

FEH: Del inglés, Focal Epithelial Hyperplasia; Hiperplasia epitelial focal.

FFPE: Del inglés, Formalin-Fixed Paraffin Embedded; (Tejido) Fijado en formol incluido en parafina.

FIP/BIP: Del inglés, Forward/Backward inner primer; *Primer* o cebador interior a favor del sentido/inverso.

HC2: Hybrid Capture 2.

HNSCC: Del inglés, Head And Neck Squamous Cell Carcinoma: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

HPV types: Del inglés, Human Papillomavirus types; Tipo de Virus de Papiloma Humano. Ejemplo; HPV-1 (Type 1; Tipo 1)

HSIL: Del inglés, High Grade Squamous Intraepithelial Lesion; Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado.

HSPGs: Del inglés, Heparan Sulphate Proteoglycans; Proteoglicanos heparan sulfato.

ICTV: Del inglés, International Committee on Taxonomy of Viruses; Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

IHC: Del inglés, immunohistochemistry; inmunohistoquímica.

IP: Del inglés, Inverted Papilloma; Papiloma invertido.

L1: Del inglés, Late gene/protein 1; gen/proteína de expresión tardía 1.

L2: Del inglés, Late gene/protein 2; gen/proteína de expresión tardía 2.

LAMP: Del inglés, Loop-mediated isothermal Amplification; Amplificación isotérmica mediada por bucle.

LB: Del inglés, Lysogeny Broth; Medio o caldo Lisogenia.

LCR: Del inglés, Long Control Region; región larga de control.

LCs: Del inglés, Langerhans Cells; Células de Langerhans.

LF/LB: Del inglés, Loop forward/backward primer; Primer o cebador bucle a favor del sentido/inverso.

LOD: Límite de detección, también del inglés Limit of detection.

MC: Molusco contagioso.

MERS-CoV: Del inglés, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio.

MH: Del inglés, metatarsal head; Cabeza metatarsal.

mRNA: Del inglés, Messenger Ribonucleic Acid; Ácido ribonucleico mensajero.

N/A: Del inglés, not applicable; No aplica.

NMSC: Del inglés, Non-melanoma Skin Cancer; Cáncer de piel no melanoma.

OPMD: Del inglés, Oral Potentially Malignant Disorders; Alteraciones orales potencialmente malignas.

OPSCC: Del inglés, Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma; Carcinoma orofaríngeo de células escamosas.

ORF: Del inglés, Open Reading Frame; Marco Abierto de Lectura.

p53: Proteína tumoral p53, codificada por el gen TP53.

PaVE: Del inglés, Papillomavirus Episteme (Base de datos).

pb: pares de bases.

PCR: Del inglés, Polymerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa.

pRb: Proteína del Retinoblastoma.

PW: Del inglés, Plantar wart; Verruga plantar.

qPCR: Del inglés, quantitative PCR; PCR cuantitativa.

RRP: Del inglés, Recurrent Respiratory Papillomatosis; Papilomatosis Respiratoria Recurrente.

RT-LAMP: Del inglés, Reverse Transcription LAMP; LAMP de Transcripción Inversa.

RT-PCR: Del inglés, Reverse Transcription PCR; PCR de transcripción inversa.

SARS-CoV-2: Del inglés, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2; Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

SCC: Del inglés, Squamous Cell Carcinoma; Carcinoma de células escamosas de la piel.

Taq: referente al organismo *Thermophilus aquaticus*.

T_m: Temperatura de melting.

UV: Ultravioleta.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humano.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

VV; Del latín, Verrucae vulgaris; Verruga vulgar.

WOS: Web of Science.

INTRODUCCIÓN GENERAL.

1.1. La piel plantar.

La piel es uno de los órganos más importantes en el mantenimiento de funciones del resto de sistemas del cuerpo. Está compuesta de dos capas principalmente, la epidermis y la dermis, que a su vez se subdividen en diferentes estratos con características y funciones propias.

La epidermis es la capa más superficial, encargada de proteger y de mantener la hidratación óptima. Estas funciones están desempeñadas por los tres distintos tipos de células que componen la epidermis: Queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans. El tipo celular más predominante es el queratinocito, que representa hasta un 90%, en algunos casos, de la totalidad de células que conforman la epidermis (1), seguido de los melanocitos que tienen por función segregar el pigmento llamado melanina en forma de melanosomas, integrados por los queratinocitos adyacentes, y que protegen sus núcleos celulares del daño producido por las radiaciones UV. Por su parte, el tercer tipo celular presente en la epidermis son las células de Langerhans, que funcionan como células presentadoras de antígenos, cumpliendo así una importante función inmunológica en los estratos superficiales de la piel (2). Otro tipo de células menos numerosas también presentes en la epidermis son las células de Merkel con funciones sensitivas (1,2).

Estas células se disponen de forma heterogénea en todo el espesor de la epidermis, dividiéndola así en diferentes estratos. El estrato basal, el más profundo, estrechamente relacionado con la dermis, está conformado por células indiferenciadas, donde tienen lugar las mitosis celulares que forman los queratinocitos que migran hacia la capa más superficial, sufriendo cambios que caracterizan los diferentes estratos. Le siguen el estrato espinoso y el granuloso, donde encontramos gránulos intracelulares de queratohialina, que acabará por ocupar el interior celular completamente cuando se convierta en queratina. En el caso de la

piel de la planta del pie, encontramos por encima de la capa anterior, el estrato lúcido, sólo presente, además del pie, en palmas de las manos, lo que aumenta el grosor de la epidermis en estas zonas, y se caracteriza por una serie de capas de queratinocitos muertos, translúcidos, con grandes cantidades de queratina que precede al estrato más superficial de la epidermis, el estrato córneo, y que tiene la función de dar mayor resistencia a la piel plantar (3).

Por último, ya hemos mencionado el estrato más superficial de la epidermis, el estrato córneo. En esta capa los queratinocitos han sufrido todo el proceso de diferenciación y queratinización, perdiendo sus núcleos celulares, superpuestos en capas y formando uniones celulares fuertes. Este estrato confiere a la piel protección mecánica y hace de barrera biológica contra microorganismos. Las células más superficiales se descaman continuamente, siendo reemplazadas por otras desde estratos profundos. A los procesos patológicos que interfieren en este mecanismo se les denominan queratopatías o patologías de la queratinización (3). La [figura 1](#) muestra un esquema de los diferentes estratos explicados.

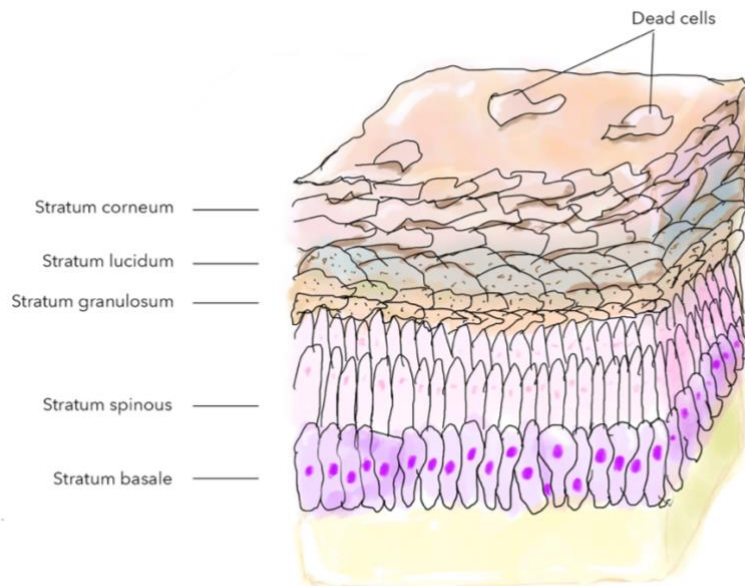


Figura 1 - Representación esquemática de la epidermis plantar.

Este proceso de queratinización se ve afectado por diferentes agentes. El factor de crecimiento epidérmico (EGF), traumatismos, infecciones dermatológicas, enfermedades autoinmunes, mutaciones genéticas o efectos adversos de algunos medicamentos, interfieren en este proceso de división, queratinización y descamación de los queratinocitos (3,4).

Bajo la epidermis, la piel, se continúa con su otra capa más profunda, la dermis. Ambas están separadas por la unión dermo-epidérmica. En la dermis, la estructura de la piel cambia: se encuentran fibroblastos como célula principal, productora de fibras de colágeno, elastina y otras proteínas, que se acumulan en la matriz extracelular y confieren a la piel de elasticidad y adaptabilidad. En esta capa, además, se encuentran plexos vasculares que nutren a todos los componentes, y, por difusión, nutren al estrato basal de la epidermis, ya que éste carece de vasos sanguíneos.

1.2. Virus del papiloma humano (VPH).

El virus del papiloma humano (VPH) es un ADN-virus de la familia *Papillomaviridae*, sin envoltura lipídica de aproximadamente 55nm de diámetro. Su estructura exterior consta de una cápside icosaédrica, formada por las proteínas de expresión tardía L1 y L2 proteína mayor y menor de la cápside respectivamente, que protege el ADN circular de doble cadena que lo conforman aproximadamente 8000 pares de bases (5,6). Este ADN se encuentra agregado a histonas dentro de la cápside viral.

Estructura viral

Las proteínas L1 y L2 conforman la estructura de la cápside viral. L1 representa el componente mayoritario de la cápside, y hasta un 80% de las proteínas viral, y L2 es el menor constituyente. La estructura de la cápside es de 60 pentámeros hexavalentes y 12 pentámeros pentavalentes, formando un total de 72 pentámeros de L1, sobre los que cada uno de los cuales se asocia un monómero de L2 (7,8), de esta forma, el icosaedro de la cápside adquiere una

forma casi esférica. La [figura 2](#) muestra una representación del ensamblaje de las proteínas L1 y L2 para la conformación de la cápside viral.

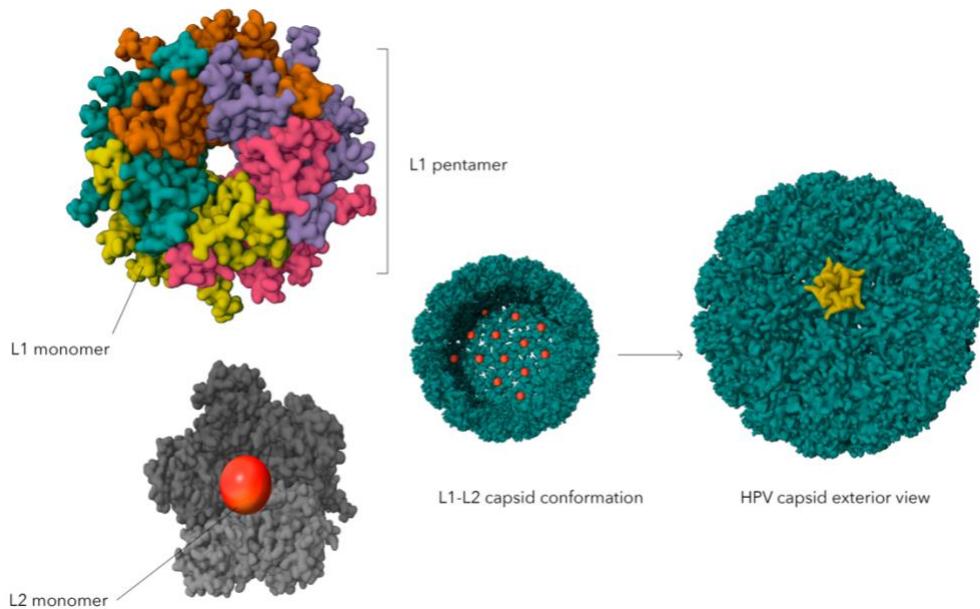


Figura 2 - Representación del ensamblaje de L1 y L2 y conformación de cápside viral ^a.

^a Para la construcción se utilizaron modelos estructurales de proteínas accedidas en banco proteico RCSB PDB (Protein Data Bank) con IDs 2R5K (9) y 5KEP (10) para el pentámero de la proteína L1 del HPV-11 y para la estructura de cápside del HPV-16 respectivamente, editando sus estructuras en 3D mediante la herramienta Mol* 3D viewer. La estructura del monómero L2 es una representación esquemática.

Estructura genómica

En el interior de la cápside viral, el ADN se organiza de forma similar a lo largo de su heterogeneidad de tipos de VPH. Los aproximadamente 8000 pares de bases se estructuran en 3 regiones codificantes principales que contienen los 8 genes que codifican las diferentes proteínas y procesos de su ciclo viral. Por una parte, la early region (E), o región temprana, que codifica genes implicados en diferentes procesos del ciclo de vida del virus y contiene los genes E1, E2 y E4-E7. Por otra parte, la región tardía o

late región (L) que contiene los genes codificantes de las proteínas estructurales L1 y L2. En tercer lugar, el genoma contiene una región reguladora denominada LCR (Long Control Region) (5-7,11). La [figura 3](#) representa la organización de genes del virus.

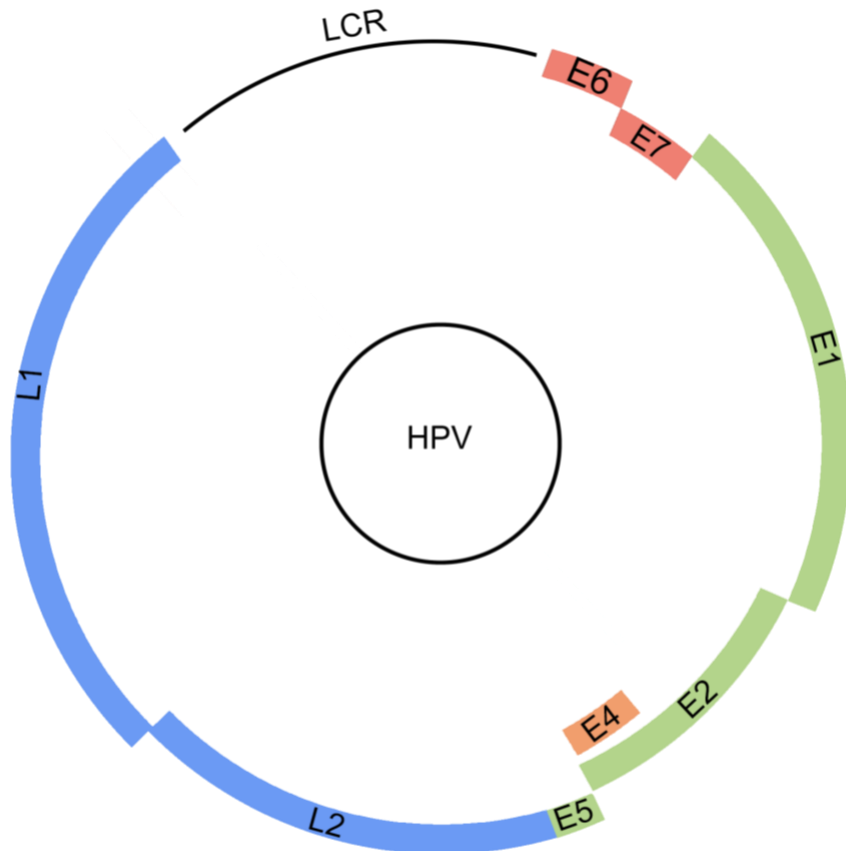


Figura 3 - Estructura organizativa del genoma del VPH.^a

^a Basada en organización genómica de especies de alphapapillomavirus.

Además de la función estructural, que cumplen las proteínas codificadas por L1 y L2, se le ha atribuido a L2 la actividad implicada en la unión de los viriones a los receptores de la célula hospedadora, así como en el transporte hacia el interior

del núcleo celular y el empaquetado del ADN vírico en las cápsides (7) .

Los genes incluidos en la early región (E) codifican proteínas implicadas en diferentes procesos del ciclo del virus.

- E1: Codifica la proteína que interviene principalmente en la replicación del virus en conjunto con E2 y en procesos de control para los genes E6 y E7 (5,7).
- E2: Codifica la proteína reguladora del proceso de replicación y transcripción, regulando de forma inversamente proporcional los niveles de las oncoproteínas E6 y E7 (6,7).
- E4: Superpuesto a nivel de E2 dentro del genoma, transcrito en otro marco de lectura. Se le atribuye función en momentos de replicación celular (5-7). Contribuye a la amplificación en estadíos de infección más tardíos al inicial y con su mayor expresión en momentos que sugieren implicación en la transmisión del virus aunque sus funciones requieren estudios en profundidad (12).
- E5: Este gen codifica para una oncoproteína altamente hidrofóbica que no cuenta con marcos abiertos de lectura en todos los tipos de HPV (7). En general tiene función en procesos de transformación proteica e interacciona con receptores de EGF, que interviene en procesos de proliferación y angiogénesis entre otros. De esta forma, E5 intercede en postergar la diferenciación celular, manteniendo así la hiperproliferación de queratinocitos y, en general, contribuir a mantener un ambiente prolífico para el ciclo de vida del virus (7,13).
- E6: Su función más destacada es la capacidad de unirse al supresor tumoral celular p53, que en infecciones por tipos de alto riesgo, produce degradación de p53 resultando en una inhibición de la diferenciación, un arresto del

crecimiento y activación de telomerasa, que se traduce en una proliferación celular descontrolada (7,12,14).

- E7: Se trata del tercer oncogén que completa la región temprana. Codifica su proteína homónima, E7, que inhibe la actividad de la proteína del retinoblastoma (pRb), que es una proteína supresora tumoral, lo que obliga a entrar en ciclo de replicación a la célula de forma anómala. Así mismo E7 parece también tener mecanismos de desregulación de p53 (14,15).

E6 y E7 son los dos oncogenes más mencionados en la literatura en el estudio de la oncogenicidad del virus, sin embargo, aunque presente en todos los tipos de VPH, en los tipos de bajo riesgo de oncogenicidad, según lo sugerido por la literatura, ambas proteínas tienen una unión débil o directamente no degradan p53 y pRb, tampoco se activa la telomerasa ni llevan a cabo procesos de transformación o inmortalización celular (12,16).

Clasificación y tipos de VPH

A nivel estructural y a nivel organizativo de su genoma, el VPH tiene cierta homogeneidad, sin embargo, en su estudio en profundidad, existen diferencias significativas que permiten la diferenciación dentro de la familia que compone, *Papillomaviridae*, en diferentes tipos.

Se establece una clasificación de los tipos de VPH en función del grado de similitud o diferencia en el gen L1, que es el gen más conservado dentro del genoma, por esta razón se toma de referencia. Esta particularidad puede derivar del hecho de que se trata de un virus de evolución lenta, es decir, que su frecuencia de mutaciones significativas es menor a la de otros virus, y que, virtualmente, no se recombina (17–19). Para identificar un nuevo tipo de VPH es necesario clonar el gen L1 y que exista más de un 10% de diferencia en su marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) con respecto a su homólogo más cercano. Si existe

una diferencia entre el 2% y el 10% se hablaría de un subtipo, y si es menor del 2%, de una variante (11).

De esta forma, además, y atendiendo a características biológicas, los tipos de VPH (HPV types), se pueden clasificar, taxonómicamente en *Genus*, *Species*, *Types (subtypes and variants)*.

Genus es el término utilizado para englobar a los tipos de VPH cuya secuencia L1 ORF tiene un nivel de similitud entre el 43%-60% y comparten otra serie de características, como por ejemplo el tropismo por la piel o las mucosas, aunque con excepciones. Los *genus* utilizan denominaciones griegas para agrupar los distintos papilomavirus (Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, y otros).

Dentro de un *genus* existe un nivel de organización inferior entre tipos de VPH que comparten una similitud de nucleótidos entre el 60%-70%. A este orden menor se le denomina *species*.

Los tipos (HPV types) dentro del orden anterior, comparten una secuencia de nucleótidos similar entorno al 70%-89%.

La [figura 4](#) muestra una representación esquemática del grado de similitud en el gen L1 y la pertenencia a órdenes más cercanos dentro de la organización taxonómica.

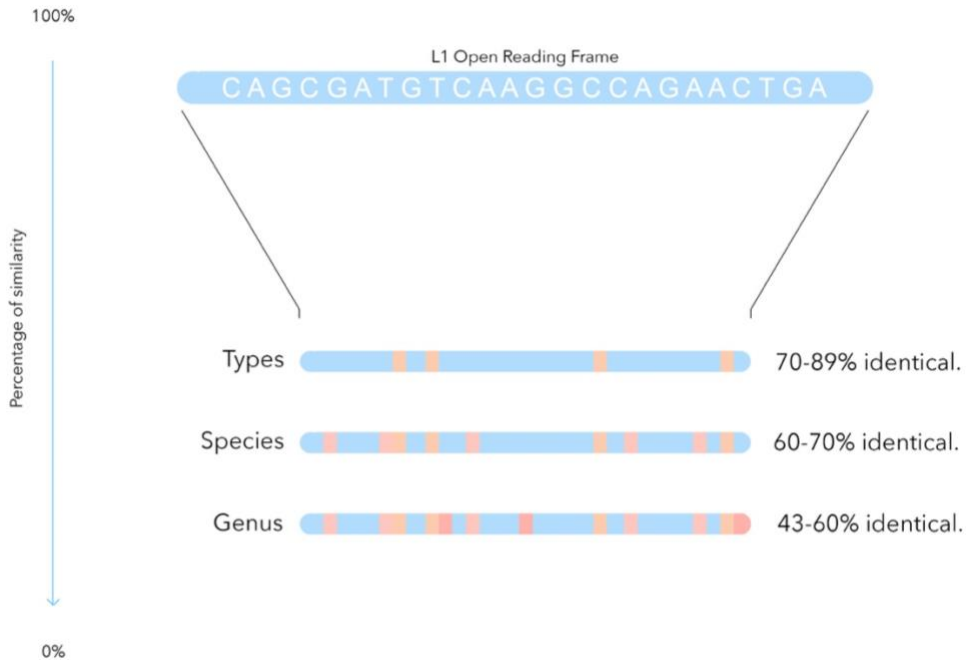


Figura 4 - Esquema de nivel de homología y organización taxonómica del VPH.

Por su parte, la [figura 5](#) se trata de una construcción de un árbol filogenético basado en el gen L1 de 88 tipos de VPH. En ella se representan los *genus* Alpha, Beta, Gamma, Mu y Nupapillomavirus, con código de color para cada especie dentro de ese *genus*, que aglutina cada uno de los tipos de VPH.

La taxonomía del virus permite organizarlo e identificarlo de manera sistemática y, así mismo, permite un consenso para el hallazgo de nuevos tipos, subtipos y variantes, así como su nomenclatura, todo ello propuesto por el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), Papillomavirus Study Group.

Además de su similitud a nivel genético, los diferentes *genus*, también comparten ciertas características distintivas, entre otras, el tropismo por un tejido o especie animal determinada, o diferencias organizativas de los ORFs dentro del genoma. Ejemplo de ello es el Mupapillomavirus que causa lesiones cutáneas y

aparecen cuerpos intracitoplasmáticos, mientras que el Alphapapillomavirus se encuentra tanto en piel como mucosa e incluye tipos de alto riesgo de oncogenicidad. La [tabla 1](#) muestra algunas de estas características en los diferentes niveles organizativos taxonómicos.



Figura 5 - Árbol filogenético^b de 88 tipos de VPH a partir de sus genes L1 de referencia.

^b Para la construcción se utilizaron los genes L1 de referencia, accedidos a través de la base de datos PaVE (Papillomavirus Episteme PaVE, <http://pave.niaid.nih.gov>) (17) y fueron procesados para alineamiento múltiple y construcción del árbol filogenético utilizando el software bioinformático MEGA11 (20).

Por otra parte, aunque la literatura distingue cierta preferencia o tropismo por mucosa o piel cutánea, no se puede establecer una clasificación rígida con respecto a esta característica. No obstante, a nivel clínico, es ampliamente utilizada la clasificación de los VPH en las categorías de *High Risk* (HR), o alto riesgo, y de *Low Risk* (LR), o de bajo riesgo, siguiendo la evidencia sólida que existe con respecto a la oncogenicidad de unos tipos u otros (11). La [tabla 1](#), en conjunto con las características descritas para los diferentes *genus* distingue alguno de estos tipos clasificándolos en HR o LR.

Genus	Species	Tropism	Carcinogenic risk
Alpha	1-15	Mucosal and Cutaneous	Different between species, e.g., Species 9 (HPV-16, 31 and 35) are oncogenic and mucosal, and species 4 are non-oncogenic and mainly cutaneous.
Beta	1-5	Cutaneous	Exists evidence of producing NMSC ^c , EV and other infections that can evolve to malignancies, especially in persistent infections and/or immunocompromised individuals.
Gamma	1-5	Cutaneous lesions.	Mostly benign. Rarely found in cancers.
Mu	1 2	Found in cutaneous lesions, palm, and plantar skin.	Not found in cancers.
Nu	1	Cutaneous lesions	Normally benign lesions, but malignant lesions are described.

Tabla 1 - Características observables de la infección por diferentes tipos de VPH y riesgo de oncogenicidad. (11,21-24)

^c NMSC: Non-melanoma skin cancer; EV: Epidermodysplasia Verruciformis.

1.3. Etiopatogenia de la infección plantar por VPH.

Las características intrínsecas a cada tipo de VPH hacen que tenga tropismo por diferentes zonas o incluso especies. Los tipos anteriormente comentados afectan a humanos, con diferentes grados de oncogenicidad y preferencias por sitios de infección. A nivel del recubrimiento de mucosas, encontramos manifestaciones clínicas en forma de tumores de la mucosa anogenital, orofaríngea y en mucosas de las vías respiratorias en forma de papilomatosis pulmonar o laríngea (7). De entre los tipos que afectan a la piel cutánea, se han descrito infecciones en la piel de la cara, las manos, los pies, afectando a los ojos en manifestaciones clínicas de pterigión oftálmico (25), en tumores benignos del canal auditivo (26), verrugas genitales, e incluso en virtualmente cualquier zona corporal, como en los casos de Epidermodisplasia Verruciforme (EV), pero también se ha detectado VPH en piel sana de folículos pilosos en cejas (27).

En cualquier caso, el virus, causante de estas manifestaciones muestra una patogenicidad y ciclo de vida del virus similar entre los tipos de VPH, aunque con ciertas diferencias, entre otras, marcadas por el sitio de infección.

Infeción y ciclo viral del virus.

Está ampliamente aceptado que el VPH requiere una vía de entrada al sitio de infección a través de lesiones microscópicas en la piel y así acceder al estrato basal. De hecho, se sugiere que el hecho de que su forma de entrada sea a través de estas lesiones epidérmicas, puede conferirle ventaja en los estadios iniciales de la infección, ya que el proceso de regeneración de esa lesión a nivel celular en el huésped requiere de división celular activa que probablemente ayuda a que el genoma del virus penetre al núcleo (22).

Este primer contacto con el virus se da de forma directa persona-persona o también puede darse por contacto directo a través de fómites, dado que, como es explicado más adelante, el

ciclo natural del virus es liberarse hacia el exterior para infectar nuevas células/huéspedes. Existe, además, evidencia de que el virus tiene capacidad de sobrevivir en estas superficies durante largos periodos de tiempo (28) y resiste con solvencia la acción de desinfectantes habituales como el etanol, isopropanol, glutaraldehído y fenol, con la excepción del hipoclorito de sodio que a concentración adecuada, sí consigue una reducción del 99.9% de infectividad (29), por lo que todo ello contribuye al éxito de supervivencia del virus para conseguir nuevos contactos y potenciales vías de entrada.

Cuando las partículas virales alcanzan el estrato basal, deben interactuar con receptores de superficie, como HSPGs (Heparan Sulphate Proteoglycans) para incluirse dentro de la célula. Para ello, los modelos estudiados proponen que L2 tiene un papel importante (7,22), pero en general todo el complejo L1-L2 de la cápside debe pasar por transformaciones e interacciones con otros receptores para cumplir el objetivo de entrada a la célula (30).

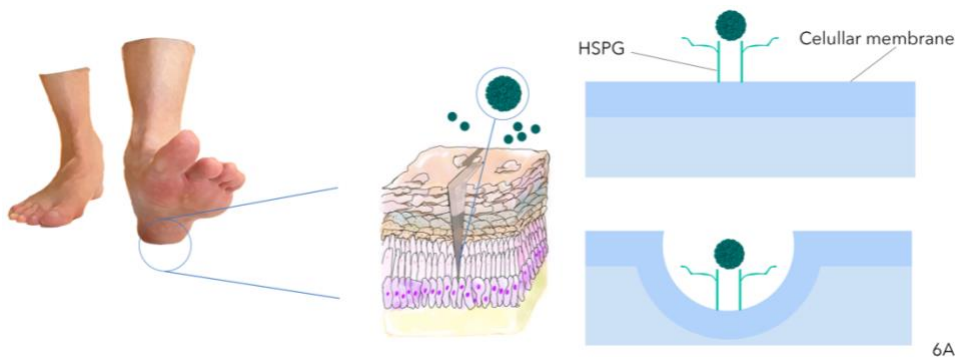
Una vez dentro de la célula, la degradación de la cápside y el tráfico del complejo que transporta el ADN viral son los procesos siguientes que aseguran el acceso al núcleo, donde continuará con su ciclo habitualmente de forma episomal con bajo número de copias, entorno a las 100 copias/célula, probablemente como mecanismo para evadir el sistema inmunitario del huésped. Aquí entra en juego la replicación para mantener el número de copias estable y además E1 y E2 tienen un importante papel en ello.

Después de las replications iniciales, las células del estrato basal infectadas comienzan a avanzar hacia la superficie de la epidermis en su proceso de diferenciación. En este punto entran en juego otras proteínas virales más tardías, como E5, E6 y E7, implicadas en procesos que mantienen la división celular de la célula infectada, para que así se siga replicando el ADN viral, aunque el resultado de su expresión varía en función del tipo de VPH, especialmente entre tipos HR y LR. Está descrito que E6 y E7 en tipos LR tienen funciones o uniones más débiles a sus dianas,

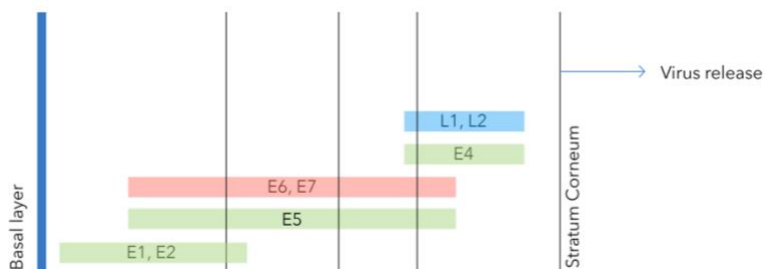
sin embargo, se requieren estudios más profundos de su función en estos tipos de VPH.

La progresión de queratinocitos infectados hacia estratos superiores va acompañada del comienzo de la expresión de las proteínas tardías L1 y L2 que conformarán la cápside de nuevas partículas víricas, en el momento en el que el ADN se empaquete en ellas, y salgan hacia el exterior con el proceso natural de descamación de los queratinocitos. En este proceso de liberación, se piensa que E4 puede tener función clave, dado que en estos momentos es cuando se ha observado mayor nivel de expresión de esta proteína (12,22).

La **figura 6** muestra de forma esquemática el ciclo del virus tras su entrada en el sitio de infección y las proteínas implicadas en cada momento clave de dicho ciclo.



6A



6B

Figura 6 - Etiopatogenia de la infección, ciclo del virus y expresión proteica.

HSPG: Heparan sulphate proteoglycan; E1-E6: Early proteins E1-E6. L1-L2: Late proteins. 6a: Shows the natural infection on a micro abrasion on the skin and cellular inclusion. 6b: Shows protein expressions as the infected cells travel to superficial layers.

Latencia y evasión inmunitaria

El ciclo del VPH se caracteriza por ocurrir de forma local en el tejido epitelial infectado. La piel, especialmente su capa más superficial, la epidermis, donde sucede la infección, no tiene vasos sanguíneos ni tampoco muestra una respuesta inmune tan eficaz como cabría esperar con infecciones que cursan con viremia. Además, su curso natural, no implica lisis celular, ni respuesta inflamatoria derivada de ello, sino que aprovecha la vida fisiológica del queratinocito, destinado a alcanzar la superficie de la piel donde se descama de forma fisiológica. Esto de por sí supone una ventaja al virus, porque su ciclo se desarrolla en un entorno que se presta a la evasión del sistema inmunitario del huésped, pero además se le suman las herramientas con las que cuenta el virus para esta tarea.

Entre otras, desregulación del sistema inmunitario del huésped, por la acción de las proteínas E5-E7, que intervienen en impedir que se recluten células presentadoras de antígenos de la epidermis, disminuyendo además la cantidad de antígenos que estas pocas células incluyen y disminuyendo la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH-I/ MHC-I) en las células infectadas por el VPH (31).

Esta evasión del sistema inmunitario y el hecho de que la replicación del virus a mayor escala sucede ya en las células diferenciadas, donde pasa desapercibido, hace que el virus pueda mantenerse “latente” de alguna forma, en la que durante un tiempo prolongado se mantiene simplemente con copias bajas en las células cercanas al estrato basal, y que puede entrar en una forma productiva, en la que aumenta su replicación y la conformación de nuevas partículas virales, de forma oportunista cuando el sistema inmunitario del huésped se debilita temporalmente o con una reinfección que activa esta forma productiva nuevamente. De esta manera, la sintomatología o las manifestaciones clínicas pueden darse meses después de la infección, y, además, puede explicar las formas reiteradas en las

que las lesiones reaparecen en el mismo sitio después de su resolución mediante el manejo clínico de elección.

La infección plantar

La etiopatogenia previamente descrita hace referencia a lo que se sabe de forma general del virus, con especial énfasis en los Alpha types de alto riesgo, como HPV-16 y HPV-18, y teniendo el HPV-6 y HPV11 como los tipos de bajo riesgo estudiados principalmente en los modelos (7).

A nivel plantar, la infección está descrita por tipos del género Alpha, Gamma y Mu principalmente, siendo el HPV-1 uno de los más abundantes (5,28), pero están descritos HPV-2, -27, -57, -65, -69 entre otros. En algunas ocasiones, tipos que afectan a mucosa pueden causar infecciones plantares, especialmente en casos de inmunosupresión, así como tipos que habitualmente afectan de forma benigna, pueden avanzar hacia malignidad en determinadas circunstancias, como en casos de EV por HPV-5 o HPV-8 (32) que quedan descritos con evidencia limitada.

Una de las características inherentes de la infección a nivel plantar es que la epidermis cuenta con un estrato más, el estrato lúcido (1), que puede tener un papel importante tanto en la patogenia como en el manejo de las lesiones a nivel clínico, dado que el grosor puede prestarse a un mayor proceso de hiperqueratinización, de ahí el aspecto verrucoso habitual, pero también aleja el estrato basal de la superficie a tratar.

Así mismo, de forma generalizada, las lesiones plantares suelen encontrarse en zonas consideradas de mayor presión en el pie (28). Probablemente esto se deba a que las zonas de mayor presión suelen también coincidir con los puntos de apoyo, que en condiciones biomecánicas compatibles con la normalidad son en el talón y cabezas metatarsales, especialmente la primera (33), así como que esos puntos de mayor presión predispongan de forma fácil a microlesiones en la epidermis que supla al virus de la vía de entrada que necesita para acceder al estrato basal (28).

Estas zonas de presión en las que aparecen las lesiones las obliga a que tengan un crecimiento hacia capas profundas, en lugar de hacia afuera, lo que a menudo le atribuye el nombre de verruga endofítica (5). Esto contribuye a empeorar los síntomas de dolor e incapacidad funcional para la marcha (5).

La literatura describe ciertos rasgos morfológicos de las lesiones y el genotipo de VPH que afecta a la lesión, sin embargo los resultados no parecen tener un gran valor predictivo, más allá de las diferencias encontradas entre las resistencias al tratamiento entre las verrugas causadas por los géneros Alpha en comparación con Mu (34). De forma general, el aspecto al que atienden las lesiones plantares suele darse en forma de pápula ligeramente elevada o aplanada, con tonos que varían entre el enrojecido, amarillento o pardo, a menudo con aparición de capilares trombosados en forma de puntos en la extensión de la lesión y con una capa de hiperqueratosis reactiva que las recubre (5,28). Estas lesiones, además, pueden darse en forma simple o múltiple cuando son dos o más lesiones las encontradas. En la [figura 7](#) pueden observarse los aspectos morfológicos que toma la lesión plantar.

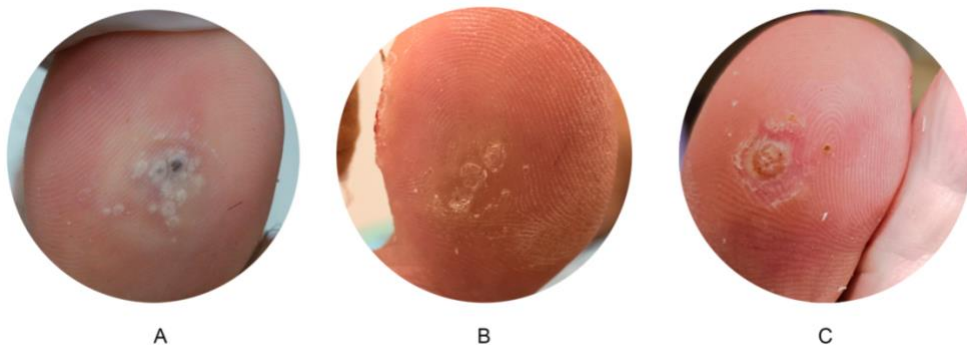


Figura 7 - Presentaciones clínicas de lesiones plantares por VPH.

7a. Clinical manifestation of a wart with characteristic dotted capillaries. 7b. Lesion with reactive hyperkeratosis. 7c. Lesion after paring the superficial layers that shows thrombosed capillaries.

Factores de riesgo

Existen una serie de factores que suponen una predisposición o mayor riesgo de infección por VPH. A nivel cutáneo, cuya forma de contagio es principalmente a través de contacto directo, los factores de riesgo están altamente relacionados con los hábitos de vida y determinantes socioeconómicos (28), sin embargo, existen otra serie de factores individuales a considerar. El caso particular de la epidermodisplasia verruciforme viene dado por mutaciones genéticas en el propio paciente. Se trata de una genodermatosis autosómica recesiva, aunque existen formas de EV adquiridas por procesos de inmunodeficiencia (35). La forma de origen genético se debe principalmente a mutaciones en los genes EVER1/TMC6 y EVER2/TMC8, con descripciones recientes de mutaciones en otros genes para formas no clásicas de EV (23). Las funciones de estos genes requieren estudios en profundidad pero están descritas funciones en la homeostasis del zinc a nivel celular, y al encontrarse expresiones de EVER tanto en queratinocitos como en linfocitos, la existencia de mutaciones en los genes podría explicar un sistema inmunitario deficitario que se traduce en una mayor susceptibilidad a la infección por VPH, especialmente por los tipos HPV-5 y HPV-8, que lleva, además, aparejado un riesgo mayor de oncogenicidad por estos tipos en forma de carcinoma de células escamosas de la piel (SCC) (36).

Esto es una prueba de que el mal funcionamiento del sistema inmunitario juega un papel importante tanto en la infección por el virus como en su pronosis. De hecho, en los casos de sistema inmunitario competente, el propio ciclo del virus está diseñado entorno a la evasión del sistema inmunitario o a secuestrar parte de su funcionamiento. Por esta razón, una disminución fisiológica o temporal del sistema inmunitario puede llevar a infecciones latentes por el VPH a volverse productivas, por lo que podríamos considerar el compromiso temporal del sistema inmunitario como un factor de riesgo para la infección. En este mismo punto se incluyen los fármacos cuyo mecanismo de acción altere o modifique el sistema inmunitario, que pueden favorecer las infecciones por VPH como queda descrito con evidencia

limitada con algunos fármacos para el tratamiento de la psoriasis (37).

Además de los condicionantes genéticos y estados de inmunosupresión, la edad y la raza parecen ser otras de las características inherentes al paciente que pueden considerarse como factores de riesgo para los casos de lesiones plantares, dado que se describe un aumento de la incidencia en población infantil de entre 5 y 16 años, con mayor incidencia en caucásicos según la literatura. Tener la piel húmeda, o previamente dañada también supone un riesgo porque favorece la vía de entrada del virus (28).

Por otro lado, existen los factores extrínsecos al paciente, que son dependientes de sus hábitos y condicionantes sociodemográficos. Prácticas deportivas que incluyan actividades con los pies descalzos o el uso de áreas comunes, duchas o vestuarios en los que se permanezca sin calzado suponen un riesgo de infección por el virus, en estas actividades también se incluyen todas las relacionadas con el deporte u ocio acuático, especialmente en zonas de baño con pavimento antideslizante y que pueda raspar la superficie de la piel (28). A nivel sociodemográfico según estudio por Silverberg y Silverberg, (38) parece haber diferencias significativas en la frecuencia de verrugas en población infantil en hogares con rentas más altas, en comparación con las frecuencias en las que los participantes declararon no haber padecido verrugas. Sin embargo, este dato puede atender a que en estos hogares se busque asistencia ante aparición de lesiones, y por tanto computen por encima de otros hogares de rentas más bajas en los que pueda atrasarse la consulta y las lesiones resuelvan espontáneamente. Sí parece ser un determinante la convivencia de varios niños en el mismo hogar (28). En este mismo sentido, compartir baño o tener contacto directo con otros miembros de la unidad doméstica supone un riesgo de contagio.

Por último, se describe que el uso compartido de objetos de higiene personal como cortaúñas, piedra pómez u otros, así como

prendas de vestir como calcetines y calzado o no cambiar estos regularmente, suponen hábitos de riesgo (28).

La literatura también describe un aumento en la incidencia de casos en las estaciones otoño-invierno, sin embargo, aunque pudiese deberse a una depresión estacional del sistema inmunitario, debe considerarse que las infecciones estivales, por las actividades al aire libre y ocio acuático con pies descalzos pueden ser la razón del aumento de incidencia en estos meses, cuando la infección se manifiesta de forma clínica (5,28).

Datos epidemiológicos de la infección plantar

Las lesiones plantares cuentan con una mayor incidencia entorno a la preadolescencia, sin diferencias entre sexo de los individuos. En estudios de prevalencia realizados, se habla de hasta un 33% de prevalencia de verrugas cutáneas en una población de niños y niñas (39) con edades comprendidas entre los 4 y 15 años, con mayores prevalencias en edades de la segunda década incluidas en el estudio, y el 24% de las lesiones encontradas fueron plantares. Estudios más recientes, en población escolar, describen un 10.3% de prevalencia, sin embargo, las lesiones plantares también se mantienen con una frecuencia de un 24% (40). Por su parte, datos epidemiológicos describen una prevalencia de verrugas plantares entorno al 20% en pacientes VIH positivos (41), con cinco veces menos posibilidades bajo terapia antirretroviral, y en población adulta inmunocompetente (16-70 años) se describe prevalencia de 2.54% con mayor incidencia en jóvenes adultos hasta los 20 años (42,43).

1.4. Diagnóstico clínico de lesiones plantares por VPH.

El diagnóstico de las lesiones plantares causadas por el VPH es predominantemente clínico, esto es, basado en una serie de signos y síntomas, algunos de los cuales están considerados patognomónicos (5,28).

Habitualmente las lesiones incluyen los siguientes signos y síntomas (5,28):

- Dolor.
- Incapacidad funcional.
- Capilares trombosados en forma de punteado de color rojo o pardo (Papilas).
- Crecimiento disruptivo del patrón dermatoglífico.
- Dolor al pellizco (Signo de *pinch*).

La [figura 8](#) representa los signos encontrados destacados individualmente.



Figura 8 - Signos clínicos de las lesiones plantares.

8a. Disruption of the dermatoglyphic pattern. 8b. Pinch sign. 8c. View of the lesion showing thrombosed capillaries using a dermatoscope.

El signo positivo al pellizco representa una herramienta ampliamente utilizada para el juicio diagnóstico, y, a su palpación, la lesión se siente dura (5,28).

Según la literatura, el método utilizado para el diagnóstico de las lesiones cutáneas es el examen visual, aunque se recomienda utilizar estudios patológicos o genotipado en casos de lesiones atípicas o de diagnóstico dudoso (44).

Los estudios histopatológicos describen las lesiones plantares con características comunes a otras lesiones cutáneas producidas por VPH, pero con crecimiento endofítico. Los cortes revelan material eosinofílico en el estrato córneo y a nivel intracitoplasmático de los queratinocitos. Otros hallazgos son presencia de acantosis, papilomatosis e hiperqueratosis (45), así como paraqueratosis y en algunos casos, inclusiones intracitoplasmáticas, y evidencias de incremento de mitosis celulares en queratinocitos cercanos a la membrana basal (28,46).

Recientes revisiones sistemáticas de la literatura (44) otorgan cierto valor al uso del dermatoscopio como ayuda para el diagnóstico visual. La herramienta permite ver la lesión de forma aumentada, sin embargo, no la recomiendan con firmeza por considerar la evidencia al respecto como muy baja. Junto con el uso del dermatoscopio, el diagnóstico clínico también se ha venido reforzando con el estudio de herramientas como CWARD tool (47), que asiste en la clasificación clínica de las verrugas cutáneas basándose en ítems dicotómicos, aunque su uso está más enfocado a la estandarización de la descripción de las lesiones.

Por último, existen descritas técnicas de amplificación de ADN vírico mediante PCR para verrugas cutáneas incluidas las plantares, con mayor o menor implementación clínica que satisfactoriamente han logrado detectar y genotipar el virus en este tipo de lesiones (48,49).

1.5. Diagnóstico diferencial.

Las lesiones producidas por el VPH a nivel plantar, presentan características similares a otras no producidas por el virus, por lo que, y especialmente en población pediátrica, a menudo hay que establecer un diagnóstico diferencial (28).

Los helomas y las hiperqueratosis en la planta del pie suponen una de las principales entidades con las que establecer diagnóstico diferencial. Los helomas son hiperqueratosis localizadas de forma circunscrita, típicamente causadas por requerimiento biomecánico o impactos repetitivos que obligan al estrato córneo en esa área localizada a engrosarse como consecuencia de una apoptosis de las células basales (50).

Por su forma y localización en zonas de presión biomecánica, a menudo debe diferenciarse de las lesiones plantares por VPH. A nivel histológico, además, los helomas presentan signos como acantosis, paraqueratosis e hipertrofia y tejido cicatrizal en la dermis. Estos signos son compatibles con los vistos en las verrugas plantares, y existe evidencia de cortes histológicos de hiperqueratosis localizada imitando los hallazgos normalmente encontrados en éstas últimas (51).

Algunas diferencias a nivel visual que pueden ayudar a establecer el diagnóstico diferencial es que al deslaminado con bisturí, los helomas no suelen sangrar de forma punteada como sí hacen las verrugas plantares, y visualizar si sobre la lesión se continúan los dermatoglifos, ya que su desaparición es otro signo de infección (28).

Otras condiciones con las que establecer diagnóstico diferencial son infecciones parasitarias por *Tunga penetrans* (52), angioqueratomas solitarios (53), que también muestran presentación clínica e histopatológica similar, carcinoma verrucoso, molusco contagioso, fibroqueratoma y otros (28,54-56).

1.6. Manejo de las lesiones por virus del papiloma humano.

El manejo de las lesiones causadas por VPH a nivel cutáneo y específicamente las lesiones plantares mediante diferentes tratamientos carece de evidencia sólida prolífica, además, estos tratamientos no son específicos, tienen tasas de éxito no consistentes entre individuos o diferentes poblaciones y generalmente van asociadas a efectos secundarios inevitables (5,28).

Cuando se da la infección, existe un periodo en el que no se aprecia el cuadro clínico, un periodo que podemos considerar de latencia, como se ha explicado previamente en la etiopatogenia de la infección y su ciclo viral. En este periodo, el virus puede mantenerse o bien puede resolver espontáneamente sin que aparezcan síntomas. Otra opción es que se dé la presentación clínica y con ella existen dos opciones, o que se resuelva de forma autolimitada o que no lo haga (6,28).

Las tasas de resolución espontánea varían. Algunos autores sugieren tasas de resolución espontánea para verrugas cutáneas de hasta 3 de cada 4 casos, sin embargo en pacientes mayores de 12 años esta regresión disminuye significativamente (28). En otro estudio (57) en población pediátrica se describen regresiones espontáneas un año después en un 50% de los casos tanto para verrugas en manos como en la planta del pie. En cualquier caso, la literatura parece estar de acuerdo en que en la población adulta esta frecuencia de resolución espontánea disminuye y, por otra parte, el hecho de que las lesiones sean plantares, se presta a un abordaje clínico, dado que los pacientes buscan asistencia para aliviar el dolor y la impotencia funcional que causan, además de por la preocupación de infectar a otros miembros familiares (28,57).

Para su eliminación se requiere una respuesta inmunitaria celular, mediada por células de Langerhans (LCs) como presentadoras de antígeno a los linfocitos T y que activan

citoquinas inflamatorias en los queratinocitos infectados para ser eliminados (28).

Si esto no se consigue de forma natural, la infección se establece de forma permanente, por lo que se debe abordar con un tratamiento de elección. Guías de práctica clínica (44) recomiendan abordar las lesiones de forma temprana para evitar recurrencias, autoinfecciones e infecciones a otros individuos, así como implementar tratamientos en pacientes inmunodeprimidos, para evitar riesgos de cambios displásicos o malignidades (28).

Las modalidades de tratamiento en su mayoría tienen como objetivo destruir el tejido. Estos tratamientos se pueden clasificar según su naturaleza en físicos, químicos, farmacológicos/inmunoterápicos o resección quirúrgica.

Métodos físicos

- Crioterapia: Utiliza nitrógeno líquido (-196°C) para necrosar el tejido. Tiene una tasa de éxito variable, aunque la literatura describe ser un tratamiento más favorable para la población pediátrica. Para las lesiones plantares parece tener menor tasa de éxito (58).
- Hipertermia: Habitualmente utiliza infrarrojos, aunque existe en forma de parches y otros dispositivos. La literatura difiere en cuanto a las temperaturas aunque se sugiere que temperaturas entorno a los 37-48°C puede favorecer la migración de LCs y tiene tasas de éxito similares a la crioterapia (59,60).
- Radiofrecuencia: Se puede utilizar como método de hipertermia o en forma de ablación, con tasa de éxito moderada (58).

- Láser: Existen diferentes tipos, con diferentes longitudes de onda por debajo del infrarrojo. El láser de CO₂ se usa con fines de escisión de la lesión, otros de tipo diodo (Arseniuro de Galio entre otros) pueden utilizarse como ablación térmica o para producir tratamiento de forma hipertérmica sin destrucción de tejido (28,58). La utilización de estos dispositivos requiere de uso de EPIs para prevenir inhalación de partículas infecciosas por la producción de humo durante la intervención (44).

Otros métodos físicos descritos en la literatura pero con menor frecuencia de uso son luz pulsada con fotosensibilizante, infrarrojos, microondas y ultrasonidos entre otros (58).

Métodos químicos

Es la modalidad empíricamente más utilizada en consultas de podología en España. La finalidad del uso de estos agentes es producir una quemadura química en el tejido.

Habitualmente se usa ácido nítrico 60%, ácido monocloraético y ácido tricloroacético. Otras opciones son el uso de nitrato de plata o fenol. Las tasas de éxito varían entre el 41-61% (58).

Una forma menos agresiva es el uso de ácido salicílico en formulaciones entre el 10-60%, que tiene acción queratolítica. Es uno de los tratamientos utilizados por los pacientes de forma autónoma, previamente a la consulta o prescrito por el profesional como primera elección (28). Tiene baja tasa de éxito, especialmente en mayores de 12 años, y sin supervisión puede producir lesiones importantes en el tejido sano (28). La [figura 9](#) muestra el curso clínico de tratamiento mediante quemadura con ácido nítrico hasta su alta clínica.



Figura 9 - Curso clínico de tratamiento mediante quemadura con ácido nítrico.

Métodos farmacológicos e inmunoterápicos

En esta modalidad de tratamiento, se incluyen medicamentos con diferentes fines, desde producir una vesícula o reseca el tejido, pasando por el uso de antimetabólicos o antivirales, hasta producir respuesta inmunitaria mediante el uso de antígenos intralesionales.

La cantaridina, habitualmente utilizada en forma de fórmula magistral, tiene como principio activo la cantaridina derivada de insectos coleópteros como la *Lytta vesicatoria*. Es un producto vesicante, produce muerte celular y acantolisis y tiene tasas de éxito descritas que ascienden hasta el 80% (28,58).

Los antimetabólicos como la Bleomicina tienen un uso de segunda o tercera línea de tratamiento. Inhibe la síntesis proteica y replicación del ADN, induciendo apoptosis en las células. Sin

embargo, parece depender de una respuesta inmunitaria a su mecanismo de acción dado que su eficacia en persona inmunodeprimidas es menor (58). Tiene tasas de éxito según la bibliografía entre el 16 y 97% (28). Otros inhibidores del crecimiento epidérmico como el uso de retinoides o podofilintoxina están descritos para el tratamiento de verrugas (28,58).

El uso de fármacos antivirales también se describe, aunque al no ser fármacos específicos su uso se reserva especialmente en pacientes inmunodeprimidos. El cidofovir tópico es una de las alternativas, que ha mostrado ser útil en el tratamiento de verrugas plantares recalcitrantes (61) en pacientes inmunocompetentes, sin embargo, se requiere ensayos clínicos aleatorios en profundidad.

Por último, otra opción terapéutica dentro de la modalidad inmunoterápica, es el uso de agentes inmunogénicos que activen una respuesta inmunitaria mediante su inclusión intralesional. Su uso es virtualmente anecdótico a nivel clínico, pero es una alternativa terapéutica que cuenta con interés a nivel de investigación. Una de las opciones antigénicas es *cándida albicans* (28,62). También se describen otras opciones inmunoterápicas mediante interferón, sensibilizadores de contacto, óxido de zinc, 5-fluoroacil, Imiquimod (28,63), o tratar de crear una respuesta inmunitaria mediante punción múltiple de la extensión de la lesión (64,65).

Resección quirúrgica

Cuando las opciones terapéuticas anteriores fracasan o la presentación clínica se presta a ello, se puede optar por resección quirúrgica. La desventaja de esta opción terapéutica es que la planta del pie tiene procesos de cicatrización complejos, que pueden tener implicaciones biomecánicas y estéticas. Una de las ventajas de esta modalidad es que permite utilizar el tejido para examen histopatológico (28).

1.7. Justificación de la necesidad de implementar pruebas complementarias en el diagnóstico de lesiones plantares por VPH.

Descrita la etiopatogenia del virus y las presentaciones clínicas que tiene en las lesiones plantares surge un punto importante a explorar. Las lesiones plantares tienen aspectos visualmente compatibles con otras entidades patológicas previamente descritas en el diagnóstico diferencial. La propia literatura, describe mimetizaciones incluso a nivel histológico (51,53), lo que puede llevar a la posibilidad de dificultar el diagnóstico diferencial. Así mismo, guías de práctica clínica apoyan la idea de utilizar métodos diagnósticos que permitan esclarecer las dudas de las lesiones potencialmente producidas por VPH (44).

Por otra parte, aunque siempre insuficiente, la literatura es prolífica y creativa en cuanto a la investigación de alternativas de tratamiento para las lesiones plantares producidas por el virus. Todas las modalidades disponibles son inespecíficas contra el virus y la mayor parte de ellas tiene como objetivo la destrucción del tejido, tanto el infectado como el tejido sano perilesional. Si bien la resolución ocurre con mayor o menor tasa de éxito, cabe pensar que pueda haber casos en los que el tratamiento quede injustificado por un diagnóstico impreciso.

Contar con métodos diagnósticos que puedan utilizarse de forma complementaria, puede solventar el diagnóstico diferencial, y, en consecuencia, permitir un abordaje terapéutico justificado. Estas herramientas deben estar disponibles a nivel clínico, ser efectivas a nivel de costes, sensibles y específicas. La literatura, de hecho, soporta la evidencia de que diferentes genotipos causantes de las lesiones tienen mayor o menor posibilidad de recurrencias, dan mejor o peores tasas de éxitos según qué tratamientos, o tienen mayor frecuencia de resoluciones espontáneas como el HPV-1 en población pediátrica (66) o que el HPV-2, -27 y -57 sólo un 7% de resolución espontánea (67).

Todo esto justifica la necesidad de explorar métodos diagnósticos que cumplan con estas características y posibiliten establecer diagnósticos y tratamientos precisos.

OBJETIVOS GENERALES

1. Describir las posibilidades de métodos diagnósticos complementarios eficaces para las lesiones plantares por VPH.
2. Evaluar la necesidad diagnóstica para el diagnóstico diferencial de lesiones plantares por VPH.
3. Implementar un protocolo de detección de ADN vírico en el entorno clínico a partir de muestras de tejido de las lesiones por papiloma plantar.
4. Desarrollar un mapa geográfico de distribución de genotipos de VPH de lesiones plantares.
5. Desarrollar una técnica de diagnóstico molecular que se adapte al entorno podológico y que permita una óptima relación beneficio-coste.

CAPÍTULO I

Revisión sistemática de las técnicas diagnósticas para infecciones por VPH y su implementación en lesiones plantares.

RESUMEN

El virus del papiloma humano se describe como el agente causante de la mayoría de los cánceres cervicales, así como de otras lesiones que cursan con potencial malignidad. Además, afecta a virtualmente cualquier área de la piel corporal, produciendo tumores benignos. Una de las presentaciones clínicas frecuentes son las verrugas plantares, cuyas presentaciones clínicas comparte signos y síntomas con otras entidades patológicas de la piel. En este capítulo se aborda la revisión sistemática de la literatura de las técnicas diagnósticas disponibles con uso clínico para la identificación de cualquiera de las presentaciones clínicas producidas por el virus y se comparan los hallazgos con aquellos obtenidos específicamente para las lesiones plantares. Los resultados muestran una gran variedad de técnicas disponibles. Las técnicas moleculares son las que cuentan con mejor sensibilidad para la mayoría de las presentaciones, pero no cuenta con un uso frecuente para las lesiones plantares, las cuales aborda la literatura con un diagnóstico visual que se presta a potenciales errores. A la luz de los resultados queda evidenciada la necesidad de mejorar e implementar las técnicas más eficaces disponibles para el diagnóstico de las lesiones plantares.

Los resultados del presente capítulo quedan recogidos en el artículo publicado en la revista *Expert Review of Molecular Diagnostics* en noviembre de 2021, cuya referencia se recoge en el apartado de [Contribuciones Científicas](#) al final de este documento.

Palabras clave: VPH, PCR, verruga plantar, podología, diagnóstico diferencial.

INTRODUCCIÓN

Con sus cientos de tipos, el VPH está ampliamente reconocido como el agente causal de la mayoría de los cánceres cervicales y de aproximadamente la mitad de los cánceres orofaríngeos (68). Su organización basada en el porcentaje de homología del gen L1, mejor conservado en el genoma, diferencia diferentes tipos taxonómicamente. Alpha genus contiene dos de los tipos más estudiados por su alto riesgo de oncogenicidad, el HPV-16 y HPV-18, que afectan a mucosa, sin embargo, dentro del mismo genus, se encuentran también los HPV-27 y -57, de bajo riesgo y que infectan la piel cutánea, y habitualmente encontrado en lesiones plantares. Otros tipos benignos en ocasiones pueden producir malignidad en estados de inmunosupresión o en patologías concomitantes (11,32).

El riesgo de oncogenicidad se ha estudiado en tipos Alpha extensamente, otorgándole la causa a la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del virus que inactivan la proteína tumoral p53 y pRb respectivamente, y que, junto con la evasión del sistema inmunitario da como resultado un daño acumulado en el ADN y su progresión a malignidad. Por su parte, el mecanismo por el que en casos menos frecuentes, algunas infecciones cutáneas por VPH malignizan se estima en que estén mediadas por mutaciones por exposición a radiación ultravioleta (69).

Su relación como agente causal de estos cánceres, además de haberse encontrado en otras formas clínicas, como verrugas cutáneas y anogenitales, papilomatosis respiratoria recurrente, carcinomas anogenitales (incluye vulva, pene, ano) y encontrado, así mismo, en otras afecciones oculares, en canales auditivos como tumores benignos y en piel aparentemente sana (25,26), todo ello hace que la literatura científica sea prolífica en el estudio del virus, su etiopatogenia y como diagnosticarlo y tratarlo adecuadamente.

Por su parte, el virus también puede producir lesiones a nivel plantar en el pie, produciendo tumores benignos que crecen de forma endofítica, produciendo dolor e incapacidad funcional

(5). Es una de las infecciones más frecuentes en la práctica clínica, y su forma de diagnóstico es habitualmente mediante examen visual (5,28). El abordaje clínico de estas lesiones implica destrucción cáustica del tejido lesional, que resulta doloroso al paciente, destruye también tejido sano perilesional y resulta costoso en tiempo y económicamente al paciente, pues habitualmente requiere un régimen de varias consultas (28,58). Por esta razón y en conjunto con la necesidad de identificar las lesiones para evitar contagio a través de fómites o por contacto directo a otros miembros de la unidad de convivencia, el diagnóstico eficaz de las lesiones cobra importancia.

Para las lesiones y manifestaciones clínicas producidas por tipos de VPH de alto riesgo, la investigación diagnóstica está en constante avance, sin embargo, puede no ser el caso para las lesiones plantares, lo que pondría de manifiesto la necesidad de ahondar e invertir en recursos para mejorar su diagnóstico y, ulteriormente, el tratamiento de estas lesiones.

OBJETIVOS

1. Detectar mediante revisión sistemática los métodos de diagnóstico para las infecciones por VPH en general.
2. Detectar mediante revisión sistemática los métodos de diagnóstico para las infecciones por VPH a nivel plantar.
3. Comparar los hallazgos encontrados y establecer el grado de necesidad de investigación en técnicas de diagnóstico para el VPH en las lesiones plantares.

MÉTODO

La revisión sistemática se realizó siguiendo las pautas del protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews) que establece un marco estandarizado para asegurar la calidad y detalle metodológico de las revisiones sistemáticas (70).

Criterios de inclusión

- Estudios centrados en el diagnóstico de la infección.
- Que utilicen muestras humanas.
- Que dichas muestras no procedan de archivos o hayan sido previamente descritas como positivas o negativas.

Esto es, que la técnica de estudio se use de forma clínica. Sin embargo, se incluyen aquellos estudios que comparen diferentes métodos diagnósticos simultáneamente.

- Estudios que utilicen cualquier tipo de técnica para comprobar o verificar la infección por el virus de forma justificada por la sospecha o presentación clínica.
- Idioma: Inglés y/o Español.
- Cualquier duración y cualquier tipo de diseño.

Datos de estudio

Los estudios incluidos fueron sometidos a revisión detallada para extraer datos sobre su sensibilidad, especificidad, fiabilidad, beneficio-coste y su rendimiento.

Fuentes de información

El estudio de revisión incluye búsquedas en dos bases de datos de forma paralela. Por una parte, se introdujo la cadena de

búsqueda en PubMed (MEDLINE) y por otra, la misma cadena de búsqueda utilizando Web Of Science (WOS), incluyendo todas sus bases de datos (Web of Science Core Collection, Current Contents Connect, Derwent Innovation Index, KCI-Korean Journal Database, Russian Science Citation Index and SciELO Citation Index).

Para evitar que las búsquedas en paralelo en las bases de datos duplicaran resultados en los estudios incluidos, se realizó un doble chequeo: primer chequeo semiautomático con opción de búsqueda en la base de datos interna (Microsoft® Excel, Versión 16.23, Microsoft Corp.) y segundo chequeo manual.

Estrategia de búsqueda

Se utilizaron dos cadenas de búsqueda con operadores en ambas bases de datos consultadas.

Cadena de búsqueda 1:

PubMed
HPV AND diagnosis Filters: 5 years; Humans.
WOS
HPV AND diagnosis Timespan: 5 years.

Cadena de búsqueda 2:

PubMed
Plantar warts AND diagnosis Filters: 10 years; Humans.
WOS
Plantar warts AND diagnosis Timespan: 10 years.

La cadena de búsqueda 1 tiene por objetivo obtener los resultados de las técnicas diagnósticas en estudio para infecciones por VPH en humanos en los últimos 5 años. Por otra parte, la cadena de búsqueda 2 tiene por objetivo obtener los resultados de las técnicas diagnósticas en estudio para infecciones por VPH en humanos en los últimos 10 años. El tiempo en esta segunda cadena de búsqueda se estableció en 10 años con la intención de obtener la mayor cantidad de resultados posibles, dada la potencialmente menor cantidad de literatura específica para las lesiones plantares.

Las búsquedas se realizaron en dos ocasiones. La primera de ellas data del 12 de noviembre de 2018, la segunda, como base para actualizar la revisión sistemática, el 17 de septiembre de 2020.

Proceso de selección

El proceso de revisión, selección e inclusión de estudios se realizó por rondas. En una primera ronda, se seleccionaron resultados en base a la idoneidad de los títulos de los resultados obtenidos con los criterios de inclusión. En caso de duda, el resumen fue utilizado para discernir su cumplimiento. De esta forma, se marcaron y guardaron en colecciones o listas marcadas, para PubMed/WOS respectivamente, para segunda ronda de revisión.

La segunda ronda consistió en evaluar el contenido de los resultados seleccionados en la anterior, revisando su resumen o el texto completo en caso de duda de ajustarse a los criterios de inclusión. Los artículos seleccionados en esta ronda fueron accedidos y descargados para la tercera y última ronda para su revisión, inclusión, y extracción de los datos para su estudio posteriormente.

Durante todo el proceso de selección se mantuvo un fichero para mantener constancia del flujo de inclusiones y exclusiones, así como de las razones para ello, y fue realizado por un único investigador, salvo en caso de resultados dudosos, en cuyo caso se discutían por dos revisores simultáneamente para valorar el cumplimiento de los criterios de inclusión.

RESULTADOS

La cadena de búsqueda 1 (*HPV AND diagnosis*) en PubMed con los correspondientes filtros previamente descritos, devolvió un total de 6703 resultados. Tras la primera ronda de selección, 281 estudios fueron guardados en la colección para la ronda posterior, tras la cual se obtuvieron un total de 75 estudios para revisión en profundidad de su texto completo.

Por su parte, la cadena de búsqueda 1 en WOS devolvió, 5764, que fueron sometidos a las rondas de selección consecutivas obteniendo 450 estudios en la primera y 95 estudios para la revisión de texto completo.

La cadena de búsqueda 2 (*Plantar warts AND diagnosis*) en PubMed con los correspondientes filtros, dio como resultado 78 estudios, de los cuales se guardaron en colección 14 para la segunda ronda, y tras ésta, 7 cumplieron con los criterios para la revisión de texto completo.

De forma paralela, la misma cadena de búsqueda en WOS, devolvió 87 resultados. De estos resultados obtenidos se eliminaron duplicados con la cadena de búsqueda en PubMed, quedando 1 único estudio para su revisión completa por parte de esta base de datos.

La [figura 10](#) muestra el diagrama de flujo del proceso de selección, inclusión y exclusiones.

Tras el proceso de revisión de los textos completos, 53 estudios se excluyeron de la base de datos de PubMed, 68 de WOS y 1 estudio de la cadena de búsqueda 2. Así el total de estudios finalmente incluidos y de los cuáles se extrajeron los datos para la revisión sistemática fueron 55 estudios. Todos los motivos de exclusión tras la revisión de artículos en la ronda de *abstract* y de revisión de textos completos, y el número de artículos para cada exclusión pueden visualizarse en la [tabla 2](#).

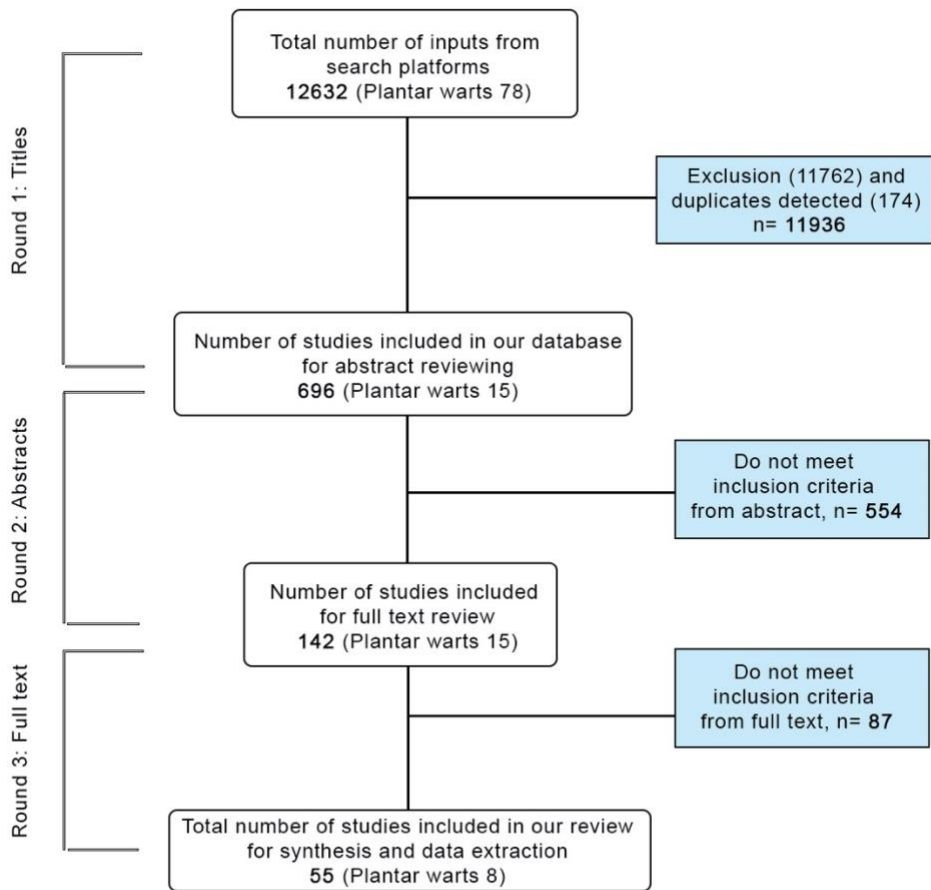


Figura 10 - Diagrama de flujo del proceso de selección de estudios.

Reason for exclusion	Nº of articles excluded
Not focused on diagnosis	116
Prevalence studies, screenings, or follow-ups	98
Previously diagnosed samples	138
Focus on sampling method	21
Not available	51
Studies using animals	5
Use of cell lines, plasmids or other	37
Retrospective studies, archive samples or FFPE ^a	86
Reviews or protocols	48
Do not explain the origin of samples	23
In other languages	5
Comments on other articles or letters to the editor	5
Duplicates	8
Total	641

Tabla 2 - Motivos de exclusión por revisión de abstract y textos completos.

- a. FFPE; Formalin-Fixed Paraffin Embedded.

Manifestaciones clínicas diagnosticadas.

Tras la obtención de los datos a partir de los 55 artículos incluidos en la revisión sistemática, se encontraron diferentes entidades patológicas o manifestaciones clínicas a partir de las cuales se identificó el VPH. Más de la mitad de los resultados obtenidos diagnostican lesiones cervicales producidas por VPH (n=35 estudios), y les siguen cánceres orofaríngeos y otras entidades patológicas. La [tabla 3](#) muestra la relación de estas manifestaciones descritas por los resultados para cada cadena de búsqueda. Cabe destacar que uno de los resultados obtenidos de la cadena de búsqueda 1 hace referencia a una onicolisis persistente de la uña de primer y segundo dedo del pie, pero dada la naturaleza de esta manifestación clínica y que ocurre en el pie, se optó por incluir como resultado para las afecciones plantares.

HPV AND diagnosis	Plantar warts AND diagnosis
Cervical lesions	Plantar warts
HNSCC/OPSCC ^a (71)	Persistent Onycholysis ^c (82)
Ophthalmic pterygium (25)	Verruca vulgaris (83)
Nasal papilloma (72,73)	Verrucous carcinoma (54)
Recurrent Respiratory Papillomatosis (RRP) (74)	
Anogenital warts (75)	
Colorrectal lesions (including polyps) (76)	
Multiple Bowen's disease (77,78)	
Focal Epithelial Hyperplasia (FEH) (79)	
OPMD ^b (80):	
Oral fibromas	
Oral traumatic ulcerative lesions	
Papillomatosis	
Lichen Planus	
Leukoplakia	
Epidermodysplasia verruciformis (81)	

Tabla 3 - Manifestaciones clínicas que cursan con infección por VPH en los estudios incluidos.

- a. HNSCC/OPSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma/ Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.
- b. OPMD: Oral Potentially Malignant Disorders.
- c. From "HPV AND diagnosis" search, included here for discussion purposes.

Métodos diagnósticos para las infecciones por VPH.

En su mayor parte, en los resultados del estudio de revisión sistemática, las lesiones eran diagnosticadas utilizando dos métodos. La [tabla 4](#) y la [tabla 5](#) muestran las técnicas utilizadas para todos los estudios incluidos por parte de la cadena de búsqueda 1, y contienen datos sobre su sensibilidad y especificidad, o el funcionamiento de la técnica, si de los estudios no podían extraerse datos de la sensibilidad y especificidad, respectivamente.

Por otra parte, la [tabla 6](#) incluye una comparativa entre dos técnicas de diagnóstico, midiendo el grado de acuerdo entre ellas mediante el grado de acuerdo (*Concordance Rate*; CR) y el coeficiente Kappa, como forma de validación de la prueba diagnóstica de estudio. Esta tabla está construida en base a los datos extraídos de los estudios incluidos que realizaran dichos cálculos.

Method	Condition	Samples	Control ^a	Sensitivity ^b	Specificity	References
Immunological techniques	Cervical lesions, HNSCC	770	Genital warts slides, recombinant protein	0.49 – 0.93	0.64 – 0.94	(71,84–89)
Digital diffraction	Cervical lesions	25	None	1	0.92	(90)
Pap test Cytology ^c	Cervical lesions	1103	None	0.86 – 0.91	0.08 – 0.13	(91)
ThinPrep Cytology	Cervical lesions	450	None	0.36	0.88	(92)
DNA PCR	Cervical lesions, ophthalmic pterygium	5533	HPV+ samples, human β -globin gene, control subjects	0.80 – 0.99	0.23 – 1	(25,86,88,89,91–97)
mRNA assays	Cervical lesions	1231	None	0.81 – 0.90	0.32 – 0.87	(89,98–100)
Western blot analysis	Cervical lesions	102	None	0.65	0.38	(101)
Hybridization	Cervical lesions	3122	β -globin gene	0.78 – 1	0.06 – 0.88	(95,96,98–102)

Tabla 4 - Sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas utilizadas en lesiones producidas por VPH.

HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; DNA: Deoxyribonucleic acid; PCR: Polymerase Chain Reaction; HPV+; Positive Human Papilloma Virus; mRNA: Messenger Ribonucleic Acid.

^a Some studies did not explicitly report use of controls (= None).

^b Studies that reported sensitivities and specificities between different types of lesions by severity (grade of invasion), parameters referring to CIN2+ (Cervical Intraepithelial Neoplasia grade 2+) or HSIL (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion) according to the Bethesda System of classification (103) were used for a more cohesive and systematic comparison of all methods.

^c Several studies used cyto-histopathological methods, simply for comparison, or as useful information, or because it is a routine part of clinical practice, without calculating sensitivity and specificity.

Method	Condition	Samples	Control	Performance	References
Immunological techniques	BP, cervical lesions	3	None	Used as a secondary test	(78,104,105)
Cytology	BP, cervical lesions, CA, IP, nasal papilloma, EV.	196	None	EV diagnosed with cytology. Cytology was performed alongside another method.	(72,73,75,78,81,97,104-107)
DNA PCR	Anogenital warts, cervical lesions, Multiple Bowen's Disease, RRP.	1778	HPV+ samples, human β -globin gene, control subjects.	PCR accurately detects the infection. Specific primers are of key importance.	(73-75,77,81,97,108-113)
mRNA assays	Cervical lesions	993	U1A ribonucleoprotein	mRNA proved to be a robust test	(114,115)
Hybridization	BP, Colorectal lesions, IP, Cervical lesions, CA.	132	None	Only 3% of samples were positive. Sometimes failed to identify HPV type.	(72,76,78,104,107)
CIALFB	Cervical lesions	21	None	Highly sensitive and specific.	(113)

Tabla 5 - Eficacia y funcionamiento de las técnicas diagnósticas en lesiones producidas por VPH (sin parámetros específicos).

BP: Bowenoid papulosis; CA: Condyloma acuminata; CIALFB: CRISPR/Cas-Isothermal Amplification Based Lateral Flow Biosensor; EV: Epidermodysplasia verruciformis; IP: Inverted papilloma.

	Comparison	Sample	CR	Kappa	Performance	References
Cobas 4800	PANArray Genotyping	504	80.8%	0.59	Moderate concordance, HPV types not identified should be carefully monitored	(116)
HC2	PANArray Genotyping	504	80.2%	0.60		
IHC	HPV Genotyping	339	86.4%	0.74	IHC can detect more types	(84)
Cobas 4800	HPV E7 DNA test	60	-	0.83 – 1	HPV E7 Test complies with international guidelines	(101)
Cobas 4800	OncoE6 Cervical Test	448	-	0.68	Good concordance, but immunochromatographic assay is less sensitive and specific	(86)
Abbott RealTime	Conventional Nested PCR	83	85.7%	0.58	Abbott RT seems to have lower sensitivity, but is easier to implement in low-income countries	(117)
LinearArray Genotyping assay	Anyplex II HPV28	403	-	0.44 – 1	Both tests had similar outcomes, but further research with low-risk HPV types is needed	(118)
LinearArray Genotyping assay	EuroArray HPV	403	-	0.25 – 0.96		
Cobas 4800	APTIMA assay	123	95.1%	0.76	Both assays showed similar results	(92)

Tabla 6 - Comparativa y grado de acuerdo entre técnicas diagnósticas para infecciones por VPH.

CR: Concordance Rate; HC2; Hybrid Capture 2; IHC: Immunohistochemistry; HPV E7 DNA: Test targeting E7 gene of HPV.

Métodos diagnósticos para las infecciones plantares.

Los métodos diagnósticos usados para las infecciones plantares fueron: inspección visual, dermatoscopia, histopatología, PCR y ecografía.

La información extraída con los resultados de la revisión sistemática sobre estas técnicas, la manifestación clínica y número de muestras y datos sobre la eficacia del método diagnóstico se muestra en la [tabla 7](#).

Method	Condition	Samples	Performance	References
Visual inspection	PW, VV	58	Visual inspection insufficient for diagnosis	(48,83,119)
Dermatoscopy	PW, VV	119	Useful but does not detect HPV	(83,120,121)
Cyto-Histopathology	PW, VV, onycholysis	88	Common method of choice, provides quality information but does not detect the virus	(48,82,83,122,123)
Ultrasound	PW	30	Able to differentiate between groups. Useful for diagnosis	(122,123)
DNA PCR	PW, onycholysis	51	Detects the virus, confirms etiology but requires training and expensive equipment.	(48,82)

Tabla 7 - Técnicas diagnósticas para las lesiones plantares por VPH.

PW: Plantar wart; VV; Verrucae vulgaris.

DISCUSIÓN

A la luz de los resultados obtenidos en la revisión sistemática, se pone en evidencia que la infección por VPH es un tema prolífico en la literatura científica con especial énfasis en la investigación clínica. Sin embargo, se muestra una asimetría evidente en lo que respecta a los tipos de lesiones o manifestaciones clínicas. Las infecciones cervicales son las que cuentan con diferencia con mayor apoyo bibliográfico, seguido de otros cánceres producidos por el virus, y la literatura en métodos diagnósticos se vuelve más escasa conforme esas infecciones son cutáneas, y con procesos de investigación menos sólida en el caso de las infecciones plantares. Por tanto, es uno de los puntos clave la falta de investigación de calidad para el diagnóstico de estas lesiones comparado con otras manifestaciones clínicas. Aunque algunos artículos han abordado el diagnóstico de las infecciones plantares utilizando técnicas innovadoras, como el uso de ecografía por Wortsman X et al (123) comparando su uso entre un grupo control de pacientes sanos y otro con lesiones con sospecha de infección por VPH, su muestra es limitada y no identifica o detecta el virus, sino que es un método visual apoyado por el uso del ecógrafo, que puede prestarse a cierta subjetividad.

De hecho, como puede observarse en la [tabla 7](#), la visualización de las lesiones, ya sea de forma directa o indirecta con ayudas técnicas, parece seguir siendo el método más utilizado para el diagnóstico de la infección por VPH en el pie, sin embargo, los errores diagnósticos no son infrecuentes, como las propias técnicas de citohistopatología, que describen similitudes en los estudios por sospecha de VPH con otros problemas en los pies como las hiperqueratosis (51). Para evitar estos posibles errores de diagnóstico, la detección del VPH para las lesiones causantes de lesiones cutáneas y plantares específicamente, daría más seguridad en el juicio diagnóstico cuando fuera necesario establecer un diagnóstico diferencial, y de esta forma, con el diagnóstico apropiado, evitaría tratamientos innecesarios en ciertos casos.

Más allá de detectar el virus, conocer el genotipo cobra especial importancia en lesiones potencialmente cancerosas, algo que es habitual estudiar en cánceres cervicales, para detectar tipos de alto riesgo. Sin embargo, en algunos casos como pacientes inmunodeprimidos, algunos tipos de bajo riesgo pueden progresar hacia malignidades o incluso se pueden encontrar tipos de alto riesgo afectando a piel cutánea incluyendo el pie (5), u otras zonas corporales como también ha sido reportado en algunos casos de Enfermedad de Bowen, en la que se detectó HPV-58 como causante de lesiones malignas en la piel (77). Por esta razón, explorar la posibilidad de implementar técnicas de detección y genotipado puede ser de gran ayuda para las lesiones plantares y otras lesiones cutáneas en muchos casos.

Por esta vía, estudios como el de Sasagawa et al (48) describen resultados derivados del uso de una multiplex PCR a lesiones de diferentes sitios anatómicos, algunas de ellas plantares, por lo que se establece así un punto de partida para la detección del virus por PCR como una alternativa de diagnóstico en estos casos. No obstante, el estudio está enfocado en la identificación de los tipos más frecuentemente encontrados en diferentes partes del cuerpo, no exclusiva y representativamente plantar, y su principal limitación para su implementación clínica es la toma de muestra, dado que se basa en la obtención de un *punch* de biopsia, y por tanto lo vuelve un método impracticable de forma rutinaria para las lesiones plantares. Así mismo, el estudio carece de una batería amplia de experimentos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, por lo que aún se requiere investigación en este sentido.

Dado que no existe un método de diagnóstico que cumpla las expectativas de todas las manifestaciones clínicas que causa el virus, la investigación en técnicas continúa explorando todas las posibilidades. Ninguno de los métodos encontrados en la revisión sistemática fue contundentemente mejor que otro, aunque algunos métodos son comparables siguiendo algunos criterios como se ha podido comprobar con los datos obtenidos y que pueden verse en las [tablas 4 y 6](#). En base a estos datos, en términos

de sensibilidad y especificidad, los test de detección de ADN tienden a dar resultados más consistentes. Por su parte, los ensayos basados en RNA y proteínas son útiles para obtener información sobre el estado actual de la infección y son notablemente sensibles, por lo que su uso está especialmente indicado para observar la evolución de la enfermedad, especialmente en casos malignos. Las pruebas de detección de mRNA (mRNA assays) muestran incluso mayor sensibilidad que las pruebas de detección de ADN, según los datos extraídos de los estudios incluidos en este trabajo, sin embargo, en los primeros, la especificidad suele ser normalmente baja, y existe la limitación de que, en esta revisión sistemática, sólo dos estudios contribuyen a aportar datos sobre este tipo de ensayos.

Por su parte, la citología se mantiene como el estándar básico para el cribado de cáncer cervical, pero habitualmente le sigue un método de detección molecular para la detección y genotipado del virus.

Los resultados de la revisión han permitido así mismo, identificar técnicas diagnósticas innovadoras, que se valen de diferentes agentes, como el uso de tecnología con *smartphones* que cobra utilidad especialmente en zonas de difícil acceso a otras pruebas diagnósticas (90), el uso de hibridización o análisis mediante Western blot son otros medios encontrados en la literatura, sin embargo, la investigación en técnicas también se abre a la combinación bioingeniera con el uso de micro-chips y software combinado con otras técnicas (124–126). Algunas de estas pruebas no fueron incluidas en la revisión por no cumplir los criterios de inclusión, dada su falta de implementación clínica, sin embargo, es necesaria su mención como punto de partida para investigaciones futuras.

CONCLUSIONES

1. Los métodos para el diagnóstico de infecciones por VPH son abundantes e incluyen técnicas de dermatoscopia, citohistopatología, técnicas inmunológicas, análisis de detección de ADN y ARN, con secuenciación directa y/o genotipado, difracción digital, y espectrometría.
2. Los métodos encontrados en la literatura científica para diagnóstico clínico de las infecciones plantares por VPH se basan principalmente en la valoración visual directa o indirecta, apoyada por técnicas como dermatoscopia y ecografía. Otros métodos utilizados son la citohistopatología o la detección de ADN.
3. La comparación de las técnicas diagnósticas encontradas en ambas cadenas de búsqueda muestra la notable asimetría en investigación para infecciones por VPH generales de diferente localización en comparación con las plantares. Las técnicas para la primera cadena abundan además en sensibilidad y especificidad en el diagnóstico y con mayor vanguardia investigadora, que pone de manifiesto la necesidad de invertir recursos en la investigación diagnóstica para las lesiones plantares.

CAPÍTULO II

Evaluación del diagnóstico visual por parte de Podólogos de lesiones plantares producidas por VPH y la necesidad pruebas complementarias.

RESUMEN

Las verrugas plantares producidas por VPH son un problema común encontrado en la práctica clínica en podología cuyo diagnóstico es fundamentalmente clínico, como queda reflejado de forma empírica en la práctica, pero también descrito en la literatura, y que se basa en una serie de signos y síntomas. Sin embargo, los errores diagnósticos pueden dar como resultado el tratamiento de las lesiones mediante quemadura, habitualmente con agentes químicos, de forma innecesaria. El objetivo de este capítulo es evaluar el diagnóstico visual de los profesionales de la Podología en lesiones por VPH y otras que cursan con sintomatología similar, así como estudiar la predisposición de estos profesionales al uso de pruebas complementarias para verificar estas infecciones. Para la obtención de los datos, se diseñó y utilizó un cuestionario de evaluación, y los resultados arrojaron evidencia de alto porcentaje de errores diagnósticos en algunos casos junto con una predisposición baja al uso de pruebas complementarias, lo que crea una sólida necesidad de introducir e implementar técnicas de para establecer diagnósticos diferenciales en estas lesiones.

Los resultados del presente capítulo quedan recogidos en el artículo publicado en la revista *Journal of Fungi* en enero de 2022, cuya referencia se recoge en el apartado de [Contribuciones Científicas](#) al final de este documento.

Palabras clave: Verruga plantar, error diagnóstico, pruebas complementarias.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones dermatológicas son uno de los problemas más frecuentes encontrados en la práctica clínica, encabezando el listado epidemiológico las infecciones fúngicas (127,128). Sin embargo, las infecciones víricas por VPH es otro de los problemas habituales en clínica. Los datos epidemiológicos muestran que este tipo de infecciones se da entorno en el 20% de la población pediátrica, con valores menores de incidencia en adultos (39). En el caso de las lesiones plantares, al contrario que otras infecciones cutáneas por VPH, los síntomas cursan con dolor e impotencia funcional, por lo que los pacientes buscan asistencia para aliviar estos síntomas además de solventar la preocupación por infectar a otros miembros de la unidad de convivencia (5).

Además del dolor y la impotencia funcional, la literatura describe una serie de signos y síntomas asociados al aspecto y morfología de las lesiones, sin embargo, otras entidades patológicas como las hiperqueratosis, helomas, molusco contagioso y otras lesiones (28,52), comparten similitud con éstas, pudiendo suponer un reto para el diagnóstico diferencial.

En estos casos, apoyarse de un método de diagnóstico complementario para verificar la infección puede ser de ayuda. En el caso de otras infecciones, como las producidas por hongos, se cuenta con estándares de oro para el diagnóstico, que en este caso particular se trata del cultivo microbiológico (129). No se cuenta, no obstante, con esta facilidad de estándar de diagnóstico para las infecciones plantares por VPH. La literatura describe varias opciones complementarias al diagnóstico, entre otras, apoyo con ecografía, dermatoscopia, o pruebas complementarias de tipo histopatológico o incluso detección de ADN vírico mediante PCR, como ha quedado descrito previamente en el [capítulo I](#).

Algunas de estas técnicas tienen la principal desventaja de que la toma de muestra requiere de un bocado o *punch* de biopsia, y, en consecuencia, provocan una lesión importante, que llega a ser limitante para el paciente por la localización plantar. Otras,

requieren de un entrenamiento exhaustivo de los profesionales, como la toma de imágenes ecográficas, y tienen la desventaja de prestarse a cierta subjetividad, o de ser caras o inespecíficas (48,83,123).

Estas debilidades, pueden tener su origen en una escasez de investigación en técnicas diagnósticas que mejoren las pruebas complementarias disponibles para las lesiones plantares por VPH. Sin ellas para confirmar el diagnóstico, los profesionales de la salud pueden verse avocados a implementar una pauta de tratamiento de forma empírica, lo que conllevaría a lesionar el tejido sano de forma innecesaria en caso de no tratarse, de forma efectiva, de una infección por el virus, por un error diagnóstico. Sin embargo, se requieren datos sobre la frecuencia de estos errores diagnósticos o de si el diagnóstico visual, utilizado habitualmente, es suficiente para ello o bien existen debilidades en él por parte de los profesionales.

Por esta razón son datos que puede ser necesario evaluar y estudiar, ya que pueden ayudar a movilizar recursos en la investigación diagnóstica o para implementar modelos de cambios en el manejo clínico de estas lesiones en función de los resultados arrojados.

OBJETIVOS

1. Evaluar la capacidad diagnóstica visual de los profesionales de la podología en el diagnóstico de verrugas plantares y otras lesiones similares.
2. Evaluar la predisposición de los profesionales de la podología al uso de pruebas complementarias para la confirmación de la infección plantar por VPH.
3. Evaluar la frecuencia con la que los profesionales de la podología utilizan o solicitan pruebas complementarias para el diagnóstico de infección plantar por VPH.

MÉTODO

Diseño del cuestionario de evaluación del diagnóstico visual.

Para la evaluación de la capacidad diagnóstica visual, se diseñó un cuestionario de 12 ítems. El cuestionario se preparó para la valoración del diagnóstico visual de verrugas plantares (6 ítems) y para el diagnóstico de onicomicosis (6 ítems, resultados no mostrados).

Los ítems consistían en 6 imágenes de verrugas plantares y lesiones similares con las que establecer diagnóstico diferencial, que incluían lesión por molusco contagioso, neuroma dermal, fibroqueratoma y heloma. La [figura 11](#) muestra dos de los ítems incluidos en el cuestionario para el diagnóstico de lesiones plantares, y en el [Anexo I](#) se encuentra el cuestionario completo (incluye imágenes censuradas cuya licencia de uso se extiende únicamente a los fines de investigación, pero no de publicación).



Figura 11 - Ítem 3 y 4 de evaluación diagnóstica visual de lesiones plantares.

Left: HPV plantar lesion; Right: Heloma on the 2nd metatarsal head.

El cuestionario se diseñó para incluir un espectro de dificultad completo, con lesiones fácilmente diferenciables e identificables por sus signos y síntomas, y lesiones que muestran el mismo aspecto clínico y por tanto requieren un diagnóstico diferencial exhaustivo. Las lesiones estaban previamente confirmadas en el diagnóstico mediante examen histopatológico o material de referencia proveído para fines de investigación para el estudio.

Sujetos de estudio y criterios de inclusión.

El cuestionario fue puesto a disposición de únicamente podólogos colegiados, incluyendo a recién graduados, de forma que pudieran extraerse datos acerca del posible efecto de los años de experiencia, que se establecieron en grupos de <10 años, 11-20 años y >20 años de ejercicio, sobre la capacidad diagnóstica visual.

Los participantes respondieron al cuestionario una única vez y accedieron a él a través de los 17 Colegios Oficiales de Podólogos de España.

Análisis estadístico.

Se calculó el tamaño muestral con un intervalo de confianza del 95% y un margen de error de 0.05 en una población de 7817 podólogos, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) para el año 2018 (130), con un resultado de tamaño muestral de 367.

Para el análisis estadístico se utilizó software estadístico SPSS Statistic Software versión 22.0 (Armonk, NY, IBM Corp.) Y se realizaron análisis descriptivos, utilizando la prueba de Person's Chi-square (χ^2) en las tablas de contingencia para las variables de los años de experiencia (<10 años, 11-20 años and >20 años) y las variables derivadas del diagnóstico correcto o incorrecto, con intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS

La muestra total de participantes en el estudio fue de 415 profesionales de la podología, de los cuales trabajaban en práctica clínica el 96.6% de ellos.

Consideración de la necesidad de pruebas complementarias.

Las pruebas complementarias para el diagnóstico de las verrugas plantares sólo fue considerado necesario por el 14.4% de los participantes, mientras que el 85.5% restante no las consideró necesarias. Del 14.4% que sí mostraron predisposición a su uso, el 81.4% nunca las ha usado, el 17.8% aseveró haber usado pruebas complementarias alguna vez, y el 0.7% asegura utilizarlas siempre para el diagnóstico de las lesiones plantares con sospecha de infección por VPH.

La [figura 12](#) muestra las pruebas diagnósticas de elección en el caso de considerarlas necesarias para el diagnóstico.

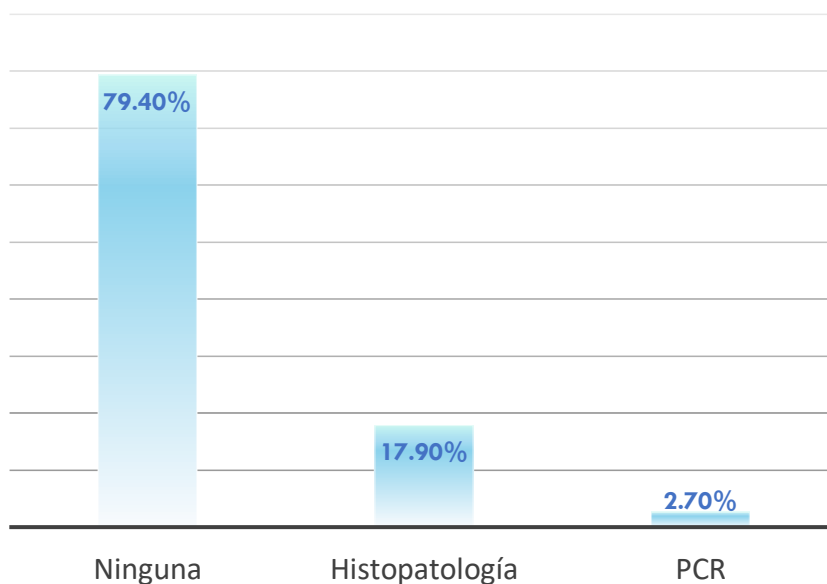


Figura 12 - Pruebas diagnósticas de elección por participantes con predisposición a su uso.

Evaluación del diagnóstico visual.

Los resultados arrojaron datos sobre el diagnóstico visual en lesiones plantares y diagnóstico diferencial de éstas con hasta un 76.6% de error diagnóstico y tratamiento innecesario mediante quemadura química en algunos de los ítems. En otros ítems del cuestionario de evaluación, un 17.6% de los participantes dejarían por tratar una lesión causada por VPH también por diagnóstico incorrecto. La [tabla 8](#) muestra los resultados completos obtenidos para la evaluación del diagnóstico visual.

Correct diagnosis	Would treat as HPV plantar warts	
	Yes	No
1. Fibrokeratoma (-)	22.9 %	77.1 %
2. Molluscum contagiosum (MC) (-)	76.6 %	23.4 %
3. Plantar wart (+)	82.4 %	17.6 %
4. Dermal neuroma (-)	68.4 %	31.6 %
5. Plantar wart (+)	93 %	7 %
6. Heloma (-)	37.8 %	62.2 %

Tabla 8 - Evaluación del diagnóstico visual de lesiones plantares por VPH (diagnósticos correctos e incorrectos).

(+) and (-) Indicating HPV lesion or non HPV lesion respectively.

Años de experiencia en el diagnóstico visual.

En los ítems 4 y 5 del cuestionario, hubo diferencia significativa con respecto a los grupos establecidos de los años de experiencia ($p= 0.03$ y $p=0.025$, respectivamente) como puede observarse en la [tabla 9](#). Se incluyen en esa misma tabla el resto de los análisis para el resto de los ítems que no mostraron significación de diferencia entre los grupos.

	Diagnosis	Experience (in years) (n=415)			Pearson's χ^2
		<10 (n=201)	11-20 (n=128)	>20 (n=86)	
Fibrokeratoma	Incorrect	45	34	16	0.386
	Correct	156	94	70	
MC	Incorrect	163	89	66	0.054
	Correct	38	39	20	
Plantar wart	Incorrect	37	23	13	0.791
	Correct	164	105	73	
Dermal neuroma	Incorrect	150	79	55	0.03
	Correct	51	49	31	
Plantar wart	Incorrect	21	4	4	0.025
	Correct	180	124	82	
Heloma	Incorrect	77	46	34	0.852
	Correct	124	82	52	

Tabla 9 - Años de experiencia y frecuencia de error diagnóstico de lesiones plantares.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten analizar el proceso de diagnóstico clínico para las lesiones por VPH a nivel plantar por parte de los podólogos en toda su extensión. Por una parte, se obtuvieron datos sobre la consideración de la necesidad de pruebas complementarias para el diagnóstico de estas lesiones y en el caso de considerarlas necesarias, con qué frecuencia y qué prueba es la de elección. En este aspecto, los resultados mostraron que la amplia mayoría de profesionales de la podología no considera necesario el uso de pruebas complementarias para el diagnóstico de las lesiones plantares, con sólo un 14.4% que sí las considera necesarias, resultado que además va en línea con el hábito de utilizarlas, dado que el porcentaje de uso de pruebas complementarias asciende a un 18.5%, con un 17.8% que sólo las han usado de manera ocasional.

En cuanto a las pruebas que marcaron como de elección fue la histopatología principalmente, con un anecdótico uso de PCR que asciende a un 2.7% de los casos, que puede estar mediado por una falta de implementación en el entorno clínico para las verrugas plantares en conjunto con una investigación en el campo que aún está en sus inicios (48,131). Sin embargo, es un método que puede ser de utilidad explorar como opción diagnóstica.

Con los datos extraídos, se muestra una evidente tendencia a descartar el uso de las pruebas complementarias para el diagnóstico de las lesiones plantares por VPH por parte de los profesionales de la podología, sin embargo, este hallazgo contrasta con los resultados obtenidos por parte de la evaluación del diagnóstico visual. Mientras que el 85.5% de los profesionales no considera necesaria las pruebas complementarias para verificar la infección, hasta un 76.6% (en [tabla 8](#), ítem 2) iniciaría un tratamiento mediante quemadura cáustica habitual (5) para tratar una lesión no producida por el VPH, produciendo así una posible molestia y quemadura química innecesaria al paciente. Al mismo tiempo, otros errores diagnósticos, quedan en evidencia al dejar

por tratar una lesión causada por VPH por un 17.6% (tabla 8, ítem 3) de los profesionales, pudiendo así mismo dar como resultado insatisfacción tanto por el paciente como por el profesional al tratamiento o abordaje planteado tras el error diagnóstico.

Este tipo de errores diagnósticos, de forma generalizada parece darse de forma homogénea en todos los profesionales, aunque según los resultados obtenidos tras el análisis, existen diferencias significativas en el ítem 4 (tabla 9), donde los profesionales con menos años de experiencia parecen tener menos éxito en el diagnóstico de este ítem en comparación de los profesionales con más de 10 años de experiencia clínica, y vuelve a ocurrir en el ítem 5, que la tasa de errores diagnósticos es más alta en comparación con los aciertos en el grupo de los profesionales más jóvenes. No se encuentran datos similares con los que comparar en la literatura, sin embargo, extraído del mismo estudio, los resultados obtenidos para el diagnóstico de onicomycosis (datos no mostrados) sí muestran una homogeneidad en la frecuencia de los errores diagnósticos en todos los grupos e ítems evaluados, por lo que el resultado obtenido para las verrugas plantares puede obedecer a una mayor dificultad para el diagnóstico de estas lesiones en general, o que con los años de experiencia aporten cierta ventaja el diagnóstico visual para el caso particular de las verrugas plantares.

De forma general los resultados evidencian que es importante, especialmente para los profesionales de la podología, contar con herramientas diagnósticas apropiadas y eficaces a su disposición en las que poder apoyarse en los casos que requieran establecer diagnóstico diferencial para estas lesiones. Por esta razón, a la luz de los datos obtenidos, la investigación en métodos diagnósticos debe dirigirse hacia proveer de estas herramientas, hacerlas disponibles en el entorno clínico e identificar las mejoras que permitan un uso generalizado por los profesionales en su práctica clínica.

CONCLUSIONES

1. Los profesionales de la podología muestran dificultad en el diagnóstico diferencial de las lesiones plantares por virus del papiloma humano de forma visual, con evidencia de mayor dificultad en los profesionales con menos de 10 años de experiencia clínica.
2. Los profesionales de la podología no muestran una predisposición generalizada al uso de pruebas complementarias para confirmar el diagnóstico de infección por VPH.
3. El uso de las pruebas complementarias es infrecuente para la confirmación de infección por VPH en lesiones plantares y el método más empleado, la histopatología, es invasivo y cruento para el paciente.

CAPÍTULO III

Implementación clínica de un método multiplex PCR para la detección de VPH en lesiones plantares y distribución de genotipos en diferentes áreas geográficas de España.

RESUMEN

El virus del papiloma humano es el agente etiológico de varios tumores, incluyendo a las lesiones o verrugas plantares como una de sus más frecuentes presentaciones clínicas. El diagnóstico de estas lesiones se mantiene aún de forma principalmente clínica, con una incidencia de errores diagnósticos que puede llevar a implantar tratamientos inadecuados. El objetivo de este capítulo es implementar y validar un método de detección de ADN vírico como técnica diagnóstica en el entorno clínico y estudiar la distribución geográfica de los genotipos de VPH encontrados en diferentes zonas de España, de forma que los datos obtenidos permitan mejorar técnicas diagnósticas en investigación futura.

Para ello se obtuvieron muestras de pacientes con sospecha de lesiones plantares por VPH de distintas localidades de España, y se sometieron a multiplex PCR y secuenciación directa para la obtención del resultado positivo y genotipo respectivamente. El método se validó durante su implementación y se examinó su reproducibilidad, dando como resultado un alto grado de fiabilidad de la prueba como método diagnóstico y una distribución de genotipos que suponen datos de interés para el desarrollo de nuevas técnicas complementarias para el diagnóstico del VPH plantar.

Palabras clave: Verruga plantar, diagnóstico, PCR, HPV type, errores diagnósticos.

INTRODUCCIÓN

El VPH se ha explicado previamente como causante de diferentes tumores a nivel cutáneo y mucoso, con diferente tipo potencial de malignidad en función del tipo que afecta a la lesión y otros condicionantes inherentes al paciente como su estado inmunitario y algunos extrínsecos asociados como la exposición de lesiones que cursan con infección por VPH a radiaciones ultravioletas en el caso de algunas malignidades cutáneas (11,32,69). Sus presentaciones clínicas son diversas, e incluso apareciendo en tejido sano, en canales auditivos y folículos pilosos (25,26). Además de estas presentaciones, las lesiones plantares son frecuentemente observadas en la práctica clínica, con la particularidad de cursar con dolor e impotencia funcional en zonas de alta presión biomecánica y que se contagian principalmente a través de contacto directo o a través de fómites (28). Es un problema frecuente con una incidencia importante, especialmente en población joven e inmunodeprimida (28,57). Estos pacientes buscan el tratamiento para aliviar la sintomatología y evitar contagios, sin embargo, el tratamiento también es lesivo, requiere varias consultas y puede llegar a suponer un alto coste (5).

Por esta razón, el diagnóstico cobra importancia como ha quedado reflejado en anteriores capítulos. El diagnóstico principal de las lesiones plantares ([capítulo I](#) y [II](#)) por parte de los profesionales de la podología es el diagnóstico visual, tanto a nivel de literatura científica como en la práctica clínica, pero como también se ha observado en el [capítulo II](#), los errores diagnósticos pueden llegar a ser frecuentes y con alta tasa de fallo, lo que conlleva a insatisfacción por el tratamiento planteado o incluso se puede llegar a lesionar el tejido sin que realmente lo requiera.

La falta de literatura científica que invierta recursos en implementar técnicas diagnósticas que verifiquen la infección para el caso de las lesiones plantares, teniendo en cuenta las particularidades de éstas, puede ser uno de los motivos de la baja tasa de uso de estas pruebas complementarias en estos casos en

comparación con otras manifestaciones clínicas producidas por el virus (capítulo 1).

Existen estudios que han abordado diferentes métodos de diagnóstico que se centran en la detección del ADN vírico para estas lesiones (48,132), sin embargo se requieren estudios adicionales con implementación clínica, que estudie datos de sensibilidad y especificidad y examinen la intra e inter reproducibilidad de la prueba. Por lo que serán objetivos con importancia a estudiar en la investigación de las mejoras diagnósticas de estas lesiones en el ámbito de la podología.

Por otra parte, el estudio de los genotipos que afectan a las diferentes lesiones causadas por el VPH permite enmarcar la realidad de las infecciones producidas por el virus. Están descritas distribuciones de tipos de VPH asimétricas entre diferentes zonas geográficas. Los tipos HPV-16, HPV-18, HPV-33, entre otros, son los más comúnmente aceptados a nivel científico como los causantes de cánceres cervicales en la mayoría de países, sin embargo, en Asia es común encontrar otros tipos como el HPV-52 y HPV-58 (133), por lo que es importante conocer esta información en términos epidemiológicos, para adecuar los métodos de cribado y diagnóstico así como la idoneidad de las vacunas existentes a los tipos comunes en cada zona. Por este mismo razonamiento, conocer los genotipos que afectan a nivel cutáneo, y específicamente a las lesiones plantares en una determinada área geográfica cobra importancia a la hora de desarrollar métodos de diagnósticos para estas lesiones, de forma que estas pruebas permitan la detección de estos tipos comunes con particular énfasis.

Replicación del ADN y fundamentos de la PCR.

El ADN es la molécula por excelencia de almacenamiento de la información genética, cuyo proceso de replicación semiconservada permite proveer de una misma copia del material genético a ambas células hijas. Su estructura, propuesta por Watson y Crick en 1953 (134), basada en resultados de difracción

de rayos X del ADN por Franklin y Gosling, (135), está formada por una doble hélice de cadena de naturaleza polisacarídica y grupos fosfatos dispuestas de forma antiparalela, en la que los nucleótidos quedan enfrentados a sus complementarios, A-T y C-G, por enlaces doble y triples de hidrógeno respectivamente.

Esta conformación de múltiples enlaces y su estructura en hélice junto al hecho de que se asocia a histonas y se pliega sobre sí misma para formar una estructura más compactada hace que la molécula sea altamente estable. Sin embargo, el desenrollamiento es posible, y necesario, para la replicación, bien de forma natural mediante helicasas en los sitios de origen, o bien de forma artificial, induciendo la separación de las hebras al incrementar la temperatura (136), de forma que se rompen los enlaces de hidrógeno y por tanto la unión de las cadenas. Esta temperatura es la T_m , o temperatura de *melting*, que viene determinada, entre otros factores, por la cantidad de contenido de CG que requiere mayor energía térmica, por sus triples enlaces, en comparación con el contenido de AT. Cuando la temperatura se restablece, las hebras complementarias pueden volver a unirse.

Esta es la base del funcionamiento de la PCR, reacción en cadena de la polimerasa. En la reacción *in vitro*, el ADN diana, se separa permitiendo a la polimerasa termorresistente elongar una nueva copia añadiendo las bases complementarias a partir del *primer* (o cebador) diseñado para la replicación del segmento de ADN de estudio. Tras la creación de la nueva copia, la temperatura vuelve a incrementarse para separar ambas copias nuevamente, y crear otras a partir de ellas, incrementando el número en forma de progresión geométrica, de manera que de cada copia de ADN diana se obtienen dos nuevas y en 35 ciclos se obtienen del orden de $n \cdot 10^{36}$ copias exactas (136). En la [figura 13](#) se muestra una representación esquemática de la PCR.

La enzima involucrada en el proceso debe ser termorresistente, dado que la desnaturalización de las hebras sucede a temperatura de 95°C, que inhibiría la actividad de la *DNA Pol III* humana. Este hándicap se resolvió con la introducción del

uso de la enzima polimerasa del organismo *Thermophilus acuaticus* (Taq), resistente a estas temperaturas (137), aunque existen varias alternativas a ésta en la actualidad.

La adición de más de un par de *primers* en la misma reacción para la obtención de diferentes amplicones a partir de diferentes dianas tiene por nombre multiplex PCR (137).

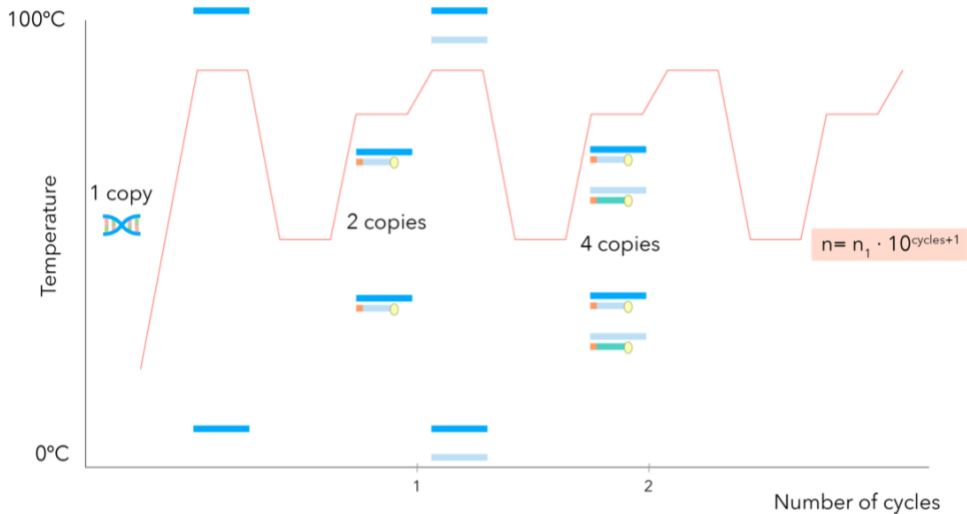


Figura 13 - Representación esquemática simplificada de la PCR.

Desde los inicios de la PCR los avances en el diagnóstico molecular mediante PCR han llevado a la técnica convencional, explicada arriba brevemente, a métodos más innovadores y rápidos. Entre ellos, la qPCR, que es su forma cuantitativa y en tiempo real, permite la cuantificación del ADN inicial y de las copias obtenidas en el proceso (137). Otras técnicas derivadas, incluyen el uso de microgotas, chips, PCR digital, amplificación isotérmica o RT-PCR para la amplificación de segmentos de ARN entre otras aplicaciones (44). Todo ello le ha valido ser una técnica ampliamente utilizada a nivel científico, pero también como método diagnóstico, incluso ganarse la consideración de *gold standard* de diagnóstico en infecciones como la causada por el SARS-CoV-2, causante de la pandemia de COVID19 (138) y está ampliamente presente en los cribajes y diagnóstico tanto de

lesiones cervicales como de tumores orofaríngeos aunque el estándar diagnóstico para estas lesiones se mantenga en el estudio citológico (139,140).

OBJETIVOS

1. Implementar un método de detección de ADN vírico para lesiones plantares por VPH a partir de muestras de pacientes con sospecha diagnóstica.
2. Validar el método de detección mediante análisis de validación.
3. Estudiar la distribución de genotipos de las muestras según su origen geográfico.
4. Estudiar si algún condicionante inherente al paciente o datos sociodemográficos están relacionados con el genotipo causante de la infección.

MÉTODO

Consideraciones bioéticas.

El estudio cuenta con aprobación para su realización por parte de la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Extremadura, registrado bajo el número de registro 123/2018 ([Anexo I](#)) y cumple con los principios éticos de investigación médica con sujetos humanos según la Declaración de Helsinki y la legislación vigente en materia de investigación biomédica.

Los participantes fueron incluidos voluntariamente tras la firma del correspondiente consentimiento informado ([Anexo II](#)).

Obtención de muestras.

Las muestras fueron obtenidas de pacientes que, acuden a consulta, por lesiones potencialmente compatibles con infección por VPH. Las consultas y centros incluían diferentes zonas geográficas (2 clínicas en zona suroeste, 3 clínicas centro-oeste, 1 clínicas en zona centro del país, 3 en zona sur y 1 en zona norte) Para discernir estos casos se realizó una exploración dermatológica rutinaria de la lesión en busca de signos y síntomas descritos anteriormente en la introducción:

- Dolor al pellizco.
- Interrupción de dermatoglifos.
- Lesión circunscrita con hiperqueratosis reactiva que la cubre.
- Aparición de capilares trombosados o sangrantes tras la deslaminación de la hiperqueratosis superficial.

Los casos dudosos por no ajustarse a la presentación clínica habitual también fueron incluidos con la finalidad de dar utilidad al método como prueba complementaria.

Las muestras fueron obtenidas de diferentes zonas geográficas para extraer datos de la distribución de genotipos.

Para que las muestras pudieran ser incluidas en el estudio debían cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- Primera consulta.
- No haber sido sometidos a tratamiento previo o haber dejado al menos un mes de aclaramiento del tratamiento.
- Dar consentimiento de participación y donación de la muestra.

Los criterios de exclusión fueron pacientes que no dieran su consentimiento, lesiones que estuvieran en proceso de tratamiento, y lesiones en las que no fuera posible la obtención de la muestra por su tamaño o superficialidad.

Para la toma de muestra se utilizó etanol al 70% como antiséptico, seguido de raspado con bisturí del número 15 o número 10, en función del tamaño de la lesión, descartando las escamas más superficiales de la hiperqueratosis reactiva, obteniendo las escamas más internas a la lesión, tratando de no incluir abundante tejido ensangrentado. Este procedimiento es rutinario y se practica de forma habitual en la primera consulta por sospecha de lesión por VPH en podología, y es prácticamente indoloro al paciente y sencillo para el profesional pues no requiere entrenamiento adicional.

Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Variables sociodemográficas.

Durante la primera consulta se obtuvieron los siguientes datos acerca del paciente y la muestra para realizar un estudio descriptivo e inferencial:

- Sexo.
- Edad
- Tiempo de evolución
- Localización de la lesión.

- Tipo de lesión (simple o múltiple).
- Tratamientos previos (si procede).
- Hábitos de riesgo.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios del grupo de investigación DEDAP de la Universidad de Extremadura, del Centro Universitario de Plasencia. Para los análisis de reproducibilidad inter-laboratorios, se hizo uso del laboratorio de investigación bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Extracción de ADN.

Se utilizaron 0.025g de escamas de cada muestra para la extracción y purificación del ADN. Para ello se utilizó el kit de extracción genómica Invitrogen PureLink™ Genomic DNA mini Kit (Invitrogen Corp., Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante para tejido de mamífero, optimizado para nuestras muestras con una incubación de 3 horas y dos pasos de elución con agua ultrapura de 50 µl y 100 µl. Se realizó la incubación a temperatura ambiente de 1 minuto y centrifugado a 12000 rpm de 1 minuto entre ambos pasos para un volumen total de 150 µl de ADN purificado para un mejor rendimiento en procesos posteriores. El ADN se mantuvo a una temperatura de 4°C previamente a su procesamiento.

Como método de verificación del éxito de la extracción se realizó la cuantificación estimativa del ADN mediante diluciones a concentraciones 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10 y carga en gel de agarosa al 1% seguido de electroforesis a 100 V durante 20 minutos para obtención de bandas. Según protocolo 17 realizado por Sambrook y Green, (año) (141), la banda más tenue comparada con el estándar puede establecerse hasta en algo más de 5 ng.

Controles internos y construcción de plásmidos.

Se diseñó un plásmido como control positivo del método de detección de PCR multiplex, utilizando para su diseño una secuencia diana de referencia del gen L1 del HPV-1 para el set de *primers* utilizados (Accession number: V01116). Fue sintetizado (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA) y resuspendido en agua ultrapura a una concentración de 0.03693 μM .

Como control de calidad interno para el método de detección de PCR multiplex, se realizó el estudio de detección del gen de β -Globina humano para valorar la integridad del ADN de las muestras, de forma que una muestra HPV negativa fuera considerada un verdadero negativo y no el resultado de ADN degradado. Para esto, se utilizaron los *primers* PC04 y GH20 previamente descritos (142), que dan como resultado positivo una banda a 268 pb en el gel de agarosa. El gen de β -Globina humano codifica proteínas que mantienen la función celular, lo que lo convierte en una diana habitual como control de calidad del ADN.

Para el control negativo del método de detección de PCR multiplex, se utilizó agua ultrapura como molde.

Método de detección de VPH mediante Multiplex PCR.

Para el método de detección de ADN del HPV se utilizó el PCR HS Taq DNA Polymerase kit (PCR Biosystems Ltd., London, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando de forma estimada (ver [Extracción de ADN](#)) 75 ng de DNA y 10 μM del set de *primers* previamente descritos (48) para una concentración final de 0.4 μM , 0.25 μl (5u/ μl) de ADN Taq polimerasa, y agua ultrapura (ddH₂O) para un volumen final de 50 μl .

Las muestras fueron procesadas en conjunto con el control positivo y control negativo previamente descritos en el apartado anterior.

Las condiciones de ciclos en termociclador MultiGene™ OptiMax Thermal Cycle (LabNet, Madrid, ES) fueron las siguientes:

- 1) Desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto.
 - 2) Desnaturalización a 95°C por 15 segundos.
 - 3) Alineamiento a 45°C por 30 segundos
 - 4) Extensión a 72°C por 30 segundos.
- X 35
ciclos
- 5) Extensión final a 72°C por 3 minutos.

Tras la PCR, los productos resultantes de la amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio o solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Burlington, MA, USA), ambos agentes intercalantes en cadenas de ácidos nucleicos, que devuelven señal de longitudes de onda de 590 nm en el espectro visible rojo-anaranjado y de 522 nm en el espectro verde de luz visible respectivamente para cada colorante, bajo luz UV(141). La electroforesis se estableció a 100 V durante 20 minutos. Para la visualización de los geles, se transiluminaron con luz UV de 312 nm de longitud de onda y se fotografiaron con el sistema de adquisición de imágenes de geles DP-CF-011.C (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Alemania). La [figura 14a](#) muestra una lectura VPH positiva en gel.

Se consideró como resultado positivo aquellos que dieron una banda entorno a 210-238 pb, junto con un control positivo y negativo correctos.

El ADN de los resultados negativos a la PCR-multiplex, fueron sometidos a PCR para la detección de β -Globina, siguiendo el mismo procedimiento para la master-mix que para el método de detección de VPH con el PCR HS Taq DNA Polymerase kit (PCR Biosystems Ltd., London, UK) previamente descrito. El protocolo de termociclador para esta PCR se mantiene, así mismo, igual, cambiando únicamente la T_m a 55°C en el paso de alineamiento

durante los ciclos (Paso 3). Estos resultados se visualizaron siguiendo el mismo protocolo arriba mencionado de electroforesis en gel obteniendo una banda positiva a 268 pb. La [figura 14b](#) muestra unas lecturas β -Globina positivas en gel.

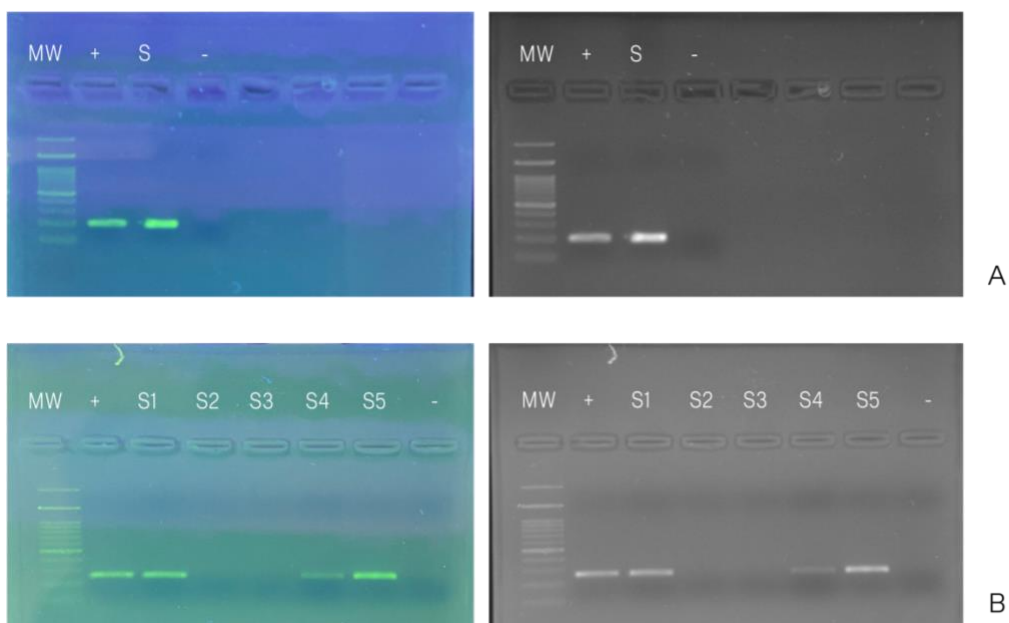


Figura 14 - Resultados de Multiplex PCR en gel y PCR gen de β Globina.

MW: molecular weight; +: positive control; S: Sample; -: Negative control.

A on the left represents direct UV visualization with RedSafe™ staining dye and positive band for HPV on S well. On the right, the image taken by the gel imaging system.

B on the left represents direct UV visualization with RedSafe™ staining dye and positive band for β -Globin gene on S1, S4 and S5 wells, negative results on S2 and S3. On the right, the image taken by the gel imaging system.

Secuenciación y genotipado.

Los resultados exitosos de los productos de amplificación derivados de la multiplex PCR fueron enviados para purificación y secuenciación de tipo Sanger al Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura.

Los archivos de secuenciación obtenidos fueron procesados utilizando SnapGene Viewer® version 6.0.2 (GSL Biotech LLC, San Diego, CA, USA) y su secuencia fue analizada utilizando la herramienta de taxonomía L1 Taxonomy Tool de la base de datos Papillomavirus Episteme (PaVE, <https://pave.niaid.nih.gov>) para genotipar las muestras en base a su analogía a VPH de referencia existentes en dicha base de datos.

Ensayos de validación de la técnica.

Los ensayos de validación de la técnica de multiplex PCR siguieron las pautas marcadas por la guía para la validación de pruebas moleculares desarrolladas en laboratorio para enfermedades infecciosas (143). Dado que el método de detección de VPH por multiplex-PCR explicado en apartados anteriores se trata de una prueba cualitativa, los ensayos de validación a realizar incluyen: sensibilidad analítica en términos de límite de detección (LOD) y estudios de precisión.

La sensibilidad analítica se define como la capacidad del ensayo de detectar la más mínima concentración del analito de la muestra biológica, y utiliza el término límite de detección de informa intercambiable, dado que éste límite representa la verdadera menor concentración que es capaz de detectarse de forma consistente o sistemática (143).

Sensibilidad analítica.

Para el estudio de la sensibilidad analítica se optó por un diseño de estudio para testar diluciones seriadas de muestras de conocida concentración del analito diana en un rango de detección límite esperado.

Como la sensibilidad analítica puede variar en función de diferentes variantes genéticas (incluidos genotipos), por diferencias en el alineamiento de los *primers* o el rendimiento de la amplificación, se optó por usar el plásmido de control positivo

previamente mencionado en el apartado de **controles internos** para el análisis de LOD como diana de uno de los pares de *primers*, el SKF2 y el SKR2, utilizados en la multiplex-PCR, y se sintetizó un segundo plásmido diana del segundo par de *primers* de la multiplex-PCR, el SKF1 y SKR1, para lo cual se optó por una secuencia del gen L1 del HPV-27 (Accession number X74473) también sintetizado (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA) y resuspendido en agua ultrapura a una concentración de 0.06718 μM .

Para encontrar el punto medio entre conseguir la menor incertidumbre estadística y ajustarse a la disponibilidad tanto de muestra a analizar como de presupuesto, se realizaron entre 5 y 6 diluciones seriadas de diferentes concentraciones de ambos plásmidos, del orden de 10^6 a 10^2 copias, y los experimentos de límite de detección se realizaron en 8 réplicas durante 5 días, lo que asegura un adecuado número de muestras como queda descrito en la guía de validación comentada anteriormente.

Las condiciones de multiplex-PCR se ajustaron a las descritas previamente para el procesamiento de las muestras de origen clínico. Para el cálculo del límite de detección en base a los resultados obtenidos en estos ensayos, se realizó un análisis probit, como queda descrito en la sección de análisis estadístico más adelante.

Estudios de precisión: repetibilidad y reproducibilidad.

La precisión hace referencia a la consistencia de resultados de forma repetida. Existen diferentes factores que pueden influir en la consistencia de resultados en las pruebas de laboratorio, entre otros, los equipos utilizados, el manejo, e incluso desajustes en los volúmenes de pipeteado o diferencias entre operadores.

Para cubrir diferentes variables, se realizaron estudios de precisión bajo las mismas condiciones, esto es, mismo

equipamiento y operario, y estudios de precisión en otras instalaciones y equipamiento, para valorar la repetibilidad (intra-repetibilidad) y reproducibilidad (inter-reproducibilidad) de la prueba multiplex-PCR, respectivamente.

El diseño de estudio elegido para obtener estos resultados fue mediante análisis de 10 muestras positivas y 10 muestras negativas, tanto de origen clínico como plásmidos, a diferentes concentraciones para incluir tanto muestras positivas fuertes como débiles. Estos experimentos se realizaron en el mismo día para el análisis de la intra-repetibilidad y en días diferentes en otro laboratorio utilizando diferente equipamiento (termociclador y micropipetas) llevando a cabo el mismo protocolo para la valoración de la inter-reproducibilidad. Para el cálculo del nivel de acuerdo entre los diferentes experimentos realizados para la intra-repetibilidad y la inter-reproducibilidad se utilizó el estadístico Kappa como queda descrito debidamente en la siguiente sección de análisis estadísticos utilizados.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico descriptivo e inferencial se utilizó SPSS Statistic Software version 22.0 (Armonk, NY, IBM Corp.). Para la estadística descriptiva se utilizaron frecuencias, descritas en porcentajes y números absolutos, y medias con desviaciones típicas.

Para el cálculo del LOD como resultado de la sensibilidad analítica de la prueba, se realizó un análisis de regresión probit y cálculo del valor C95, que se corresponde con la concentración detectable el 95% de las veces. Para ello se utilizó Microsoft® Excel, Versión 16.23, (Microsoft Corp.) para la obtención de los coeficientes para el ajuste de la ecuación de la recta de regresión, sobre la que calcular el C95.

Para el cálculo del nivel de acuerdo para los análisis de precisión (inter e intra-reproducibilidad) se calculó el estadístico Kappa (K).

Para la estadística inferencial se utilizó el Pearson's Chi-square (χ^2) para valorar las diferencias estadísticas potenciales entre variables cualitativas (distribución de genotipos, genotipo y sexo, hábitos de riesgo, localización de lesiones, tipo de lesiones y tratamientos previos). La prueba t-test fue utilizada para calcular diferencias de medias para la edad y el tiempo de evolución con otras variables.

Para todos los análisis estadísticos se estableció un intervalo de confianza del 95%.

La figura estadística de la distribución geográfica (ver [resultados](#)) se preparó mediante ploteado de los resultados del genotipo obtenido de las muestras con su origen geográfico mediante coordenadas geográficas en términos de altitud y latitud, utilizando para ello RStudio Version 1.4.1717 (RStudio Team (2021). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA, USA; URL <http://www.rstudio.com/>).

RESULTADOS

La muestra se compuso de un total de 120 sujetos, con un 51.9% hombres y 48.1% mujeres de una edad media de 22.7 ± 15.4 años (rango de 5 a 71 años) y un tiempo de evolución de las lesiones de 7.5 ± 16 meses de media (rango de 1 a 96 meses). La [figura 15](#) muestra datos de las lesiones plantares y la [tabla 10](#) muestra datos descriptivos de los hábitos de riesgo, los tratamientos previos y las localizaciones en el pie de las lesiones.



Figura 15 - Datos de lesiones plantares.

*Only one patient presented lesions on both feet.

Risk factor	Prior treatment	Location
None 73.8% (n=90)	None 89.5% (n=77)	Internal plantar arch 5.6% (n=5)
Indoor swimming pool 9% (n=11)	Nitric acid 5.8% (n=5)	Heel 22.5% (n=20)
Outdoor swimming pool 7.4% (n=9)	Cryotherapy 1.2% (n=1)	Plantar first toe 15.7% (n=14)
Gym 4.1% (n=5)	Surgery 1.2% (n=1)	Plantar second toe 1.1% (n=1)
Locker room 2.5% (n=3)	Keratolytic 2.3% (n=2)	Plantar fourth toe 3.4% (n=3)
Family history 3.3% (n=4)		Plantar fifth toe 4.5% (n=4)
		Plantar 1MH ^a 16.9% (n=15)
		Plantar 2MH 11.2% (n=10)
		Plantar 3MH 6.7% (n=6)
		Plantar 4MH 3.4% (n=3)

Tabla 10 - Hábitos de riesgo, tratamientos previos y localización de las lesiones.

a. (1-5) MH: (First-fifth) metatarsal head.

Método de detección de VPH Multiplex-PCR y validación.

Los resultados obtenidos tras el procesamiento de las muestras de estudio fueron de un total de 81.2% de muestras positivas (n=104) y de 18.8% (n=24) resultados negativos a los VPH tipos detectables.

Todos los resultados VPH negativos mostraron resultados β -Globina positivos en los ensayos de control interno.

Sensibilidad analítica

Los resultados de límite de detección para el par de primers que amplifican HPV-1 y para el par de primers que amplifican HPV-27 fue del orden de 10^4 y cuyos resultados tras el análisis probit se muestran en la [tabla 11](#) y [tabla 12](#) respectivamente.

LOD HPV-1

Concentration (copies/ μ l)	Log ₁₀ Concentration	% detected	Probit value	C95
10 ⁴	4.58	100	N/A	
19200	4.28	100	7.33	
9600	3.98	80	5.84	
5000	3.98	40	4.75	1.51x10⁴
10 ³	3.58	0	N/A	
10 ²	2.58	0	N/A	

Tabla 11 - Análisis probit y C95 para límite de detección para HPV-1.

N/A: Not applicable.

LOD HPV-27

Concentration (copies/ μ l)	Log ₁₀ Concentration	% detected	Probit value	C95
10 ⁴	4.58	100	N/A	
19200	4.28	87.5	6.15	
9600	3.98	87.5	6.15	
10 ³	3.58	50	5	8.69x10⁴
10 ²	2.58	50	5	
10	1.58	12.5	3.82	

Tabla 12 - Análisis probit y C95 para límite de detección para HPV-27.

Intra-repetibilidad e inter-reproducibilidad.

Los estudios de precisión mostraron unos resultados de “excelente acuerdo” (Very good) para los ensayos de repetición (intra-run assays) ($k=1.00$, $p<0.001$), y “buen acuerdo” (Good) para los ensayos de reproducibilidad entre laboratorios (inter-run assays) ($k=0.737$, $p<0.001$). La [tabla 13](#) muestra los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad y el nivel de acuerdo entre las pruebas.

Repeatability tests					
		Positive	Negative	Kappa ^b (95% CI)	p
Intra-run	Assay 1	6	14	1.00	<0.001
	Assay 2	6	14		
Inter-run	Assay 1	6	14	0.737	<0.001
	Assay 2	4	16		
TOTAL			N=20		

Tabla 13 - Intra e inter-reproducibilidad y nivel de acuerdo.

b. Value of k and strength of agreement: <0.20 Poor, 0.21 – 0.40, 0.41 – 0.60 Moderate, 0.61 – 0.80 Good, 0.81 – 1.00 Very good.

Distribución de genotipos.

El estudio de las secuencias de las muestras y el análisis de los genotipos resultó en que los tipos de VPH encontrados fueron HPV-1, HPV-2, HPV-27, HPV-57, HPV-4, HPV-63 HPV-65. El tipo más frecuente fue el HPV-1 (39.8%), seguido del HPV-27 (12.5%). La [tabla 14](#) muestra la frecuencia de genotipos en las muestras VPH positivas.

HPV type	%
HPV-1	39.8% (n=51)
HPV-27	12.5% (n=16)
HPV-2	10.2% (n=13)
HPV-57	7.8% (n=10)
HPV-65	5.5% (n=7)
HPV-4	4.7% (n=6)
HPV-63	0.8% (n=1)
Negative	18.8% (n=24)
TOTAL	100% 8n=128)

Tabla 14 - Frecuencias de genotipos de VPH.

La distribución de genotipos por zonas geográficas mostró asimetría de forma que el HPV-27, HPV-57 y HPV-2 fueron los más comunes en el norte de España, mientras que, en otras áreas geográficas, el HPV-1 y HPV-4 fueron los más frecuentes. El coeficiente de Pearson's χ^2 resultó en una diferencia estadísticamente significativa entre las áreas geográficas y los genotipos de VPH ($p < 0.001$). La [figura 16](#) muestra la representación mediante plot de la distribución de genotipos por zonas geográficas.

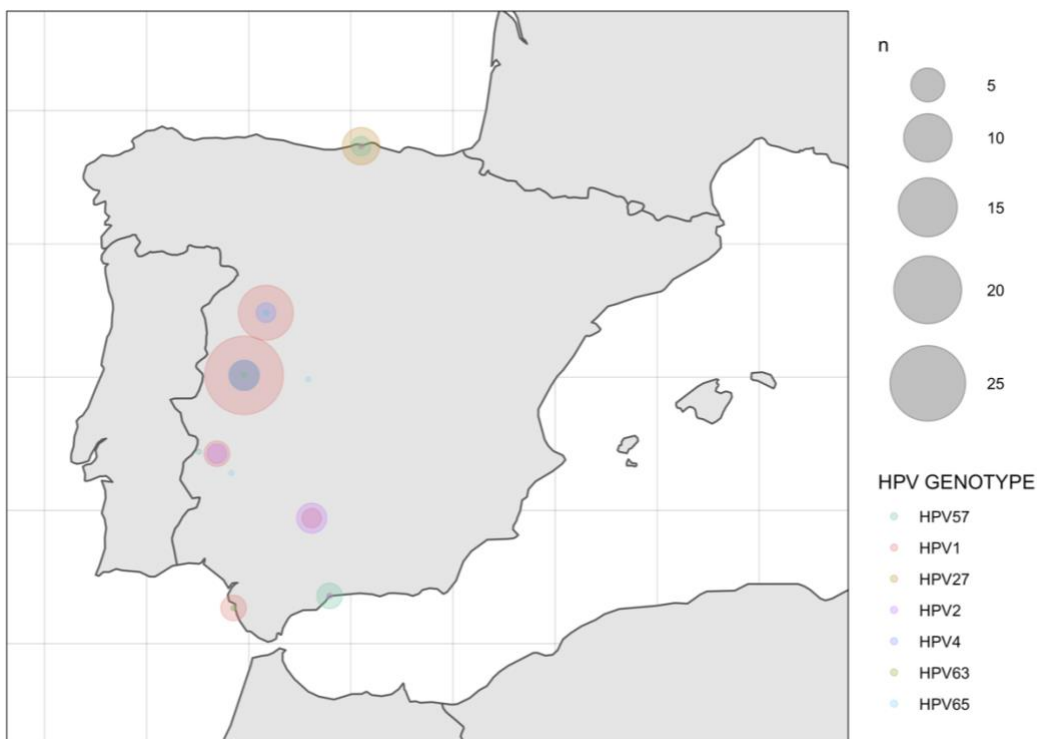


Figura 16 - Distribución geográfica de genotipos de VPH.

El análisis estadístico no mostró ninguna otra relación o dependencia de otras variables de estudio (sexo, edad, hábitos de riesgo, localización de la lesión, tipo de lesión, tiempo de evolución y tratamientos previos) con el genotipo de VPH que causa la lesión.

DISCUSIÓN

Previamente, se ha mostrado como conclusión en el [capítulo 2](#) que los profesionales de la Podología muestran un considerable porcentaje de errores diagnósticos cuando dependen únicamente del diagnóstico visual para lesiones plantares compatibles con infección por VPH, y esto puede tener una serie de consecuencias que conllevan establecer el tratamiento innecesario de lesiones que no están causadas por el virus, tratamientos insatisfactorios o cruentos y a un gasto económico importante a nivel asistencial que repercute en el paciente por las características que tiene la práctica privada de la podología en España.

En el estudio que se aborda en el presente capítulo, el 18.8% de las muestras incluidas en él, y cuyas lesiones contaban con signos y síntomas que las hacían caer en el diagnóstico de sospecha de lesión causada por VPH, resultaron ser negativas a los tipos VPH detectables por el método utilizado de multiplex-PCR. La implementación clínica de esta técnica como herramienta complementaria al diagnóstico clínico para verificar la infección, podría servir al profesional en la toma de medidas en este tipo de casos de resultados negativos, optando bien por un abordaje observacional de la evolución de la lesión o bien optar por llevar a cabo otros análisis que permitan establecer el diagnóstico diferencial una vez descartada la infección por VPH. Esto supondría una ventaja en el manejo clínico de las lesiones plantares y reduciría costes e inconvenientes al paciente.

El método de detección de VPH mediante multiplex-PCR empleado ha evidenciado una sensibilidad analítica entre $1.51 - 8.69 \times 10^4$ copias de los plásmidos dianas sintetizados en el 95% de las réplicas según los análisis de regresión probit. El resultado es óptimo, aunque difiere de otros obtenidos por Sasagawa et al (48) que observaron una sensibilidad analítica de detección de hasta 7.00×10^3 copias de ADN vírico. Esta discrepancia probablemente se deba a las diferencias en el protocolo utilizado en nuestro estudio, que incluye reactivos y diferencias en el proceso de

termociclado, así como en el abordaje del cálculo del LOD, dado que en nuestro caso se calcula a través del C95, mientras que en Sasagawa et al, optan por determinar el mínimo detectable, en su caso entorno a las 7000-9000 copias de ADN del VPH. Este es un dato que, por otro lado, sí es comparable con los mínimos detectados en nuestra muestra, dado que se dieron resultados positivos a concentraciones de entre 5000-9000 copias en alguno de los casos como puede observarse en la [tabla 11](#) y [tabla 12](#) de los experimentos de LOD, aunque no de forma consistente en el 95% de los casos. La literatura, por otra parte, no aporta unos límites considerados óptimos de sensibilidad analítica, sí existen datos para la sensibilidad clínica, por guías internacionales para la validación de ensayos de diagnóstico de VPH para cribados cervicales (144), pero por las características de las lesiones, no son comparables. En cualquier caso, para establecer que el nivel de sensibilidad analítico de la técnica estudiada de multiplex PCR para tipos de VPH que afectan a nivel cutáneo, incluyendo a las lesiones plantares, es óptimo, se necesitarán estudios posteriores en los que se determinen las cargas virales habituales de las lesiones, para poder establecer si las muestras a analizar caen dentro de los márgenes de detección de la prueba.

Por su parte, la técnica sí ha demostrado tener un excelente grado de acuerdo de repetibilidad en el mismo laboratorio y condiciones ($k=1.00$), que indica que los resultados son consistentes, así como un buen acuerdo entre-laboratorios ($k=0.737$), demostrando que la prueba es válida como herramienta diagnóstica y que sus resultados son altamente consistentes entre laboratorios y repeticiones de muestras. Los estrictos requerimientos de validación de pruebas de cribado para cáncer cervical propuestas por Meijer et al (144), estipulan un valor kappa de al menos 0.5 para 500 muestras con un 30% de testadas positivas. Aunque notablemente menor en tamaño de muestra, como valor de referencia, el valor kappa obtenido para los análisis intra e inter-laboratorio en nuestro estudio serían válidos. En relación a esto, los valores fallados en estos experimentos de precisión, como pueden observarse en la [tabla 13](#), podrían deberse a que dichas muestras se situaban por debajo del 20% del LOD

usadas para los experimentos de precisión, como sugiere la literatura (143), o bien a las diferencias de instrumentos entre ambos laboratorios, termociclador, pipeteado, y manejo entre otros factores posibles.

Además de los datos positivos de sensibilidad analítica y precisión de la prueba, cabe reseñar, que el uso de las escamas de la lesión han sido un tejido diana excelente para la obtención de ADN vírico, lo que supone una diferencia considerable con el método de obtención de muestras mediante resecado quirúrgico con láser propuesto por Sasagawa et al (48), puesto que ésta última, no es un abordaje óptimo para la obtención de muestras ante sospecha diagnóstica, debido a que la cara plantar del pie tiende a una cicatrización tórpida y compleja, y si el resultado es negativo, el resecado quirúrgico podría no haber sido el mejor abordaje clínico de la lesión. Por esta razón el uso de escamas es más adecuado para el diagnóstico y es tan efectivo como tejido para la obtención de ADN a concentraciones válidas como el uso de tejido biopsiado o resecado como queda concluido en un estudio por de Planell-Mas et al (131). Otros estudios que utilizan métodos de detección por PCR para verrugas cutáneas, incluidas las plantares, también utilizan tejido biopsiado, resultando en un problema similar de coste-beneficio para el paciente, aunque también está descrito el uso de hisopos para obtención de muestras (145-147). En este sentido, estudios recientes por García-Oreja et al (132), comparan los métodos de toma de muestra mediante hisopo y mediante el uso de escamas de piel, obteniendo buenos resultados en ambos y concluyendo que el uso de hisopos es igualmente válido y podría suponer mayor facilidad y rapidez de toma de muestras por parte de los profesionales de la salud implicados, por lo que puede ser un método a considerar en el futuro, aunque se requieren estudios que cuantifiquen el ADN extraído mediante uno u otro método para poder esclarecer cuál de ellos es más óptimos a nivel clínico y a nivel de laboratorio.

Estos datos muestran que la técnica de detección de multiplex PCR estudiada representa una opción válida como prueba complementaria para establecer diagnóstico diferencial en

casos con sospecha por lesiones producidas por VPH a nivel plantar. Sin embargo, existe margen de mejora. Aunque la toma de muestra pueda ser fácil, sencilla y rutinaria para los profesionales de la salud, existen otros factores a considerar. El método de detección de multiplex PCR requiere de un equipamiento técnico y de un entrenamiento del personal que realice esta prueba que puede suponer un coste económico por muestra en su implementación clínica que suponga una barrera en su solicitud y uso generalizado por los profesionales implicados. Por otra parte, el tiempo requerido para dar un resultado oscila en un mínimo entorno a las 8 horas, que supone una jornada laboral completa, por lo que a efectos prácticos es de un día. Teniendo en cuenta que la podología se desarrolla, nuevamente, en el ámbito privado, alargar la toma de decisiones de abordaje terapéutico podría llegar a suponer una pérdida del paciente si la instauración inmediata de tratamiento se utiliza como forma de fidelización a la consulta por haber costado parte o la totalidad de éste. No obstante, costear el precio de la prueba complementaria podría probablemente, funcionar como un mecanismo similar.

En base a esto, el estudio extensivo en mejoras en los métodos diagnósticos, podrían hacer que tanto el coste como la rapidez no se conviertan en variables que tener en cuenta a la hora de optar por utilizar estos métodos como prueba complementaria de forma rutinaria. Por esta razón, el estudio de la distribución de genotipos del virus puede proveer de datos de interés en la mejora de futuros métodos de diagnóstico, así como servir de base a nivel epidemiológico y de tratamientos.

El estudio de los genotipos cobra especial importancia en los cribados de cáncer cervical, entre otras entidades patológicas producidas por el virus, porque el hecho de que las lesiones estén producidas por uno u otro tipo tiene implicaciones relevantes en el pronóstico de las lesiones (11,21). En el caso de las verrugas cutáneas, el genotipo de VPH puede no tener un impacto tan significativo, aunque algunos autores han reportado diferencias en el curso clínico de las lesiones en función del tipo de VPH presente (62,148), razón que se suma a las existentes que justifiquen el

interés de estudiarlos para las lesiones plantares también, especialmente en los casos que sean recurrentes o cuando el tratamiento sea insatisfactorio.

Nuestros resultados revelaron siete tipos de VPH que afectaban las lesiones de las muestras de estudio, de los cuales, el tipo más común fue el HPV-1 (39.8%) seguido de HPV-27 con un 12.5% de frecuencia (ver [tabla 14](#)). Contrastando con estos resultados, De Planell-Mas et al describieron el HPV-57 como el tipo más frecuente en sus muestras con un 37.1%, seguido de HPV-27 (23.8%) y el HPV-1a (20.9%). Diferentes resultados fueron obtenidos por García-Oreja et al, que encontraron que el tipo más prevalente fue el HPV-2 seguido de HPV-19. Estos estudios se centraron en otras áreas geográficas de España diferentes a las nuestras, lo que sugiere y apoya la teoría de que algunos tipos pueden ser más frecuentes en unas áreas que en otras. Esto queda evidenciado con el resultado obtenido en nuestro estudio, mostrado en la [figura 16](#), donde, como muestra de la asimetría de distribución de genotipos, los tipos HPV-27 y HPV-57 son más frecuentes que el HPV-1 en el norte de España, mientras que en zonas centro-oeste del país, es este último el más frecuente, y estas diferencias se han evidenciado como estadísticamente significativas ($p < 0.001$). La distribución geográfica de genotipos de VPH se ha estudiado para los cribados cervicales, especialmente entre países occidentales y orientales, que muestran diferencias en los tipos de alto riesgo encontrados, lo que provee de fundamentos para adaptar las herramientas diagnósticas a las necesidades específicas y tipos comunes de cada sitio o incluso promueve la investigación en nuevas herramientas que puedan detectar un espectro más amplio de genotipos de VPH (133). Cabe mencionar, que uno de los casos de nuestra muestra fue excluido tras mostrar un resultado inconcluso que probablemente pudiera deberse a una infección múltiple por al menos dos tipos diferentes de VPH. En este sentido, se deberían explorar otros métodos en el futuro para investigar este tipo de casos que no quedan discernidos por la técnica estudiada por su naturaleza degenerada y multiplex. Así mismo, el tamaño de la muestra supone una limitación inherente a este estudio, dada la complejidad logística que conlleva. Por esta

razón, investigaciones futuras deben encaminarse a aumentar el tamaño muestral de forma que podamos arrojar evidencia que apoye estos resultados con respecto a la distribución genotípica del VPH plantar de manera más firme, así como estudiar los cursos clínicos para cada genotipo detectado de forma que se extraiga información clínica relevante que permita establecer diferentes manejos o abordajes en función del tipo que afecta a la lesión de los pacientes.

Describir los tipos de VPH presente en zonas específicas, supondrá una base sólida para el desarrollo de futuros tratamientos y técnicas de diagnóstico que se correspondan de forma más estrecha con el contexto de las infecciones por VPH a nivel plantar en esa localización específica, y esto permitirá el desarrollo de herramientas que detecten estos tipos más comunes de esa área particular. Este estudio ha evidenciado que la distribución genotípica del VPH plantar es asimétrica en las diferentes zonas estudiadas, siendo el HPV-1 y HPV-27 los tipos más comunes de forma generalizada. A su vez, el método de detección multiplex PCR se ha mostrado como una herramienta robusta para verificar la infección y que puede evitar el tratamiento innecesario de hasta un 18.8% de casos dudosos, con una excelente implementación clínica demostrando una buena reproducibilidad intra e inter-laboratorios. Nuevos estudios son necesarios para poner este tipo de técnicas diagnósticas al alcance de los profesionales de la salud de forma que el beneficio supere con satisfacción su coste.

CONCLUSIONES

1. El método de multiplex PCR estudiado se ha mostrado como idóneo para su implementación clínica incluyendo el uso de escamas de piel como origen de extracción de ADN vírico.
2. El método de detección multiplex PCR se ha evidenciado como válido en términos de sensibilidad analítica y reproducibilidad intra e inter-laboratorios.
3. La distribución geográfica y la prevalencia de genotipos de VPH de lesiones plantares se ha mostrado de forma asimétrica en las diferentes zonas estudiadas en España.
4. Los genotipos por VPH no muestran relación con otras variables sociodemográficas (sexo, edad) ni condicionantes inherentes al paciente y las lesiones como sus hábitos de riesgo, tiempo de evolución, localización y tipo de lesión o tratamientos previos.

CAPÍTULO IV

Desarrollo de una prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección y genotipado de VPH en lesiones plantares y su uso a partir de escamas de tejido lesional.

RESUMEN

La relativa dificultad de diagnóstico diferencial evidenciada para las lesiones plantares causadas por el virus del papiloma humano hace que sea necesario estudiar métodos diagnósticos que sirvan como pruebas complementarias para este tipo de infecciones. La detección de ADN viral se ha mostrado como un método eficaz, sin embargo, la realidad de la práctica podológica hace que este tipo de pruebas puedan ser difíciles de implementar en la rutina clínica, por su relativo coste, tiempo invertido y complejidad. Por este motivo la investigación en métodos moleculares que simplifiquen las tareas de detección del virus, y reduzcan tanto costes como tiempos cobra importancia. En esta tesitura, las amplificaciones isotérmicas se desmarcan como opciones válidas que cumplen estos criterios.

En el presente capítulo se explora el desarrollo de una amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop-mediated isothermal AMPlification, LAMP) como método de detección, para la reducción de tiempo y costes de diagnóstico de lesiones plantares producidas por VPH, y se analiza la posibilidad del uso de escamas de tejido lesional de forma directa como diana de la reacción.

Para ello se realizaron diferentes baterías de experimentos para establecer el grado de robustez de la prueba en comparación con el método de detección mediante PCR, así como el estudio de la carga viral de las muestras que sirve tanto como dato descriptivo como para evaluar el grado de adecuación de estas pruebas complementarias para el diagnóstico de las infecciones producidas por el virus. En base a estos experimentos, la LAMP se ha mostrado como una técnica eficaz que podría encajar en el paradigma de la práctica podológica.

Palabras clave: verruga plantar, VPH, amplificación isotérmica mediada por bucle, LAMP, pie.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular ha experimentado un importante crecimiento en la literatura científica y en su aplicabilidad clínica, permitiendo así obtener información rigurosa para la toma de decisiones en el ámbito de la salud, mejorar el manejo clínico de los pacientes e incluso suponen el inicio de cambios de paradigmas en el abordaje de patologías o de medicina personalizada (149). De hecho, desde sus inicios en la década de 1980 y el uso extendido de la PCR, la biología molecular en los contextos del diagnóstico microbiológico para enfermedades infecciosas ha tenido un desarrollo exponencial, llegando incluso a posicionarse como estándar de oro como ya quedó comentado en el capítulo anterior en el caso del SARS-CoV-2.

Parte de este crecimiento se debe a la innovación a nivel de reactivos y más aún en los equipos utilizados en la amplificación de ácidos nucleicos, pasando por ser incluso semiautomáticos. Estos procesos, además, han llevado a las técnicas moleculares a ser más rápidas, no sólo en la amplificación, pero también en la visualización de resultados mediante el uso de sondas fluorescentes que permitan la cuantificación simultánea y en tiempo real (qPCR), que en el caso de infecciones víricas permite, también, la cuantificación de la diana de amplificación, y por extensión de la carga viral (150). Sin embargo, esta expansión en la innovación de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos lleva apareado el aumento en costes físicos de material e infraestructura, así como requerir un entrenamiento de personal de laboratorio, lo que ha aumentado la presión por investigar recursos diagnósticos moleculares que trabajen de forma rápida, eficaz y con costes reducidos en términos de infraestructura y material, así como fáciles de implementar, especialmente para su uso en localizaciones en las que la infraestructura científico-clínica está limitada. Es en este contexto en el que surgen las amplificaciones isotérmicas como alternativa diagnóstica, que, por sus características, cumplen esta premisa de reducción de costes (150,151). Estos métodos funcionan a temperatura

constante, de forma que no se requiere el uso de un termociclador, el tiempo para la obtención de resultado también se reduce por esta misma razón y permiten la visualización de ese resultado de forma directa mediante precipitación, turbidez o cambio de color en el microtubo de reacción (151), lo que también reduce el uso de pasos extra para la obtención de un resultado de amplificación así como el material y equipamiento necesario para ello, como en el caso del uso de electroforesis en gel.

Entre estas técnicas de amplificación isotérmica, la técnica LAMP pone nombre a una amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop-mediated isothermal AMPlification). Esta técnica, se da a conocer en el año 2000 por Notomi et al (152) que cumple las expectativas nombradas anteriormente del beneficio de las técnicas de amplificación isotérmica, dado que podía desarrollarse en condiciones de un baño o termobloque, y una alta especificidad por el uso de hasta 6 *primers* simultáneamente. La dificultad inicial de esta técnica es el diseño de estos *primers*, dado que requieren el uso de herramientas bioinformáticas que aseguren que no se formen dímeros ni estructuras hibridantes entre ellos, ni que exista alineación con otras secuencias en el ADN diana.

Desde su popularización, la técnica LAMP ha sido utilizada por laboratorios de diagnóstico para múltiples enfermedades infecciosas, incluyendo las provocadas por virus, entre otros; los de la Hepatitis B y C, así como el SARS-CoV-2, MERS-CoV, VIH, Influenza virus, Zika virus mediante el uso de RT-LAMP (Reverse Transcription LAMP), además de infecciones provocadas por hongos y bacterias (153).

Teniendo en cuenta esta popularización a nivel investigador y de diagnóstico de enfermedades infecciosas, su uso para el VPH es así mismo extensible. La técnica LAMP ha sido utilizada para la detección y genotipado de VPH en carcinomas orofaríngeos de células escamosas (154), cánceres cervicales (155), así como en lesiones cutáneas producidas por VPH (156). Sin embargo, su optimización y uso para lesiones plantares no ha sido explotado en todo el potencial que podría tener en este tipo de lesiones, dado

que podría facilitar un diagnóstico rápido, eficaz, sensible y específico, y probablemente de bajo coste económico, por lo que es una técnica con gran valor de estudio en investigación del VPH a nivel plantar.

Fundamentos de la amplificación isotérmica mediada por bucle.

El funcionamiento esencial de la LAMP difiere poco a grandes rasgos de una amplificación convencional mediante PCR, en los términos en que se requiere un ADN diana y una enzima polimerasa que, mediante un procedimiento de extensión, creará nuevas hebras de la secuencia de estudio, que a su vez servirán de molde para nuevos alineamientos y extensiones en el proceso de amplificación.

Sin embargo, como brevemente explicado en la sección introductoria anterior, el mecanismo por el que amplifica los segmentos es notablemente diferente.

Los dos elementos claves que permite el funcionamiento de la técnica LAMP son el diseño de los pares de *primers* y la enzima *Bst* ADN polimerasa, que deriva del organismo *Geobacillus stearothermophilus* (anteriormente, *Bacillus stearothermophilus* (157), de ahí su abreviación) y que funciona de forma auto-ciclada, es decir, que los ciclos se producen sin necesidad de que la temperatura provoque la desnaturalización de las hebras, lo hace mediante la alta actividad de desplazamiento de las hebras que tiene la enzima. De esta forma la reacción puede desarrollarse en condiciones isotérmicas, es decir, sin variar la temperatura, habitualmente entre 60 y 65°C, que es la temperatura a la que la enzima tiene mayor rendimiento (151,152).

Por otra parte, los pares de *primers*, y especialmente su diseño, son los que, en conjunto con la enzima, dan como resultado el funcionamiento de la LAMP (151,152). Se diseñan entre 4 y 6 *primers*:

- Dos pares de *primers* exteriores, uno en sentido de lectura y otro reverso (forward and backward outer primers, F3 and B3).
- Dos pares de *primers* interiores, uno para cada sentido de las hebras complementarias (forward and backward inner primers, FIP and BIP).
- Adicionalmente, puede usarse de forma opcional un tercer par de *primers*, son los *primers* bucles o loop primers (LF, loop forward and LB, loop backward) también uno para cada sentido de las hebras, que cumplen la función de acelerar la reacción por incrementar el número de sitios de alineamiento en las estructuras artificiales creadas por los pares de *primers* anteriores, y aumentar la especificidad de la técnica, por actuar únicamente en esas mismas estructuras artificiales (153,158).

La concentración de cada par de *primers* en la reacción es diferente, FIP/BIP están más concentrados que F3/B3 para que estos últimos actúen de forma más medida y así se formen las estructuras de amplificación producidas por FIP/BIP en primer lugar (152).

La [figura 17](#) muestra una representación esquemática de los sitios de alineamiento de los *primers* en sus secuencias diana para cada una de las hebras.



Figura 17 - Representación esquemática de alineamiento de primers en una LAMP.

F3: Forward outer primer; F2+F1c= FIP: Forward inner primer; F1c: F1 complementary sequence; B3: Backward outer primer; B2+B1c=BIP: Backward inner primer; B1c: B1 complementary sequence. F1-F3: B1-B3 and F1-F3 are complementary sequences to each of the strands. LF: Loop Forward primer; LB: Loop backward primer.

Una vez los tubos de reacción con la *mix* que contiene, entre otros, el ADN diana, el set de primers y la enzima, se ponen en las condiciones isotérmicas para la amplificación, la reacción se sucede de la siguiente forma:

1) Alineamiento y extensión inicial.

El FIP alinea con la secuencia diana en la hebra invertida ($3' \rightarrow 5'$), y como se observa en la [figura 17](#), el FIP contiene así mismo una secuencia complementaria idéntica a una secuencia más interior hacia el extremo 5' de ese amplicón. Esto genera un bucle entre el comienzo 3' de ese amplicón y la secuencia interior complementaria cuando el nuevo amplicón es desplazado por la extensión mediada por desplazamiento del extremo 3' al que da comienzo el *primer* exterior F3. A este amplicón desplazado con un bucle en su extremo 3' también se alinea en su extremo 5' el BIP, que tras la extensión de la nueva copia, deshace el bucle 3' momentáneamente, hasta que, como sucede anteriormente con su correspondiente *forward*, el primer exterior B3 en el extremo 5' de esa nueva copia, da comienzo a una extensión por desplazamiento

de la hebra recién creada, y al desplazarla, genera bucles a ambos extremos de la cadena desplazada, creando una estructura en forma de mancuerna, o *dumbbell-like structure*, que es la estructura de inicio para los ciclos de amplificación en la LAMP (151). La [figura 18](#) sintetiza de forma visual la creación de ambos bucles para la creación de la estructura de inicio.

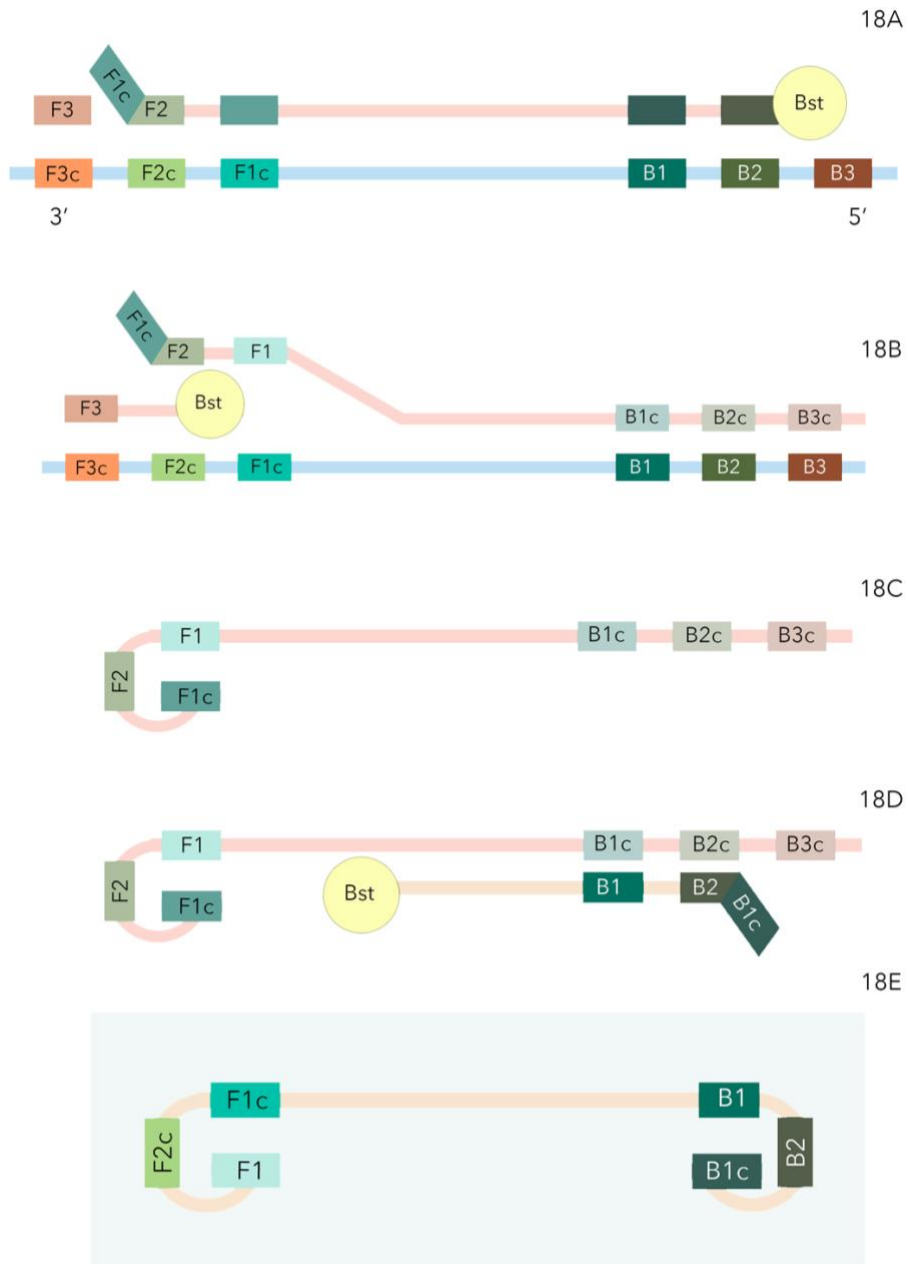


Figura 18 - Generación de la estructura de inicio LAMP.

- 18a: FIP annealing and extension of a new strand. Bst: Bst DNA polymerase.
 18b: F3 annealing and extension of a new strand with displacement of the previous one.
 18c: Complete displacement and creation of the self-hybridizing loop.
 18d: BIP annealing and extension of a new strand.
 18e: After displacing the new strand with the B3 annealing and extension (not shown, similar to 18b, but on the B3c end), creation of the dumbbell-like structure.

2) Ciclos de amplificación exponencial LAMP.

A partir de la estructura inicial de bucles comentada en el apartado anterior, surgen múltiples sitios de alineamiento.

Por una parte en el bucle 3' se inicia un alineamiento nuevamente del FIP y una extensión a partir de él, mientras que en el interior del amplicón molde, a partir de su propia estructura, la ADN polimerasa realiza una extensión que deshace el bucle 5' molde, hasta que por su desplazamiento genera el bucle nuevamente en ese extremo en el nuevo amplicón, continuando la extensión sobre la hebra recién creada, que desplazará la creada por el alineamiento en el bucle 3' del FIP, hasta que queda desplazada completamente formando una nueva estructura en forma de mancuerna y otra en forma replegada, con un único bucle en el extremo 5' que será objeto de alineamiento por los primers *backward*, que en los ciclos de amplificación posteriores, creará estructuras de bucles más complejas de diferentes tamaños y diferentes repeticiones alternadas (151,152). La [figura 19](#) muestra el resultado de las amplificaciones a partir de la estructura de inicio.

En el caso de uso de *Loop primers*, éstos actúan en el ciclo de amplificación exponencial alineándose a sitios en los bucles entre las secuencias F1 y F2 o entre B1 y B2 en cada uno de los bucles, lo que aporta una mayor cantidad de sitios de inicio para la amplificación previamente explicada (159). Además, permite que alguna de las estructuras de bucles complejos resultantes sigan funcionando como moldes, formando estructuras aún más complejas con hasta 6 bucles, a lo que se le da el nombre de estructuras en forma de coliflor (158,160). El uso de estos primers puede acelerar la reacción hasta la mitad de tiempo (159,160).

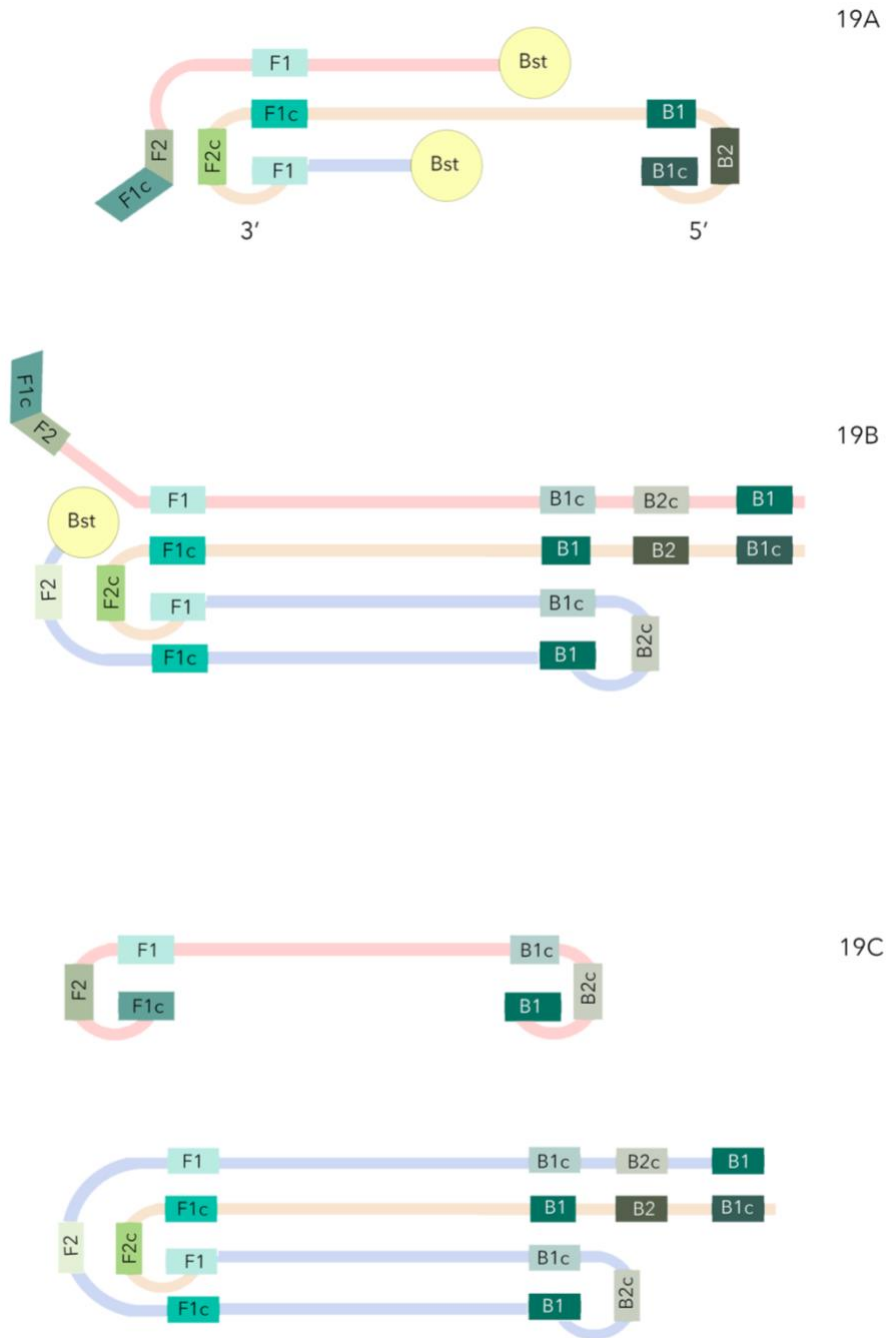


Figura 19 - Extensiones a partir de la estructura de inicio de bucles.

19a: FIP annealing to the 3' loop and extension of a new strand. Also, extension from the F1 site. Bst: Bst DNA polymerase.

19b: Displacement of the FIP extended strand by the extension of the F1 site strand.

19c: The two resulting structures from the simultaneous extension and displacement.

Resultados de la reacción de LAMP.

El resultado de la reacción de amplificación puede detectarse de diferentes formas. Por las características de la propia técnica, es posible visualizar el resultado mirando directamente el tubo de reacción en busca de turbidez o precipitación, como resultado de la acumulación de pirofosfato de magnesio como producto final de la reacción (151). La [figura 20](#) muestra un resultado de LAMP positivo detectado de esta forma.

Otra alternativa es procesar el resultado de la reacción mediante electroforesis en gel, que da como resultado diferentes bandas y una imagen en forma de barrido en caso de muestra positiva, generada por las estructuras de diferentes tamaños moleculares resultantes de la amplificación. Este método, sin embargo, puede alargar el tiempo de procesado, reactivos y, potencialmente, puede producir contaminación cruzada entre muestras, debido a la gran cantidad de amplicones resultantes (153). La [figura 20](#) muestra resultados positivos mediante electroforesis en gel junto a un resultado mediante comparación de turbidez en tubo.

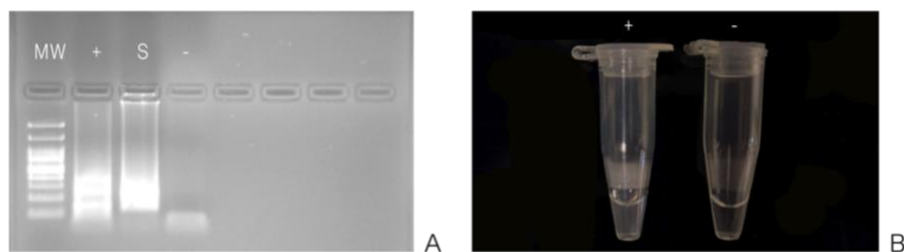


Figura 20 - Resultados positivos en gel de agarosa y detección directa visual por turbidez.

MW: molecular weight; +: positive control; S: Sample; -: Negative control.

A, on the left, represents the image taken by the gel imaging system from UV visualization with RedSafe™ staining dye and positive smeared bands for HPV on + and S well.

B, on the right, represents direct visualization of the microtubes after a LAMP reaction. Tube on the left shows a slight turbidity compared to the tube on the right which template is ddH₂O (negative control).

La detección mediante métodos que permiten tanto una visualización directa más fácil, así como la cuantificación, también es posible. Está descrita la detección colorimétrica o por fluorescencia, que permite discernir entre tubos de reacción positivos o negativos en base a un cambio de color o a su fluorescencia a través de luz UV. Algunos de estos colorantes son calceína, SYBR *green*, verde malaquita, azul de hidroxinaftol (153) o el uso de rojo fenol como indicador colorimétrico de cambio de pH en tubos de reacción positivos y negativos (161,162).

Bondades y limitaciones de la técnica LAMP.

Al comienzo de la introducción de este capítulo ya se describieron las ventajas fundamentales de las técnicas de amplificación isotérmicas, incluida la LAMP, entre las que se destacó la rapidez de obtención de resultados, la reducción de la necesidad de equipamiento y de los costes asociados, así como la sensibilidad y especificidad por el diseño de la técnica (150).

En el apartado anterior quedan descritas las alternativas de lectura de resultados, lo que también resulta ser una de las ventajas de la técnica, al poder llegar a reducir tanto en tiempo como en equipamiento, nuevamente, este paso de la detección molecular de ácidos nucleicos.

Sin embargo, cabe nombrar también que la enzima polimerasa *Bst* se resiste a las sustancias inhibidoras de la amplificación que sí afectan a otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como el caso de la PCR (160). Entre otras sustancias, la presencia de sangre, grandes cantidades de ADN o tejido, y otras impurezas, lo que permite que la enzima *Bst* pueda trabajar con muestras no purificadas, por lo que se puede llegar a ahorrar también el tiempo y material invertido en la extracción y purificación de ácidos nucleicos, como queda descrito en el uso de muestras directas de plantas y animales (160,163), así como en muestras humanas, incluido tejido imitando biopsia de OPSCC para la detección de VPH (154).

Por su parte, entre las limitaciones de la técnica, cabe nombrar la relativa dificultad en el diseño de las secuencias de *primers*, aunque, afortunadamente, las herramientas bioinformáticas disponibles facilitan esta tarea (164). Por otra parte, como ya se ha nombrado anteriormente también, el gran número de amplicones y las estructuras conformadas en la amplificación son altamente resistentes a la degradación, lo que convierten el resultado de estas amplificaciones isotérmicas en un potencial problema de contaminación cruzada si se abren los microtubos de reacción, por lo que requiere separar los procesos

en diferentes zonas de trabajo u optar por lectura de resultados que eviten la apertura de los microtubos. Para salvar este problema, también está descrito el uso de Uracil-N-glicosilasa en el *mix* de reacción que facilita la degradación de las estructuras (160).

Principalmente, la técnica gana en interés de estudio para el diagnóstico de infecciones producidas por VPH a nivel plantar. Las características de estas infecciones, y más especialmente el manejo clínico que se hace de ellas, requieren de un abordaje a nivel de pruebas complementarias que sea barato, eficaz y rápido, que son características que la técnica LAMP podría cumplir para este tipo de infecciones y que por tanto merezca ser explorada en la investigación de técnicas de diagnóstico.

OBJETIVOS

1. Determinar la carga viral de muestras de lesiones plantares causadas por VPH y comparar entre genotipos de VPH.
2. Realizar ensayos ciegos para determinar la robustez de la técnica LAMP comparada con los resultados de PCR y secuenciación.
3. Realizar un abordaje clínico de diagnóstico para determinar potenciales infecciones por múltiples tipos de VPH.
4. Optimizar el protocolo LAMP para su uso mediante escamas de piel lesional y comparar los resultados con el uso de ADN purificado.

MÉTODO

Consideraciones bioéticas.

El estudio cuenta con aprobación para su realización por parte de la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Extremadura, registrado bajo el número de registro 123/2018 ([Anexo I](#)) y cumple con los principios éticos de investigación médica con sujetos humanos según la Declaración de Helsinki y la legislación vigente en materia de investigación biomédica.

Los participantes fueron incluidos voluntariamente tras la firma del consentimiento informado ([Anexo II](#)).

El procesamiento y análisis de las muestras se desarrollaron en los laboratorios de University of Calgary Virology Group, Cumming School of Medicine, University of Calgary, (Calgary, AB, Canada).

Muestra y criterios de inclusión.

Los datos del presente capítulo hacen referencia a un total de 72 muestras de pacientes con sospecha clínica de lesiones plantares por virus del papiloma humano. La sospecha clínica se basó en la exploración dermatológica en busca de signos y síntomas compatibles con la infección por VPH (lesión circunscrita con interrupción de dermatoglifos que reproduce dolor al pellizco, y/o presencia de *pits* vasculares trombosados o sangrantes).

El procedimiento de obtención de la muestra siguió el mismo protocolo de obtención de muestra explicado para el [capítulo III](#) que, de forma resumida, consistió en la aplicación de etanol al 70% como antiséptico para la piel y al raspado con bisturí de forma paralela a la superficie de la piel, descartando la hiperqueratosis superficial reactiva, y obteniendo las escamas de piel más internas de la lesión, que, como explicado previamente,

supone un procedimiento rutinario en la exploración clínica de estas lesiones y prácticamente indoloro para el paciente.

Las muestras obtenidas para su estudio fueron mantenidas a -20°C para su análisis posterior.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- 3) Primera consulta o un tiempo de lavado desde el tratamiento anterior de 1 mes.
- 4) Consentir mediante firma de consentimiento informado a participar y ceder la muestra para su estudio.

Los criterios de exclusión fueron pacientes que no dieran su consentimiento, lesiones que estuvieran en proceso de tratamiento, lesiones en las que no fuera posible la obtención de la muestra por su tamaño o superficialidad.

Extracción de ADN.

El proceso de extracción siguió el mismo protocolo descrito en el [capítulo III](#), en la sección de extracción de ADN.

Como método de verificación del éxito de la extracción se realizó cuantificación estimativa del ADN mediante diluciones a diferentes concentraciones y carga en gel de agarosa, como se ha explicado en el mismo apartado, según protocolo 17 descrito por Sambrook y Green (141). En otros casos, en función de la disponibilidad, se realizó cuantificación de ADN mediante espectrofotómetro por microgota NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA).

Controles internos.

Se diseñaron plásmidos como controles positivos para los genotipos detectados para la técnica LAMP, así como para la construcción de la curva estándar para la cuantificación de la carga viral de las muestras.

Para su diseño se utilizó una secuencia diana de referencia del gen L1 para cada set de *primers* utilizados. La [tabla 15](#) contiene los genotipos con sus respectivos códigos de acceso al genoma de referencia, que fueron utilizados para el diseño. Estos plásmidos fueron sintetizados (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA) y resuspendidos en agua ultrapura a una concentración de entre 0.03693 μM y 0.06718 μM .

Genotype	Accession number
HPV-1	V01116
HPV-2	X55964
HPV-4	X70827
HPV-27	X74473
HPV-63	X70828
HPV-65	X70829

Tabla 15 - Relación de genotipos de referencia para el diseño de plásmidos de control positivo para LAMP.

Los plásmidos fueron transformados en células competentes de la bacteria *E. coli* DH5 α , para su producción y stock en términos de necesidad. El proceso de transformación consistió en el siguiente protocolo de choque térmico:

- a) Adición de 4 μl de plásmido en 30 μl de células DH5 α .
- b) Incubación en hielo durante 30 minutos.
- c) Choque térmico a 42°C por 40 segundos.
- d) Adición de 500 μl de medio LB inmediatamente.
- e) Incubación en movimiento horizontal de 225 rpm durante 1 hora a 37°C.
- f) Siembra en placas con medio LB y ampicilina.
- g) Incubación durante 18 horas a 37°C.

Tras el proceso de verificación del éxito de la transformación mediante PCR de colonias exitosas, dichas colonias se resembraron en cultivos líquidos LB y ampicilina en relación 1000:1 en movimiento de 225 rpm durante 18 horas a 37°C, y tras esto, la preparación del stock de células en glicerol en relación 1:1 y conservados de forma indefinida a -80°C.

Para el control negativo del método de detección de LAMP y para el control sin molde diana para la qPCR multiplex se utilizó agua ultrapura como molde.

Las muestras negativas fueron procesadas para la detección del gen de β -Globina humano para valorar la integridad del ADN, siguiendo el protocolo previamente descrito de controles internos del [capítulo III](#).

[Detección de ADN viral por multiplex PCR y secuenciación Sanger.](#)

La técnica utilizada como estándar para la detección del ADN viral con la que comparar los resultados obtenidos en el ensayo LAMP, fue la detección de VPH mediante el método multiplex PCR utilizado y validado en el [capítulo III](#), y cuyo protocolo puede consultarse en el apartado de Método de detección de VPH mediante PCR en dicho capítulo, y el procedimiento de secuenciación y análisis de las secuencias para genotipado puede consultarse en la sección de secuenciación y genotipado del mismo [capítulo III](#).

[Ensayos de cuantificación de la carga viral.](#)

Para la realización de experimentos de cuantificación de la carga viral de las muestras, se realizó qPCR utilizando el mismo set de *primers* utilizados para la detección de VPH mediante multiplex PCR y la Sso Advanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Mississauga, ON), siguiendo las instrucciones del fabricante para un volumen de reacción total de 10 μ l por triplicado para cada muestra.

La curva estándar se construyó en base a diluciones seriadas 1:10 de los plásmidos diseñados descritos anteriormente. El control negativo (no template control) fue agua ultrapura.

El protocolo de qPCR en Bio-Rad CFX96 qPCR Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., Mississauga, ON) consistió en:

- 1) Desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto.
 - 2) Desnaturalización a 95°C por 15 segundos.
 - 3) Alineamiento a 45°C por 30 segundos
 - 4) Extensión a 60°C por 30 segundos.
- | |
|----------------|
| X 45
ciclos |
|----------------|
- 5) Extensión final a 60°C por 30 segundos.
 - 6) *Melt curve* partiendo de 60°C hasta 99°C en incrementos de 0.5°C en intervalos de 0.05.

El cálculo del número de copias virales se realizó construyendo la curva estándar en base a las medias de los valores C_q para cada concentración seriada del plásmido, y, con esta curva, obtener el coeficiente R^2 y la ecuación de tendencia para obtener el logaritmo del número de copias virales para cada una de las muestras, para reconvertirlas al número real de copias. Si las muestras de ADN utilizadas como diana fueron diluidas, este número final se multiplicó por el factor de dilución para obtener la carga viral real. Para esta tarea de cálculo de la carga viral se utilizó Microsoft® Excel, Versión 16.23 (Microsoft Corp.).

Ensayos LAMP con ADN purificado.

Las reacciones LAMP se realizaron utilizando la Bst 2.0 WarmStart® DNA polymerase (New England Biolab, Whitby, ON) y el set de *primers* FIP/BIP y F3/B3 previamente descritos (156) para los tipos encontrados que afectan al pie potencialmente según el [capítulo III](#), en el subapartado de resultados, en la sección distribución de genotipos.

El volumen total de reacción fue de 25 μ l siguiendo las instrucciones del fabricante, y que incluía las siguientes concentraciones de primers y reactivos: 40 μ M de FIP/BIP, 5 μ M de F3/B3, 8mM de MgSO₄, 1.4 mM de cada dNTP y 0.5M de Betaína para incrementar y mejorar la amplificación de ADN.

El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial para el ADN a 95°C por 5 minutos, seguido de la adición al tubo de muestra de la mezcla de reactivos para la LAMP y la incubación a 65°C durante 1 hora, seguido de un paso de detención de la reacción sometiéndola a 80°C durante 5 minutos.

Los resultados fueron comprobados tanto de forma directa, de forma visual para observar potencial turbidez en el tubo de reacción, como realizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Burlington, MA, USA), a 100 V durante 20 minutos. Para la visualización de los geles, se transiluminaron con luz UV de 312 nm de longitud de onda y se fotografiaron con el sistema de adquisición de imágenes de geles Molecular Imager Versa Doc™ MP 5000 System (Bio-Rad Laboratories Inc., Mississauga, ON). Se consideró un resultado positivo cuando se dio una imagen en forma de columna barrida en el carril correspondiente en gel. En la [figura 20](#), previamente mencionada, se puede observar esta imagen de muestra positiva.

Estos ensayos LAMP fueron repetidos para cada set de *primers* de cada genotipo para todas las muestras de forma ciega al resultado obtenido por PCR y secuenciación, utilizada como técnica estándar para la evaluación de la robustez de la técnica mediante el análisis estadístico descrito en la sección posterior de ensayos LAMP con tejidos de escamas de piel.

Experimentos de abordaje de uso clínico de LAMP.

El abordaje de uso clínico de la LAMP consistió en pasar cada una de las muestras de pacientes por todos los sets de primers de forma simultánea en reacciones separadas siguiendo el mismo protocolo

explicado previamente para la LAMP. De esta forma, un resultado en forma de columna barrida indicará tanto un resultado positivo como el genotipo del virus de dicha muestra, al mismo tiempo que permitirá determinar potenciales casos de infecciones por múltiples tipos si este resultado se da en más de un carril de forma simultánea.

Ensayos LAMP con tejido de escamas de piel.

Para estos ensayos, las muestras de escamas de piel siguieron la siguiente preparación para su uso como molde para los ensayos de LAMP:

Se utilizaron 0.0015g de escamas de piel, que fueron inmersas en 30 μ l de ddH₂O en microtubos individuales para cada muestra, y machacadas con asas de siembra estériles seguido de un vórtex de 10 segundos y un paso de pre-calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Una vez hecho esto, 2.5 μ l de esta solución del tejido se añadió a los microtubos de reacción LAMP, para continuar con el mismo proceder descrito en la sección de ensayos LAMP con ADN purificado más arriba.

Para evaluar la robustez del uso del tejido de piel como diana del ensayo de amplificación LAMP, en el mismo experimento se procesó un tubo de reacción LAMP con ADN purificado de la misma muestra de tejido de forma simultánea.

Ensayos de sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica fue valorada mediante el cálculo del límite de detección (LOD) tanto para el ensayo LAMP como para su estándar de multiplex PCR para la detección de VPH de lesiones plantares. Para ello se adulteró ADN purificado de piel sana humana con distintas concentraciones seriadas de número de copias conocidas del plásmido diseñado para el HPV-1. De esta forma, se comprueba tanto el LOD como la potencial interferencia de ADN humano en los ensayos. Estos ensayos fueron realizados en réplicas durante 5 días.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó SPSS Statistic Software version 22.0 (Armonk, NY, IBM Corp.).

Para evaluar las potenciales diferencias entre las cargas virales y los genotipos se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

Para el cálculo de la robustez de la técnica LAMP se evaluó el nivel de acuerdo entre ésta y el estándar mediante el cálculo del estadístico Kappa (K).

Para el cálculo del LOD como resultado de la sensibilidad analítica de la prueba, se realizó un análisis de regresión probit y cálculo del valor C95. Para ello se utilizó Microsoft® Excel, Versión 16.23, (Microsoft Corp.) para la obtención de los coeficientes para el ajuste de la ecuación de la recta de regresión, sobre la que calcular el C95.

Para todos los análisis estadísticos se estableció un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Ensayos de la carga viral.

El estudio de la carga viral de las muestras aplicando el test de Kruskal-Wallis para muestras independientes mostró diferencias significativas a la hora de comparar estas cargas virales entre los diferentes genotipos ($p=0.002$). La [tabla 16](#) muestra las medias de carga viral para cada genotipo con significación estadística ($p=0.002$).

HPV type	n	Mean	Std deviation	p
HPV1	20	6,53E+10	8,01E+10	0.002
HPV2	3	1,06E+04	6,36E+03	
HPV4	5	1,76E+07	3,83E+07	
HPV27	4	9,10E+03	1,04E+04	
HPV65	5	4,41E+04	4,78E+04	

Tabla 16 – Medias de número de copias virales para cada genotipo.

Grado de confianza o robustez del ensayo LAMP

El estadístico Kappa para el cálculo del grado de acuerdo entre el ensayo LAMP y la combinación de PCR y secuenciación mostró muy buen grado de acuerdo. La [tabla 17](#) muestra el grado de acuerdo entre ambas técnicas ($p<0.001$).

LAMP vs. PCR+Sequencing agreement					
		Positive	Negative	Kappa ^b (95% CI)	p
Agreement assay	LAMP	27	38	0.842	<0.001
	PCR+Seq	28	37		
TOTAL			N=65		

Tabla 17 - Nivel de acuerdo entre LAMP y PCR+Secuenciación.

b. Value of K and strength of agreement: <0.20 Poor, 0.21 – 0.40, 0.41 – 0.60 Moderate, 0.61 – 0.80 Good, 0.81 – 1.00 Very good.

Abordaje de uso clínico del ensayo LAMP.

La PCR y secuenciación tuvo 4 resultados inconclusos, bien debidos a infecciones múltiples o bien a ruido de fondo en la secuenciación.

El ensayo LAMP es tipo-específico, por esta razón, al seguir el abordaje de uso clínico, los resultados inconclusos por PCR y secuenciación fueron resueltos, dando como resultado muestras HPV-1 positivas en todas ellas.

Así mismo el abordaje de uso clínico también permitió encontrar 2 muestras causadas por infección múltiple por HPV-1 y HPV-4, no detectadas por PCR y secuenciación. La [figura 21](#) muestra los hallazgos de resolución de un resultado inconcluso por LAMP (Figura 21a) y de detección de infección múltiple por LAMP (Figura 21b).

Robustez del uso de tejido como diana en la LAMP.

Los experimentos con tejido mostraron inconsistencias comparado con el uso de muestras de ADN purificado, resultando en un 50% (n=13) de resultados positivos en tejido de forma simultánea a sus correspondientes muestras de ADN purificado.

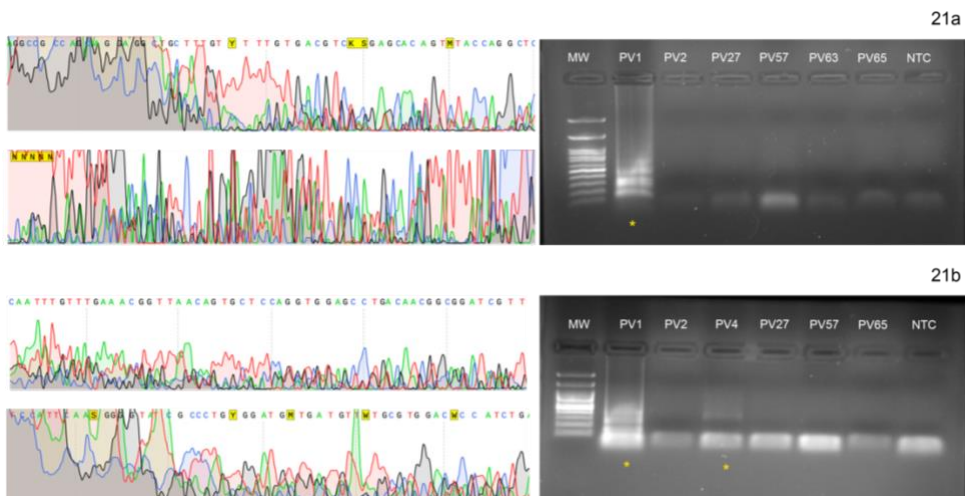


Figura 21 - Hallazgos para resultados inconclusos e infección múltiple.

*Positive results. MW: Molecular weight; PV1-65 (HPV type specific amplification); NTC: Non template control (negative control).

Fig. 21a: On the left, chromatogram data of one of the inconclusive results from the PCR+sequencing method to each of the set of primers used. On the right, it shows the LAMP result in agarose gel following the clinical approach, with an HPV-1 positive result.

Fig. 21b: On the left, chromatogram of one of the samples where multiple infection was undetected by PCR+sequencing. On the right, it shows the LAMP result following the clinical approach with an HPV-1 positive result and a faint but visible HPV-4 positive result.

Límite de detección.

El límite de detección para el ensayo de LAMP mediante diluciones 1:10 de ADN de tejido sano adulterado con concentraciones conocidas de plásmido resultó en un LOD (C95) de 2.46×10^3 copias de ADN viral. El LOD para la PCR multiplex resultó en 1.51×10^4 copias de ADN viral.

DISCUSIÓN

La confirmación diagnóstica de la infección por VPH en lesiones plantares se ha determinado como necesaria en los capítulos anteriores, llegando a reducir la incidencia de diagnósticos erróneos y, por extensión, de tratamientos insatisfactorios. La detección de ADN vírico que afecte a piel cutánea ha contado con cierto apoyo en la literatura científica con mayor o menor enfoque específico para las lesiones plantares (48,131), algunas centrándose en dilucidar métodos efectivos de toma de muestra (132). Junto con esto, los ensayos LAMP han ganado protagonismo en la literatura científica en los últimos años, especialmente en su uso como método de diagnóstico de infecciones en puntos de necesidad, entre otras muchas infecciones comentadas en la introducción de este capítulo, incluida la producida por SARS-CoV-2, habiéndose incluso posicionado como método validado para ello (138). Esto la convierte en una técnica conveniente para explorar en investigación para la detección de VPH, especialmente en infecciones plantares, dado que puede reducir significativamente el tiempo para determinar un resultado y ha demostrado ser una prueba robusta incluso con muestras no purificadas (154) y ha mostrado una buena sensibilidad y especificidad en verrugas cutáneas (156).

En el presente capítulo, el uso del ensayo LAMP para el diagnóstico y genotipado de lesiones plantares se puso a prueba para valorar su robustez como herramienta diagnóstica y analizar si el uso de las escamas de piel lesional podría servir como molde para la detección de VPH. Los resultados han mostrado un muy buen grado de acuerdo con el método utilizado como estándar, la PCR multiplex y secuenciación ($\kappa=0.842$, $p<0.001$), lo que la hace una prueba eficaz y robusta para su uso diagnóstico. Este resultado es positivo al compararlo con otros descritos para LAMP y PCR con secuenciación (156), sin embargo en ese mismo estudio de Wang et al las discrepancias encontradas entre ambos métodos, se estiman que estén debidas a la sensibilidad relativamente baja de la PCR y secuenciación que falla al detectar números de copias

bajas. Esta suposición queda apoyada por nuestros resultados obtenidos para el LOD, dado que el ensayo LAMP obtuvo un LOD de 2.46×10^3 copias comparado con las 1.51×10^4 copias de ADN viral que es detectada en el 95% de los casos con el método de PCR, una diferencia, que podría bien explicar la leve discrepancia de acuerdo entre ambos ensayos, probablemente en favor de la LAMP.

Así mismo, el ensayo LAMP también tuvo éxito en su uso en el abordaje clínico. La PCR y secuenciación, considerada el estándar de oro, en nuestra muestra no pudo resolver el genotipo de 4 muestras, que tuvieron que ser consideradas resultados inconclusos. Por su parte, la LAMP mediante el procesado de la misma muestra por todos los sets de primers simultáneamente de forma tipo-específica, pudo detectar y genotipar satisfactoriamente estos resultados inconclusos y detectar dos infecciones múltiples causadas por HPV-1 y HPV-4 que pasaron desapercibidas por el método de PCR y secuenciación (Figura 21). Esta característica y ventaja de la LAMP merece ser tenida en consideración, ya que está descrito que hasta un 6.6% de las verrugas cutáneas están causadas por infecciones múltiples, un 3.1% si hablamos de forma específica para las lesiones plantares (165), por lo que a la hora de acercarse a un genotipado preciso, el abordaje tipo-específico de la LAMP podría ser de mayor utilidad que la PCR multiplex y secuenciación, que no es tipo-específica.

El genotipado es un procedimiento indudablemente clave en el diagnóstico de infección por VPH en OPSCC, cáncer cervical y otras lesiones de progresión cancerosa, con implicaciones en el pronóstico de estas lesiones (21,166). Sin embargo, el genotipado en lesiones cutáneas, y específicamente en lesiones plantares, ha sido prácticamente anecdótico, a pesar de los hallazgos de tipos de alto riesgo en verrugas de pacientes inmunocompetentes (147,167), y a pesar de la existencia de evidencia limitada que describe que diferentes tipos de VPH parecen tener respuestas diferentes a las opciones de tratamiento (34). En base a esto, tanto la PCR y secuenciación como la LAMP detectan de forma eficaz el genotipo de las muestras de lesiones plantares, no obstante, la

LAMP es más efectiva en términos de tiempo, dado que logra obtener un resultado positivo entre 4 y 6 horas para la LAMP con ADN purificado como molde, o incluso en menos de 3 horas en el caso del uso de la LAMP con tejido de escamas lesionales directamente, en comparación con el resultado obtenido mediante multiplex PCR que requiere entre 6 y 8 horas, más el tiempo requerido para obtener el resultado de la secuenciación, que puede llegar a alargar el resultado final varios días. Esto muestra una significativa reducción del tiempo necesario para un resultado con el uso de la LAMP y el uso de escamas de tejido. Esta reducción de tiempo es esencial para su futura implementación en el entorno clínico, dado que la mayor parte de la práctica de la podología en España necesita ser rápida y eficiente bajo el paradigma de no ser un servicio incluido en la cartera del sistema de sanidad pública. Pese a esto, el ensayo de LAMP estudiado en este capítulo no se posicionó como un ensayo consistente en los resultados obtenidos con el uso de las escamas de tejido lesional en comparación con el ADN purificado, con tan sólo un 50% de muestras VPH positivas detectadas de forma simultánea. Este resultado podría explicarse por una diferencia de disponibilidad de ADN viral en los tubos de reacción con tejido lesional, de forma que esta cantidad quedase por debajo del LOD del ensayo de la LAMP en alguno de esos casos.

Otro dato importante extraíble de los resultados es que parece existir una diferencia en la carga viral en función del tipo de VPH que afecta la lesión plantar, con las mayores cargas virales encontradas para el HPV-1 y HPV-4 con medias de 6.53×10^{10} and 1.76×10^7 copias de ADN viral respectivamente, y el genotipo con menor carga viral fue el HPV-27 con una media de 9.10×10^3 con diferencias estadísticamente significativas entre los tipos estudiados ($p=0.002$). La literatura científica parece ser escasa al respecto, con tan sólo algunos hallazgos que hipotetizan que en algunos casos de infecciones múltiples, uno de los tipos parece tener mayor carga viral que el otro (168). Estos resultados de este capítulo pueden servir como punto de partida para investigaciones futuras que consideren el tipo de VPH y su carga viral en la prognosis de las lesiones o la incidencia de lesiones recalcitrantes. Posiblemente, la diferencia encontrada también pueda tener un

efecto potencial en las diferencias encontradas a las respuestas a tratamientos según diferentes tipos de VPH que afectan a lesiones plantares como ya se ha comentado anteriormente, según la literatura (67). Además, en el [capítulo III](#), en el apartado de discusión, se deja entrever la necesidad de estudiar la carga viral de los genotipos que afectan a las lesiones plantares para, de esta forma, poder esclarecer si el LOD de la técnica estudiada, la multiplex PCR, estaba dentro de los márgenes de cargas virales habituales para cada tipo. El LOD (C95) de la multiplex PCR en ese mismo capítulo fue de $1.51 - 8.69 \times 10^4$ copias de ADN viral, con posibilidad ocasional de detectar entre 5000-9000 copias. En base a ese resultado, y teniendo en cuenta las cargas virales detectadas para los genotipos encontrados en el estudio de este capítulo, la multiplex PCR no tendría problema para detectar de forma habitual lesiones causadas por HPV-1 y HPV-4, sin embargo, algunas lesiones producidas por HPV-27, podrían no ser detectadas por este método, dado que la media de cargas virales para las lesiones causadas por este tipo de VPH está por debajo del LOD C95 de la multiplex PCR. En este sentido, la LAMP con su LOD, así como por su diseño tipo-específico, podría llegar a tener más éxito de detección, potencialmente.

Este estudio, ha evidenciado que la técnica LAMP es una herramienta eficaz y robusta para la detección y genotipado de VPH causante de lesiones plantares, y que es capaz de reducir significativamente el tiempo y costes asociados para dar un resultado positivo, incluso con el uso de escamas de pie como molde, aunque estudios de optimización para esto último son aún requeridos en el futuro. Así mismo, son necesarios estudios que faciliten la lectura de resultados de la LAMP, bien mediante detección directa o mediante colorimetría, algo que en el presente estudio también ha mostrado inconsistencias, que permita ahorrar tiempo y reactivos necesarios para confirmación en gel de agarosa, el cual ha sido usado como método de comprobación en este estudio de forma rutinaria.

Todo esto podría ayudar a abaratar las herramientas de diagnóstico complementario, y hacerlas más útiles para la realidad

de la práctica podológica en España, si bien, el ejercicio de implementación como prueba complementaria, debe pasar también por hacerla extensible a los profesionales de atención primaria, de forma que conozcan las ventajas de la confirmación del diagnóstico, decantándose por la derivación a servicios de podología que hayan asumido el uso de test complementarios como parte de la rutina de diagnóstico de las lesiones plantares.

CONCLUSIONES

1. La carga viral de las lesiones plantares causadas por VPH se determina entre 6.53×10^{10} y 9.10×10^3 copias de ADN viral, mostrando diferencias significativas entre los genotipos encontrados.
2. La técnica LAMP se ha mostrado como robusta, con un muy buen grado de acuerdo con la técnica de multiplex PCR, elegida como estándar y con un límite de detección óptimo para la detección de los genotipos encontrados.
3. El abordaje de uso clínico de la LAMP permite identificar genotipos inconclusos, así como infecciones múltiples por diferentes genotipos.
4. El uso de escamas de tejido lesional como molde diana para la LAMP es posible, reduciendo el tiempo de obtención de resultados de forma considerable, aunque requiere optimización para adecuarse a los resultados obtenidos con ADN purificado.

GENERAL CONCLUSIONS

1. Plantar lesions count with scarce literature on diagnostic tools compared to other lesions caused by HPV. Among the possible diagnostic methods, with most of the research focused on visual diagnosis, whether directly or aided, the methods worth exploring are DNA detection methods for their sensitivity, specificity, and overall performance.
2. The need for differential diagnosis for plantar warts caused by HPV has been shown to be evident among podiatrists, that have difficulty differentiating plantar lesions and other similar dermatological conditions when relying merely on visual diagnosis, being easier with years of experience.
3. Multiplex PCR is a method that works efficiently in clinical setting, that can reduce up to 18.8% of the treatments that would be implemented for lesions that are not caused by HPV, with good sensitivity and overall analytical performance.
4. Geographical genotype distribution seems to be asymmetrical, with differences between with the prevalence of HPV types found in the north of Spain where HPV-27 and HPV-57 are more frequent than HPV-1, which is the most frequent type in other geographical areas.
5. The use of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a tool to improve the molecular diagnosis of HPV in plantar warts has proved to reduce the costs and the time needed to give a reliable result, especially when using skin tissue as a template for the reaction, making the assay a worthy candidate as a complementary test for implementation in podiatric clinical setting.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Las lesiones plantares cuentan con escasa literatura sobre herramientas diagnósticas en comparación con otras lesiones causadas por el VPH. Entre los posibles métodos de diagnóstico, con la mayor parte de la investigación centrada en el diagnóstico visual, ya sea directo o indirecto, tienen especial interés los métodos de detección de ADN por su sensibilidad, especificidad y rendimiento general.
2. Se ha demostrado que la necesidad de un diagnóstico diferencial de las verrugas plantares causadas por el VPH es evidente entre los podólogos, que tienen dificultad para diferenciar las lesiones plantares de otras afecciones dermatológicas similares cuando se basan únicamente en el diagnóstico visual y que los años de experiencia facilitan la identificación.
3. La multiplex PCR es un método que funciona de manera eficiente en el ámbito clínico, que puede reducir hasta un 18.8% de los tratamientos que fueran implantados para lesiones que no son causadas por el VPH, con buena sensibilidad y rendimiento analítico general.
4. La distribución geográfica de genotipos parece ser asimétrica, con diferencias entre la prevalencia de los tipos de VPH que se encuentran en el norte de España, donde el VPH-27 y el VPH-57 son más frecuentes que el VPH-1, que es el tipo más frecuente en las otras áreas geográficas exploradas.
5. El uso de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) como herramienta para mejorar el diagnóstico molecular del VPH en las verrugas plantares ha demostrado reducir los costes y el tiempo necesario para dar un resultado fiable, especialmente cuando se utiliza tejido cutáneo como molde para la reacción, lo que hace que el ensayo sea un candidato digno como prueba

complementaria para su implementación en el entorno clínico podológico.

REFERENCIAS

1. Griffiths CEM, Barker J, Bleiker T, Chalmers RJG, Creamer D, Rook GA, editores. Rook's textbook of dermatology. Volume 4. Ninth edition. Chichester, West Sussex Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc; 2016. 1 p.
2. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin N Am.* agosto de 2017;25(3):283-9.
3. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2015.
4. Kim Y, Lim KM. Skin barrier dysfunction and filaggrin. *Arch Pharm Res.* enero de 2021;44(1):36-48.
5. Vlahovic TC, Khan MT. The Human Papillomavirus and Its Role in Plantar Warts. *Clin Podiatr Med Surg.* julio de 2016;33(3):337-53.
6. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* febrero de 2018;47:2-13.
7. International Agency for Research on Cancer, editor. Human papillomaviruses: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 15 - 22 February 2005. Lyon: IARC; 2007. 670 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans).
8. Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL. Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol.* 16 de marzo de 2001;307(1):173-82.

9. Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND, Zhao R, et al. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* 26 de octubre de 2007;282(43):31803-11.
10. Guan J, Bywaters SM, Brendle SA, Ashley RE, Makhov AM, Conway JF, et al. Cryoelectron Microscopy Maps of Human Papillomavirus 16 Reveal L2 Densities and Heparin Binding Site. *Struct Lond Engl* 1993. 7 de febrero de 2017;25(2):253-63.
11. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* junio de 2004;324(1):17-27.
12. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology.* octubre de 2013;445(1-2):80-98.
13. Ilahi NE, Bhatti A. Impact of HPV E5 on viral life cycle via EGFR signaling. *Microb Pathog.* febrero de 2020;139:103923.
14. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol.* 21 de enero de 2020;10:3116.
15. Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular pathways and targets. *Curr Probl Cancer.* marzo de 2018;42(2):161-74.
16. Klingelhutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology.* marzo de 2012;424(2):77-98.
17. Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, et al. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Res.* 4 de enero de 2017;45(D1):D499-506.

18. Gong Y, Sui L, Li Y. Recombination in Papillomavirus: Controversy and Possibility. *Virus Res.* junio de 2022;314:198756.
19. Patiño-Galindo JÁ, Filip I, Rabadan R. Global Patterns of Recombination across Human Viruses. *Mol Biol Evol.* 19 de mayo de 2021;38(6):2520-31.
20. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Battistuzzi FU, editor. *Mol Biol Evol.* 25 de junio de 2021;38(7):3022-7.
21. Burd EM, Dean CL. Human Papillomavirus. Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, Tang YW, editores. *Microbiol Spectr.* 12 de agosto de 2016;4(4):4.4.18.
22. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine.* noviembre de 2012;30:F55-70.
23. Huang S, Wu JH, Lewis DJ, Rady PL, Tyring SK. A novel approach to the classification of epidermodysplasia verruciformis. *Int J Dermatol.* noviembre de 2018;57(11):1344-50.
24. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 2009;12(5-6):281-90.
25. Chalkia AK, Derdas S, Bontzos G, Sourvinos G, Detorakis ET. Non-invasive detection of HPV DNA in exfoliative samples from ophthalmic pterygium: a feasibility study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* enero de 2018;256(1):193-8.
26. Adjeso T, Siale E, Agyeman YN, Owusu-Afriyie O. Ear canal papilloma in a 20 year old Ghanaian male. *J Med Biomed Sci.* 30 de mayo de 2016;5(1):32-5.

27. Chouhy D, Kocjan BJ, Staheli JP, Bolatti EM, Hošnjak L, Sagadin M, et al. Detection of novel Betapapillomaviruses and Gammapapillomaviruses in eyebrow hair follicles using a single-tube «hanging droplet» PCR assay with modified pan-PV CODEHOP primers. *J Gen Virol.* enero de 2018;99(1):109-18.
28. Witchev DJ, Witchev NB, Roth-Kauffman MM, Kauffman MK. Plantar Warts: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *J Am Osteopath Assoc.* 1 de febrero de 2018;118(2):92.
29. Meyers J, Ryndock E, Conway MJ, Meyers C, Robison R. Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants. *J Antimicrob Chemother.* 1 de junio de 2014;69(6):1546-50.
30. Aksoy P, Gottschalk EY, Meneses PI. HPV entry into cells. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017;772:13-22.
31. Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses.* 20 de febrero de 2021;13(2):321.
32. Mateos-Lindemann ML, Pérez-Castro S, Rodríguez-Iglesias M, Pérez-Gracia MT. Diagnóstico microbiológico de la infección por virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* noviembre de 2017;35(9):593-602.
33. Viladot Voegeli A. Anatomía funcional y biomecánica del tobillo y el pie. *Rev Esp Reumatol.* 2003;30(9):469-77.
34. Hogendoorn GK, Bruggink SC, de Koning MNC, Eekhof JAH, Hermans KE, Rissmann R, et al. Morphological characteristics and human papillomavirus genotype predict the treatment response in cutaneous warts. *Br J Dermatol.* enero de 2018;178(1):253-60.

35. Rogers HD, MacGregor JL, Nord KM, Tyring S, Rady P, Engler DE, et al. Acquired epidermodysplasia verruciformis. *J Am Acad Dermatol.* febrero de 2009;60(2):315-20.
36. Kalińska-Bienias A, Kowalewski C, Majewski S. The EVER genes – the genetic etiology of carcinogenesis in epidermodysplasia verruciformis and a possible role in non-epidermodysplasia verruciformis patients. *Adv Dermatol Allergol.* 2016;2:75-80.
37. Korecka K, Wiśniewska-Szymańska A, Mikiel D. The impact of systemic psoriasis treatments on human papillomavirus activation and propagation. *Australas J Dermatol.* agosto de 2022;63(3):293-302.
38. Silverberg JI, Silverberg NB. The US Prevalence of Common Warts in Childhood: A Population-Based Study. *J Invest Dermatol.* diciembre de 2013;133(12):2788-90.
39. van Haalen FM, Bruggink SC, Gussekloo J, Assendelft WJJ, Eekhof JAH. Warts in primary schoolchildren: prevalence and relation with environmental factors. *Br J Dermatol.* julio de 2009;161(1):148-52.
40. Essa N, Saleh MA, Mostafa RM, Taha EA, Ismail TA. Prevalence and factors associated with warts in primary school children in Tema District, Sohag Governorate, Egypt. *J Egypt Public Health Assoc.* diciembre de 2019;94(1):6.
41. Dardet JP, Blasingame NP, Okpare D, Leffler L, Barbosa P. Plantar Verrucae in Human Immunodeficiency Virus Infection: 25 Years of Research of a Viral Coinfection. *Clin Podiatr Med Surg.* abril de 2020;37(2):317-25.
42. Augustin M, Herberger K, Hintzen S, Heigel H, Franzke N, Schäfer I. Prevalence of skin lesions and need for treatment in a cohort of 90 880 workers. *Br J Dermatol.* octubre de 2011;165(4):865-73.

43. Hansen I, Augustin M, Schäfer I, Mohr N. Epidemiology of skin diseases in Germany: systematic review of the current state of research – part 3: infectious skin diseases. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* mayo de 2022;20(5):589-95.
44. Zhu P, Qi R, Yang Y, Huo W, Zhang Y, He L, et al. Clinical guideline for the diagnosis and treatment of cutaneous warts (2022). *J Evid-Based Med.* septiembre de 2022;15(3):284-301.
45. Cardoso JC, Calonje E. Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* septiembre de 2011;20(3):145-54.
46. Egawa K, Iftner A, Doorbar J, Honda Y, Iftner T. Synthesis of Viral DNA and Late Capsid Protein L1 in Parabasal Spinous Cell Layers of Naturally Occurring Benign Warts Infected with Human Papillomavirus Type 1. *Virology.* marzo de 2000;268(2):281-93.
47. Hogendoorn GK, Bruggink SC, Hermans KE, Kouwenhoven STP, Quint KD, Wolterbeek R, et al. Developing and validating the Cutaneous WARTS (CWARTS) diagnostic tool: a novel clinical assessment and classification system for cutaneous warts. *Br J Dermatol.* febrero de 2018;178(2):527-34.
48. Sasagawa T, Mitsuishi T. Novel polymerase chain reaction method for detecting cutaneous human papillomavirus DNA. *J Med Virol.* enero de 2012;84(1):138-44.
49. de Planell-Mas E, Martínez-Garriga B, Zalacain AJ, Vinuesa T, Viñas M. Human papillomaviruses genotyping in plantar warts: HPV Typing in Plantar Warts. *J Med Virol.* mayo de 2017;89(5):902-7.
50. Zalacain A, Ogalla JM, García-Patos Briones V. Atlas y sinopsis de enfermedades cutáneas del pie. Barcelona: Edikamed; 2008.

51. Li L, Iwamoto S, Jisun Cha, Falanga V. Diabetic Foot Ulcer Calluses Show Histological Similarities to HPV Infection Without Evidence of HPV Involvement by Nested PCR. *Int J Low Extrem Wounds*. junio de 2010;9(2):84-9.
52. Peccerillo F, Zambito Spadaro F, Fabrizi G, Feliciani C, Pagliarello C, Stanganelli I. Not a simple plantar wart: a case of tungiasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. marzo de 2018;32(3):e113-4.
53. Dunnihoo ME, Kitterman RT, Tran D. Angiokeratoma presenting as plantar verruca: a case study. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2010;100(6):502-4.
54. Gordon DK, Ponder EN, Berrey BH, Kubik MJ, Sindone J. Verrucous carcinoma of the foot, not your typical plantar wart: a case study. *Foot Edinb Scotl*. junio de 2014;24(2):94-8.
55. Gara S, Zaouak A, Brahim EB, Jouini R, Fenniche S, Hammami H. Acquired Digital Fibrokeratoma of the Toe. *J Am Podiatr Med Assoc*. 15 de diciembre de 2021;111(6).
56. Firestone L, Mirkin G, Hao X. Molluscum Contagiosum on the Sole of the Foot in an Elderly Patient: A Case Report. *Am J Case Rep*. 17 de septiembre de 2020;21:e923777.
57. Bruggink SC, Eekhof JAH, Egberts PF, van Blijswijk SCE, Assendelft WJJ, Gussekloo J. Natural Course of Cutaneous Warts Among Primary Schoolchildren: A Prospective Cohort Study. *Ann Fam Med*. 1 de septiembre de 2013;11(5):437-41.
58. Lipke MM. An Armamentarium of Wart Treatments. *Clin Med Res*. 1 de diciembre de 2006;4(4):273-93.
59. Li X, Gao XH, Jin L, Wang Y, Hong Y, McHepange UO, et al. Local hyperthermia could induce migrational maturation of Langerhans cells in condyloma acuminatum. *J Dermatol Sci*. mayo de 2009;54(2):121-3.

60. Huo W, Gao YL, Wang HY, Bi GJ, Qiao S, Cai YF, et al. Local Hyperthermia Versus Cryotherapy for Treatment of Plantar Warts: A Prospective Multi-centre Non-randomized Concurrent Controlled Clinical Trial. *Acta Derm Venereol.* 28 de febrero de 2022;102:adv00655.
61. Padilla España L, del Boz J, Fernández Morano T, Arenas Villafranca J, de Troya Martín M. Topical cidofovir for plantar warts: Topical cidofovir for plantar warts. *Dermatol Ther.* marzo de 2014;27(2):89-93.
62. Kumar P, Dar L, Saldiwal S, Varma S, datt Upadhyay A, Talwar D, et al. Intralesional Injection of *Mycobacterium w* Vaccine vs Imiquimod, 5%, Cream in Patients With Anogenital Warts: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 1 de octubre de 2014;150(10):1072.
63. Skinner RB. Imiquimod. *Dermatol Clin.* abril de 2003;21(2):291-300.
64. Basavarajappa S, Subramaniyan R, Dabas R, Lal S, Janney M. A comparative study of topical 5% 5-fluorouracil with needling versus 30% trichloroacetic acid with needling in the treatment of plantar warts. *Indian Dermatol Online J.* 2021;12(3):412.
65. Schimmel J. Needling for the Treatment of Warts. *Skinmed.* 2020;18(2):91-3.
66. Grussendorf-Conen E -I., Jacobs S. Efficacy of Imiquimod 5% Cream in the Treatment of Recalcitrant Warts in Children. *Pediatr Dermatol.* mayo de 2002;19(3):263-6.
67. Bruggink SC, Gussekloo J, de Koning MNC, Feltkamp MCW, Bavinck JNB, Quint WGV, et al. HPV type in plantar warts influences natural course and treatment response: Secondary analysis of a randomised controlled trial. *J Clin Virol.* julio de 2013;57(3):227-32.

68. Koskinen AI, Hemminki O, Försti A, Hemminki K. Incidence and survival in oral and pharyngeal cancers in Finland and Sweden through half century. *BMC Cancer*. 2 de marzo de 2022;22(1):227.
69. Viariso D, Gissmann L, Tommasino M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. *Curr Opin Virol*. octubre de 2017;26:56-62.
70. PRISMA-P Group, Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev*. diciembre de 2015;4(1):1.
71. Kofler B, Borena W, Manzl C, Dudas J, Wegscheider AS, Jansen-Dürr P, et al. Sensitivity of tumor surface brushings to detect human papilloma virus DNA in head and neck cancer. *Oral Oncol*. abril de 2017;67:103-8.
72. Oliver JD, Patel NS, Ekbom DC, Stokken JK. Novel synchronous nasal involvement of inverted papilloma and recurrent respiratory papillomatosis with confirmed human papillomavirus isolated from nasal septum and middle turbinate: a case report. *J Med Case Reports*. 15 de julio de 2019;13(1):215.
73. Becelli R, Matarazzo G. Nasal Papilloma due to HPV 11 infection. *Clin Ter*. 2019;170(2):e84-5.
74. Mamaeva T, Mehlum CS, Davidsen JR. Recurrent respiratory papillomatosis with lower airway involvement in a young woman. *Eur Clin Respir J*. 2020;7(1):1740567.
75. Wu Y, Song G, Li M, Lun W. Condyloma acuminata on the nipple and coronary sulcus of the penis: A case report. *Medicine (Baltimore)*. abril de 2019;98(16):e15109.

76. Gazzaz F, Mosli MH, Jawa H, Sibiany A. Detection of human papillomavirus infection by molecular tests and its relation to colonic polyps and colorectal cancer. *Saudi Med J.* marzo de 2016;37(3):256-61.
77. Kobayashi K, Tanese K, Kubo A, Matsumoto-Mochimaru N, Sasaki A, Kameyama K, et al. Identification of a human papillomavirus type 58 lineage in multiple Bowen's disease on the fingers: Case report and published work review. *J Dermatol.* octubre de 2018;45(10):1195-8.
78. Ferreira JCB, de Paula HM, Caixeta GN, Mendonça EF. Distinguishing bowenoid papulosis from Bowen disease in the mouth: A case report. *J Cutan Pathol.* marzo de 2020;47(3):257-62.
79. Brehm MA, Gordon K, Firan M, Rady P, Agim N. Case Report of Focal Epithelial Hyperplasia (Heck's Disease) with Polymerase Chain Reaction Detection of Human Papillomavirus 13. *Pediatr Dermatol.* mayo de 2016;33(3):e224-225.
80. Pierangeli A, Cannella F, Scagnolari C, Gentile M, Sciandra I, Antonelli G, et al. Frequent detection of high human papillomavirus DNA loads in oral potentially malignant disorders. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* enero de 2016;22(1):95.e9-95.e15.
81. Bushara O, Miller D, Giubellino A, Schomaker M, Thyagarajan B, Nelson AC. Diagnosis of epidermodysplasia verruciformis: Two cases highlighting the role of direct HPV L1 gene sequencing. *J Cutan Pathol.* junio de 2019;46(6):436-41.
82. Umanoff N, Werner B, Rady PL, Tyring S, Carlson JA. Persistent toenail onycholysis associated with Beta-papillomavirus infection of the nail bed. *Am J Dermatopathol.* abril de 2015;37(4):329-33.

83. Quast DR, Nauck MA, Bechara FG, Meier JJ. A case series of verrucae vulgares mimicking hyperkeratosis in individuals with diabetic foot ulcers. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* agosto de 2017;34(8):1165-8.
84. Wang L, Hu YC, Xiao CY, Wang F, Liu YF, Tang LH, et al. Comparative testing of HPV L1 protein monoclonal antibody panel for the detection of HPV in cervical exfoliated cells. *J Virol Methods.* julio de 2018;257:33-41.
85. Bhattarakosol P, Plaignam K, Sereemasapun A. Immunogold-agglutination assay for direct detection of HPV-16 E6 and L1 proteins from clinical specimens. *J Virol Methods.* mayo de 2018;255:60-5.
86. Mariano VS, Lorenzi AT, Scapulatempo-Neto C, Stein MD, Resende JCP, Antoniazzi M, et al. A Low-Cost HPV Immunochromatographic Assay to Detect High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *PloS One.* 2016;11(10):e0164892.
87. Salazar-Piña DA, Pedroza-Saavedra A, Cruz-Valdez A, Ortiz-Panozo E, Maldonado-Gama M, Chihu-Amparan L, et al. Validation of Serological Antibody Profiles Against Human Papillomavirus Type 16 Antigens as Markers for Early Detection of Cervical Cancer. *Medicine (Baltimore).* febrero de 2016;95(6):e2769.
88. Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PloS One.* 2015;10(7):e0134445.
89. Frega A, Pavone M, Sesti F, Leone C, Bianchi P, Cozza G, et al. Sensitivity and specificity values of high-risk HPV DNA, p16/ki-67 and HPV mRNA in young women with atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) or low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* diciembre de 2019;23(24):10672-7.

90. Im H, Castro CM, Shao H, Liong M, Song J, Pathania D, et al. Digital diffraction analysis enables low-cost molecular diagnostics on a smartphone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 de mayo de 2015;112(18):5613-8.
91. Paluszkiewicz A, Pruski D, Iwaniec K, Kędzia W. Comparison of the diagnostic value of cervical cytology and HPV HR DNA testing for the diagnosis of low-grade and high-grade squamous intraepithelial lesions across different age groups. *Ginekol Pol*. 2017;88(3):141-6.
92. Tewari P, White C, Kelly L, Pilkington L, Keegan H, D'Arcy T, et al. Clinical performance of the Cobas 4800 HPV test and the Aptima HPV assay in the management of women referred to colposcopy with minor cytological abnormalities. *Diagn Cytopathol*. diciembre de 2018;46(12):987-92.
93. Paes EF, de Assis AM, Teixeira CSC, Aoki FH, Teixeira JC. Development of a Multiplex PCR Test with Automated Genotyping Targeting E7 for Detection of Six High-Risk Human Papillomaviruses. *PloS One*. 2015;10(6):e0130226.
94. Maged AM, Saad H, Salah E, Meshaal H, AbdElbar M, Omran E, et al. Urine test for HPV genotypes as a predictor of precancerous cervical lesions and for cervical cancer screening. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. junio de 2018;141(3):332-6.
95. Tewari D, Novak-Weekley S, Hong C, Aslam S, Behrens CM. Performance of the cobas HPV Test for the Triage of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Cytology in Cervical Specimens Collected in SurePath. *Am J Clin Pathol*. 2 de noviembre de 2017;148(5):450-7.

96. Keegan H, Pilkington L, McInerney J, Jeney C, Benczik M, Cleary S, et al. Human papillomavirus detection and genotyping, by HC2, full-spectrum HPV and molecular beacon real-time HPV assay in an Irish colposcopy clinic. *J Virol Methods*. junio de 2014;201:93-100.
97. Świdarska-Kiec J, Czajkowski K, Zaręba-Szczudlik J, Kacperczyk-Bartnik J, Bartnik P, Romejko-Wolniewicz E. Comparison of HPV Testing and Colposcopy in Detecting Cervical Dysplasia in Patients With Cytological Abnormalities. *Vivo Athens Greece*. 2020;34(3):1307-15.
98. Ren C, Zhu Y, Yang L, Zhang X, Liu L, Ren C. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA assay for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among women with ASCUS Papanicolaou smears. *Arch Gynecol Obstet*. febrero de 2018;297(2):425-32.
99. Li Y, Rong S, Zhi Y, Qiu C, Fan T, Li X. Detection of cervical intraepithelial neoplasia with HPV E6/E7 mRNA among women with atypical squamous cells of unknown significance. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. mayo de 2017;137(2):145-9.
100. Guo Y, You K, Geng L, Qiao J. The clinical performance of APTIMA human papillomavirus and Hybrid Capture 2 assays in the triage of lesser abnormal cervical cytologies. *J Gynecol Oncol*. octubre de 2014;25(4):287-92.
101. Zhang JJ, Cao XC, Zheng XY, Wang HY, Li YW. Feasibility study of a human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein test for the diagnosis of cervical precancer and cancer. *J Int Med Res*. marzo de 2018;46(3):1033-42.
102. Cao X, Liu S, Jia M, Chen H, Zhao D, Dong B, et al. Performance of HPV16/18 in Triage of Cytological Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. *Anal Cell Pathol Amst*. 2019;2019:4324710.

103. Nayar R, Wilbur D. The Bethesda system for reporting cervical cytology: definitions, criteria, and explanatory notes. Springer; 2015.
104. Fukui S, Nagasaka K, Iimura N, Kanda R, Ichinose T, Sugihara T, et al. Detection of HPV RNA molecules in stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE) with concurrent cervical intraepithelial lesion: a case report. *Virol J.* 3 de junio de 2019;16(1):76.
105. Behtash N, Aghamir SMK, Tamehri Zadeh SS, Guitynavard F. A case of condyloma acuminata after about 30 years of urinary obstructive symptoms. *Urol Case Rep.* julio de 2020;31:101200.
106. Girijala RL, Nyinawinyange D, Parekh PK, Grimwood RE. Multiple flat-topped scaly violaceous papules. *Dermatol Online J.* 15 de marzo de 2019;25(3):13030/qt19g4940s.
107. Zayko MO, Velilla RE, Shurbaji MS. Condyloma Acuminata Presenting as Isolated Papillary Lesions in the Prostatic Urethra. *Am J Case Rep.* 22 de diciembre de 2018;19:1522-5.
108. Hošnjak L, Fujs Komloš K, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Development of a novel multiplex type-specific quantitative real-time PCR for detection and differentiation of infections with human papillomavirus types HPV2, HPV27, and HPV57. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* diciembre de 2016;25(4):65-71.
109. Rymsza T, Ribeiro EA, de Carvalho LF das CES, Bhattacharjee T, de Azevedo Canevari R. Human papillomavirus detection using PCR and ATR-FTIR for cervical cancer screening. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 5 de mayo de 2018;196:238-46.
110. Akbar S, Pervez SN, Shah W. Manual liquid based cytology for Pap smear preparation and HPV detection by PCR in Pakistan. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2015;16(2):579-83.

111. Zandnia F, Doosti A, Mokhtari-Farsani A, Kardi MT, Movafagh A. Application of multiplex PCR for Rapid and sensitive detection of human papillomaviruses in cervical cancer. *Pak J Med Sci.* 2016;32(2):444-7.
112. Cheng JX, Yao LL, Xiang H, Zhan YJ, Zhou P, Yuan M, et al. Cervical cytology ASCUS patients with HPV detection and clinical value. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2016;43(4):592-6.
113. Mukama O, Yuan T, He Z, Li Z, Habimana J de D, Hussain M, et al. A high fidelity CRISPR/Cas12a based lateral flow biosensor for the detection of HPV16 and HPV18. *Sens Actuators B Chem.* agosto de 2020;316:128119.
114. Tüney İ, Altay A, Ergünay K, Önder SÇ, Usubütün A, Salman MC, et al. HPV types and E6/E7 mRNA expression in cervical samples from Turkish women with abnormal cytology in Ankara, Turkey. *Turk J Med Sci.* 27 de febrero de 2017;47(1):194-200.
115. Castle PE, Cuzick J, Stoler MH, Wright TC, Reid JL, Dockter J, et al. Detection of human papillomavirus 16, 18, and 45 in women with ASC-US cytology and the risk of cervical precancer: results from the CLEAR HPV study. *Am J Clin Pathol.* febrero de 2015;143(2):160-7.
116. Ki EY, Lee YK, Lee A, Park JS. Comparison of the PANArray HPV Genotyping Chip Test with the Cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 Tests for Detection of HPV in ASCUS Women. *Yonsei Med J.* julio de 2018;59(5):662-8.
117. Moussavou-Boundzanga P, Koumakpayi IH, Labouba I, Leroy EM, Belembaogo E, Berthet N. Human papillomavirus detection using the Abbott RealTime high-risk HPV tests compared with conventional nested PCR coupled to high-throughput sequencing of amplification products in cervical smear specimens from a Gabonese female population. *Virol J.* 21 de diciembre de 2017;14(1):241.

118. Cornall AM, Poljak M, Garland SM, Phillips S, Machalek DA, Tan JH, et al. HPV genotype-specific concordance between EuroArray HPV, Anyplex II HPV28 and Linear Array HPV Genotyping test in Australian cervical samples. *Papillomavirus Res Amst Neth.* diciembre de 2017;4:79-84.
119. Charlier P, Nielsen O, Lowenstein EJ. Plantar warts on Tollund Man's feet (Denmark, fourth century BC). Limits of retrospective dermatological diagnosis. *Clin Exp Dermatol.* julio de 2017;42(5):547-8.
120. Lee DY, Park JH, Lee JH, Yang JM, Lee ES. The use of dermoscopy for the diagnosis of plantar wart. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* junio de 2009;23(6):726-7.
121. Bae JM, Kang H, Kim HO, Park YM. Differential diagnosis of plantar wart from corn, callus and healed wart with the aid of dermoscopy. *Br J Dermatol.* enero de 2009;160(1):220-2.
122. Grande del Arco J. Apoyo diagnóstico con ecografía en papilomas plantares: caso clínico. *Rev Int Cienc Podol.* 17 de junio de 2019;13(2):61-5.
123. Wortsman X, Jemec GBE, Sazunic I. Anatomical detection of inflammatory changes associated with plantar warts by ultrasound. *Dermatol Basel Switz.* 2010;220(3):213-7.
124. Yu Z, Lyu W, Yu M, Wang Q, Qu H, Ismagilov RF, et al. Self-partitioning SlipChip for slip-induced droplet formation and human papillomavirus viral load quantification with digital LAMP. *Biosens Bioelectron.* mayo de 2020;155:112107.
125. Kreutz JE, Wang J, Sheen AM, Thompson AM, Staheli JP, Dyen MR, et al. Self-digitization chip for quantitative detection of human papillomavirus gene using digital LAMP. *Lab Chip.* 2019;19(6):1035-40.

126. Yin K, Pandian V, Kadimisetty K, Zhang X, Ruiz C, Cooper K, et al. Real-time Colorimetric Quantitative Molecular Detection of Infectious Diseases on Smartphone-based Diagnostic Platform. *Sci Rep.* 2 de junio de 2020;10(1):9009.
127. Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *J Am Acad Dermatol.* abril de 2019;80(4):835-51.
128. Becker BA, Childress MA. Common Foot Problems: Over-the-Counter Treatments and Home Care. *Am Fam Physician.* 1 de septiembre de 2018;98(5):298-303.
129. Achterman RR, White TC. A foot in the door for dermatophyte research. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002564.
130. Podólogos colegiados por año y sexo. [Internet]. INE. [citado 19 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?tpx=49004>
131. de Planell-Mas E, Martínez-Garriga B, Zalacain AJ, Vinuesa T, Viñas M. Human papillomaviruses genotyping in plantar warts. *J Med Virol.* mayo de 2017;89(5):902-7.
132. García-Oreja S, Álvaro-Afonso FJ, Sevillano-Fernández D, Tardáguila-García A, López-Moral M, Lázaro-Martínez JL. A non-invasive method for diagnosing plantar warts caused by human papillomavirus (HPV). *J Med Virol.* junio de 2022;94(6):2897-901.
133. Zhang J, Cheng K, Wang Z. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia in China: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* diciembre de 2020;302(6):1329-37.
134. Watson JD, Crick FHC. THE STRUCTURE OF DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1 de enero de 1953;18(0):123-31.
135. Witkowski J. The forgotten scientists who paved the way to the double helix. *Nature.* abril de 2019;568(7752):308-9.

136. Lodish. *Biología Celular y Molecular*.
137. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *BioTechniques*. octubre de 2020;69(4):317-25.
138. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater*. mayo de 2021;20(5):593-605.
139. Nam K. Colposcopy at a turning point. *Obstet Gynecol Sci*. enero de 2018;61(1):1-6.
140. Lee SC, Leung KKC, Chung ACY, Wong ESY, Meehan KL, Chan JYK. Fluid Biomarkers in HPV and Non-HPV Related Oropharyngeal Carcinomas: From Diagnosis and Monitoring to Prognostication-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 18 de noviembre de 2022;23(22):14336.
141. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 3 p.
142. Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld MLMM, Mattar NJ, Veronese LA, Miyahara GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival: Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 6 de octubre de 2008;37(10):593-8.
143. Burd EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. julio de 2010;23(3):550-76.
144. Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 1 de febrero de 2009;124(3):516-20.

145. Al Bdour S, Akkash L, Shehabi AA. Detection and typing of common human papillomaviruses among Jordanian patients. *J Med Virol.* junio de 2013;85(6):1058-62.
146. de Koning MNC, Khoe LV, Eekhof J a. H, Kamp M, Gussekloo J, Ter Schegget J, et al. Lesional HPV types of cutaneous warts can be reliably identified by surface swabs. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* octubre de 2011;52(2):84-7.
147. Giannaki M, Kakourou T, Theodoridou M, Syriopoulou V, Kabouris M, Louizou E, et al. Human Papillomavirus (HPV) Genotyping of Cutaneous Warts in Greek Children. *Pediatr Dermatol.* noviembre de 2013;30(6):730-5.
148. Cong X, Sun R, Zhang X, Wang Y, Wang L, Yu Y. Correlation of human papillomavirus types with clinical features of patients with condyloma acuminatum in China. *Int J Dermatol.* julio de 2016;55(7):775-80.
149. Javitt GH, Vollebregt ER. Regulation of Molecular Diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 31 de agosto de 2022;23:653-73.
150. Schmitz JE, Stratton CW, Persing DH, Tang YW. Forty Years of Molecular Diagnostics for Infectious Diseases. *J Clin Microbiol.* 19 de octubre de 2022;60(10):e0244621.
151. Obande GA, Banga Singh KK. Current and Future Perspectives on Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for Diagnosing Infections. *Infect Drug Resist.* 2020;13:455-83.
152. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 15 de junio de 2000;28(12):E63.

153. Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*. 29 de julio de 2021;10(8):1931.
154. Rohatensky MG, Livingstone DM, Mintchev P, Barnes HK, Nakoneshny SC, Demetrick DJ, et al. Assessing the performance of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for the detection and subtyping of high-risk suptypes of Human Papilloma Virus (HPV) for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma (OPSCC) without DNA purification. *BMC Cancer*. 8 de febrero de 2018;18(1):166.
155. Zhang L, Ju Y, Hu H, Ma C, Huang Y, Gong L, et al. Preliminary establishment and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for convenient screening of 13 types of high-risk human papillomaviruses in cervical secretions. *J Virol Methods*. mayo de 2022;303:114501.
156. Wang Y, Ge G, Mao R, Wang Z, Sun YZ, Du YG, et al. Genotyping of 30 kinds of cutaneous human papillomaviruses by a multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification and visual detection method. *Virol J*. 9 de julio de 2020;17(1):99.
157. Coorevits A, Dinsdale AE, Halket G, Lebbe L, De Vos P, Van Landschoot A, et al. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus* : emendation of *Geobacillus* , *G. stearothermophilus* , *G. jurassicus* , *G. toebii* , *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly ‘*thermoglucosidasius*’); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1 de julio de 2012;62(Pt_7):1470-85.
158. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. junio de 2002;16(3):223-9.

159. Eiken Chemical Co., Ltd. website. Principle of Loop primer [Internet]. 2023. Disponible en: <https://loopamp.eiken.co.jp/en/lamp/0204.html>
160. Panno S, Matic S, Tiberini A, Caruso AG, Bella P, Torta L, et al. Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology. *Plants Basel Switz.* 6 de abril de 2020;9(4):461.
161. Hayden A, Kuentzel M, Chittur SV. Rapid, Affordable, and Scalable SARS-CoV-2 Detection From Saliva. *J Biomol Tech JBT.* septiembre de 2021;32(3):148-57.
162. Zen LPY, Lai MY, Izzati Binti Rozlan S, Abdul Hamid MH, Jelip J, Nani Mudin R, et al. End-point detection of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) on malaria by direct observation with colorimetric dyes. *Exp Parasitol.* agosto de 2022;239:108310.
163. Jawla J, Kumar RR, Mendiratta SK, Agarwal RK, Kumari S, Saxena V, et al. Paper-based loop-mediated isothermal amplification and lateral flow (LAMP-LF) assay for identification of tissues of cattle origin. *Anal Chim Acta.* 15 de marzo de 2021;1150:338220.
164. FUJITSU LIMITED. PrimerExplorer V5.
165. Al-Awadhi R, Al-Mutairi N, Chehadeh W. Prevalence of HPV Genotypes in Adult Male Patients with Cutaneous Warts: A Cross-Sectional Study. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent.* 2020;29(5):458-64.
166. Lechner M, Liu J, Masterson L, Fenton TR. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol.* mayo de 2022;19(5):306-27.

167. Park SE, Ha JW, Kim CW, Kim SS. Preliminary study of analyzing mucosal human papillomaviruses in cutaneous warts by restriction fragment mass polymorphism. *J Dermatol.* diciembre de 2017;44(12):1368-73.

168. Redzic N, Benoy I, Vanden Broeck D, Bogers JP. Development and validation of a wart-associated human papilloma virus genotyping assay for detection of HPV in cutaneous warts. *J Med Virol.* junio de 2021;93(6):3841-8.

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

Los resultados de la presente tesis han sido plasmados en una serie de artículos y otras contribuciones científicas recogidas a continuación:

Scientific papers.

1. Diagnostic techniques in HPV infections and the need to implement them in plantar lesions: A systematic review.

Alberto Aldana-Caballero, Félix Marcos-Tejedor, Raquel Mayordomo.

Expert Review of Molecular Diagnostics.

Impact Factor: 5.670, Q1.

Available as: Aldana-Caballero A, Marcos-Tejedor F, Mayordomo R. Diagnostic techniques in HPV infections and the need to implement them in plantar lesions: A systematic review. Expert Rev Mol Diagn. 2021 Dec;21(12):1341-1348. doi: 10.1080/14737159.2021.2004889. Epub 2021 Nov 22. PMID: 34752720.

2. Assessment of Visual Diagnosis by Podiatrists for HPV and Onychomycosis: The Need for Complementary Tests.

Alberto Aldana-Caballero, Raquel Mayordomo, Félix Marcos-Tejedor.

Journal of Fungi.

Impact Factor: 5.724 (2021), Q1.

Available as: Aldana-Caballero A, Mayordomo R, Marcos-Tejedor F. Assessment of Visual Diagnosis by Podiatrists for HPV and Onychomycosis: The Need for Complementary

Tests. *J Fungi (Basel)*. 2022 Jan 29;8(2):135. doi: 10.3390/jof8020135. PMID: 35205889; PMCID: PMC8878088.

3. Clinical implementation of a multiplex PCR detection method for HPV causing plantar warts and genotype distribution in different geographical areas of Spain.

Alberto Aldana-Caballero, Ester Mingorance-Álvarez, Raquel Mayordomo, Félix Marcos-Tejedor.

Submitted. Waiting acceptance.

Other contributions.

1. Valoración del diagnóstico clínico en infecciones en podología: VPH y Onicomycosis.

Alberto Aldana Caballero, Félix Marcos Tejedor, Raquel Mayordomo Acevedo.

Presentado en: Congreso Nacional de Podología, 2019.

ANEXOS

ANEXO I – DOCUMENTO DE APROBACIÓN BIOÉTICA.



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, TRANSFERENCIA E INNOVACIÓN

Campus Universitario
Avda de Elvas s/nº
06071 BADAJOZ

Tel.: 924 28 93 05
Fax: 924 27 29 83

NºRegistro:123/2018

D. FERNANDO HENAO DÁVILA, PRESIDENTE POR DELEGACIÓN DE LA COMISIÓN DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.

INFORMA: Que una vez analizada, por esta Comisión la solicitud de Proyecto de Investigación titulado " Nuevas técnicas de diagnóstico molecular en lesiones cutáneas por virus del Papiloma Humano en el pie " cuyo Investigador/a Principal es D/Dª Alberto Aldana Caballero, ha decidido por unanimidad valorar positivamente el precitado proyecto por considerar que se ajusta a las normas éticas esenciales cumpliendo con la normativa vigente al efecto.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente informe en Badajoz a 20 de diciembre de 2018.

ANEXO II – DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LESIONES CUTÁNEAS POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN EL PIE.

Paciente:	Paciente ID#:
Centro: CENTRO UNIVERSITARIO PLASENCIA.	Centro ID#:
Investigador: ALBERTO ALDANA CABALLERO.	

Lea detenidamente la información contenida en este documento y asegúrese que entiende este proyecto de investigación. Por favor si esta de acuerdo en participar en este estudio, firme este documento. Por su firma reconoce que ha sido informado de las características del proyecto, de sus requisitos y sus riesgos y que acepta libremente participar en él. Una copia del presente documento le será entregada.

Objeto del estudio.

Ha sido invitado/a a participar en un estudio de investigación dirigido a DESARROLLAR UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE DNA VÍRICO A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO DE LAS LESIONES POR PAPILOMA PLANTAR Y UNGUEAL.

Procedimientos y Duración del Estudio.

El único procedimiento al que será sometido/a será RASPADO CON BISTURÍ DE LA LESIÓN PARA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA. La duración del proyecto será de 1 AÑO, durante los cuales usted nos autoriza a UTILIZAR LAS MUESTRAS Y LOS DATOS EXPERIMENTALES DE FORMA ESTADÍSTICA PARA LLEVAR A CABO EL PROYECTO. La muestra que cede será utilizada exclusivamente con finalidad de investigación sin ánimo de lucro.

Resultados del Estudio.

Al finalizar el estudio se le informará del resultado global del mismo si usted lo desea, pero NO de su resultado personal, que se tratará con total confidencialidad de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la Ley 14/2007, de Investigación biomédica.

Riesgos derivados de la participación en el estudio.

Los riesgos asociados a la toma de muestras son mínimos. Se empleará material estéril individual y desechable a fin de eliminar los riesgos de infección y de contagio y las muestras de obtendrán por personal cualificado.

Beneficios.

La participación en el proyecto no será recompensada económicamente. Aparte de lo comentado anteriormente, se estima que el desarrollo del estudio en el que participará comportará beneficios a medio plazo en el diagnóstico de lesiones cutáneas por virus del papiloma humano mediante técnicas moleculares y en su validación como método eficaz.

Costes.

El coste de la extracción y procesamiento de la muestra así como los análisis posteriores serán cubiertos por el proyecto. Su participación no le supondrá ningún coste.

El investigador principal, ALBERTO ALDANA CABALLERO, puede ser contactado en cualquier momento en el siguiente teléfono, 927427000 (EXT. 52182), a fin de recabar información acerca del proyecto y en la siguiente dirección:

Departamento de ANATOMÍA BIOLÓGICA CELULAR Y ZOOLOGÍA
Centro Universitario de Plasencia – Universidad de Extremadura
Av. Virgen del Puerto, 2
10600 Plasencia, Cáceres.

En ningún caso su decisión de no participar en el proyecto le supondrá una rebaja en la calidad asistencial por parte de su médico.

Confidencialidad de su muestra.

De acuerdo con la normativa legal vigente, los resultados de las muestras se tratarán con total confidencialidad. El protocolo de recogida de datos será archivado, y a cada participante se le asignará una clave de tal modo que no pueda relacionarse la muestra e información obtenida con la identidad del sujeto. Las muestras serán anonimizadas, asegurando la imposibilidad de inferir su identidad, para su estudio y potencial análisis ulterior.

El investigador principal del proyecto se compromete a que la confidencialidad de los datos que se puedan obtener en dicho proyecto será escrupulosamente observada, y que los datos personales de los sujetos participantes no serán conocidos por los investigadores del proyecto. En los casos que corresponda, éstos informarán al responsable médico o a los afectados si creen que algún resultado del proyecto podría ser de su interés.

El investigador principal del proyecto se compromete a no utilizar las muestras para otros estudios diferentes a los de este proyecto y a no traspasar las muestras a otros posibles proyectos o equipos de investigación.

Para todo lo no previsto en este documento, se aplicará la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, BOE 274 de 15 de noviembre de 2002; Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; BOE 298 de 14 de diciembre de 1999; Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, BOE 17 de 19 de enero de 2008), sobre investigación biomédica (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica; BOE 159 de 4 de julio de 2007) y cualquier otra que resultara aplicable.

Si fuese necesario el almacenamiento de las muestras para análisis ulteriores, tal como recoge la Ley 41/2007, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica (art. 9.3), el consentimiento escrito del paciente será necesario para cada una de las actuaciones que se lleven a cabo. Acción que podrá ser ejercitada por el paciente, por sus representantes, o por sus herederos si éste hubiera fallecido.

Los resultados del estudio pueden ser publicados en revistas científicas o publicaciones de carácter general. No obstante, la información concerniente a su participación será mantenida como confidencial. Recibirá una copia de esta hoja de información y del consentimiento informado firmado por usted.

Declaración del Donante.

He sido informado por el personal relacionado con el proyecto mencionado:

De las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.

Del fin para el que se utilizarán mis muestras.

He sido informado de que los tejidos que cedo serán utilizados exclusivamente con finalidad de investigación sin ánimo de lucro.

Que mis muestras serán proporcionadas de forma anónima a los investigadores del proyecto.

Que en cualquier momento puedo solicitar información genérica sobre los estudios para los que se han utilizado mis muestras.

Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Usted tiene derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento. Como se menciona anteriormente, en ningún caso su decisión de no participar en el proyecto le supondrá una rebaja en la calidad asistencial por parte de su médico.

Se me ha proporcionado copia del presente documento. ACEPTO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO.

Nombre:..... Firma:

Declaración del profesional de salud médica de que ha informado debidamente al donante.

Nombre:..... Firma:

