



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Verrugas plantares: caracterización de los virus causales y aplicación del láser 1064 nm a su tratamiento

Elena de Planell Mas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

Tesis doctoral  
Elena de Planell Mas

---

# **VERRUGAS PLANTARES: CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS CAUSALES Y APLICACIÓN DEL LÁSER 1064 nm A SU TRATAMIENTO**



Barcelona, 2016



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



TESIS DOCTORAL

**Verrugas plantares:  
Caracterización de los virus causales y  
aplicación del láser 1064 nm a su tratamiento**

**Elena de Planell i Mas  
Barcelona, diciembre 2016**





## **TESIS DOCTORAL**

**Verrugas plantares:  
Caracterización de los virus causales y  
aplicación del láser 1064 nm a su tratamiento**

**Memoria presentada por Elena de Planell i Mas  
para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona**





MIQUEL VIÑAS CIORDIA, Catedrático de Universidad, del área de Microbiología y adscrito al Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona, y ANTONIO JESUS ZALACAIN VICUÑA, profesor titular de Universidad y adscrito al Departamento de Podología de la E.U. Infermeria de la Universitat de Barcelona,

#### CERTIFICAN

Que la tesis Doctoral presentada por ELENA de PLANELL MAS, titulada *Verrugas plantares: Caracterización de los virus causales y aplicación del láser 1064 nm a su tratamiento* ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio de Microbiología Molecular y Antimicrobianos del campus de Ciències de la Salut de Bellvitge.

Que a nuestro juicio la memoria y el trabajo presentado cumplen los requisitos formales y conceptuales para que el trabajo pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste firman el presente en l'Hospitalet de Llobregat a 27 de junio de 2016.

Firmado Prof. Dr. Miquel Viñas Ciordia

Firmado Prof. Dr. Antonio Zalacain Vicuña





A la Marta, la meva germana.

Un record als que ja no hi són,  
en especial a la mare i al pare; em van deixar a l'inici i al final d'aquesta tesi.  
Que allà on siguin puguin gaudir d'aquesta fita que he estat capaç d'aconseguir.



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de una forma u otra a la realización de esta tesis:

A la Dra. Blanca Martínez Garriga, por su conocimiento, orientación, espíritu de trabajo, paciencia y motivación que han sido parte importante para la consecución de este trabajo.

A los directores de esta tesis que son el pilar fundamental sin el cual no hubiera sido posible llegar a completarla. Al Dr. Miquel Viñas Ciordia, por su gran conocimiento científico y habilidad para transmitirlo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y poder formar parte de la gran familia que es el laboratorio de la quinta planta. Y al Dr. Antonio J. Zalacain Vicuña, por brindarme la oportunidad de realizar este estudio sobre el láser, por facilitarme el trabajo contando con su apoyo y confianza.

A la Dra. Teresa Vinuesa Aumedes, no sólo por contactar con el Instituto Karolinska, sino por su ayuda y accesibilidad.

A la Dra. Virginia Novel i Martí, quién desde mis años de estudiante ha sido parte de mi vida. Las enseñanzas de estos años se han convertido en parte esencial de quién soy personal y profesionalmente.

Al personal investigador del laboratorio de Microbiología: Àlex, Esther, Eulàlia, Héctor, Lúdia, Lupe y Rocío. Gracias por dejarme formar parte de vosotros, por tener paciencia con una primeriza en el laboratorio con los volúmenes de las pipetas, los cálculos de las concentraciones, los geles de agarosa y tantas cosas más.

A mis compañeros profesores del *Departament de Podologia* de la *Universitat de Barcelona*, por su ayuda a la hora de derivar los pacientes, por su apoyo incondicional y darme ánimos.

Al personal del *Hospital Podològic de la UB*. A Rosa, Aurelia, Isa, Vanessa y Loli, que me han acompañado en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Gracias por aguantarme y escucharme. Siempre estuvieron ahí en lo bueno y en lo malo.

A todos, gracias por haber hecho posible que esta Tesis sea una realidad.

## INDICE GENERAL

Abreviaturas	xv
1. Introducción	1
1.1 La piel	3
1.2 Verrugas	5
1.2.1 Etiología	6
1.2.2 El genoma del VPH	6
1.2.3 Función de los genes del VPH	8
1.2.4 Ciclo biológico	9
1.2.5 Tipos de papilomavirus	11
1.2.6 Epidemiología	15
1.2.7 Manifestaciones clínicas	17
1.2.7.1 Verrugas vulgares	17
1.2.7.2 Verrugas plantares y palmares	18
1.2.7.3 Verrugas planas	21
1.2.7.4 Verrugas de carnicero	21
1.2.8 Histopatología	22
1.2.9 Diagnóstico	23
1.2.10 Diagnóstico diferencial	25
1.2.11 Tratamiento	27
1.3 Láser	32
1.3.1 Introducción	32
1.3.2 Principio físicos de la luz láser	33
1.3.3 Tipos de láser	34
1.3.3.1 Láseres sólidos	36
1.3.4 Efectos biológicos del láser	37
1.3.4.1 Parámetros físicos	37
1.3.4.2 Propiedades ópticas de los tejidos	40
2. Objetivos	43
3. Materiales y Métodos	47
3.1 Diseño	49
3.2 Población en estudio	49

3.2.1	Muestra	49
3.2.2	Criterios de selección	50
3.2.3	Criterios de inclusión	50
3.2.4	Criterios de exclusión	50
3.3	Metodología clínica	50
3.3.1	Recogida de datos	50
3.3.2	Recogida de muestras	51
3.3.3	Descripción del aparato láser	51
3.3.4	Metodología de aplicación del láser	52
3.3.4.1	Medidas de protección al emplear el láser	52
3.3.4.2	El sistema de enfriamiento	53
3.3.4.3	Ajuste de la dosis	56
3.3.4.4	Técnicas anestésicas de la zona	58
3.3.4.5	Técnica de aplicación del láser	58
3.3.5	Seguimiento del paciente	59
3.3.5.1	Cuidados posteriores al tratamiento	59
3.3.5.2	Visitas posteriores	60
3.4	Metodología experimental	61
3.4.1	Extracción del DNA cromosómico	61
3.4.2	Cuantificación del DNA	63
3.4.3	Reacción en cadena de la polimerasa	64
3.4.3.1	Cebadores utilizados y fragmento amplificado	65
3.4.3.2	Mezcla de los componentes o <i>MasterMix</i>	65
3.4.3.3	Amplificación del DNA	66
3.4.4	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	67
3.4.5	Purificación de los productos amplificados	69
3.4.6	Determinación de las secuencias de los fragmentos amplificados	70
3.4.7	Alineamiento de secuencias	70
4.	Resultados	73
4.1	Pacientes y muestras	75
4.2	Prevalencia del tipo VPH	75
4.3	Tipo de VPH y características de los pacientes	79
4.4	Pacientes con múltiples verrugas	80
4.5	Distribución de las verrugas plantares según zona de aparición	81
4.6	Distribución de los diferentes genotipos según la zona de aparición	82
4.7	Efectividad del tratamiento con láser de las verrugas plantares	83

4.7.1	Estudio preliminar	83
4.7.2	Estudio final	84
5.	Discusión	89
5.1	Pacientes y muestras	91
5.2	Obtención de la muestra	92
5.3	Prevalencia de los genotipos de VPH	93
5.4	Tipo de VPH y características de los pacientes	95
5.5	Pacientes con múltiples verrugas	96
5.6	Distribución de las verrugas plantares y los diferentes genotipos según la zona de aparición	97
5.7	Efectividad del tratamiento con láser de las verrugas plantares	98
6.	Conclusiones	101
7.	Bibliografía	105
8.	Índice de ilustraciones	121
9.	Índice de tablas	125
10.	Anexos	129
10.1	Información para el participante en el tratamiento de verrugas con láser	131
10.2	Consentimiento informado de tratamiento de verrugas con láser	132
10.3	Protocolo clínico	133
10.4	Human papillomaviruses genotyping in plantar warts. ( <i>Artículo pendiente de publicación</i> )	135





## ABREVIATURAS

A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CCiT	Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics
CE	Comunidad europea
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CW	Continua
DCP	Difenciprona
DNA	Ácido desoxiribonucleico ( <i>Deoxiribonucleic Acid</i> )
DNCB	Dinitroclorobenceno
dNTP	Dideoxinucleótido
DP	Densidad de potencia
E	Temprana ( <i>Early</i> )
E1	Proteína E1 del papiloma humano
E2	Proteína E2 del papiloma humano
E4	Proteína E4 del papiloma humano
E5	Proteína E5 del papiloma humano
E6	Proteína E6 del papiloma humano
E7	Proteína E7 del papiloma humano
<i>et al.</i>	y colaboradores
ETDA	Ácido etilendiaminotetracético
EV	Epidermodisplasia verruciforme
F	Frecuencia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Guanina
HCl	Ácido clorhídrico
HLLT	Terapia láser de alta frecuencia ( <i>High Level Laser Therapy</i> )

Hz	Hertz
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IR	Infrarrojo
J	Julio
Kb	Kilobases (1Kb=1000pb)
kDa	kiloDalton (1kDa = 1000Daltons)
L	Tardío ( <i>Late</i> )
L1	Proteína mayor de la cápside del papiloma virus humano
L2	Proteína menor de la cápside del papiloma virus humano
LLLT	Terapia láser de baja frecuencia ( <i>Low Level Laser Therapy</i> )
LV	Láser verruga
M	Concentración molar (mol soluto / litro solución)
m	Metro
mg	Miligramo (1mg = $10^{-3}$ gramos)
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitros (1ml = $10^{-3}$ litros)
mm	Milímetro (1mm = $10^{-3}$ metros)
mM	Milimol (1mM = $10^{-3}$ moles)
ms	Milisegundo (1ms = $10^{-3}$ segundos )
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nd	Neodimio
ng	Nanogramos (1 ng = $10^{-9}$ gramos)
nm	Nanómetros (1 nm = $10^{-9}$ metros)
NS/NC	No sabe no contesta
°C	Grado Celsius
ORF	Pautas de lectura abierta ( <i>Open Reading Frame</i> )
pb	Pares de bases del DNA
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )

pH	$\log 1/(H^+) = -\log [H^+]$
pmol	Picomol (1 pmol = $10^{-12}$ moles)
r	Radio
RNA	Acido ribonucleico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
Sind	Síndrome
SNET	SDS – NaCl – EDTA – Tris-Cl
t	Tiempo
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	Polimerasa termoresistentes de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA
TFD	Terapia fotodinámica
Tris	Trihidroximetilaminometano
u	Unidad
URL	Región de control larga
URR	Región reguladora ( <i>Upstream regulatory region</i> ) (región no codificable)
UV	Ultravioleta
VP	Virus del papiloma
VPH	Virus del papiloma humano
vs	<i>versus</i>
w	Vatio
w/v	Peso por volumen
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu$	Micra (1 nm = $10^{-6}$ m).
$\mu$ l	Microlitro (1 $\mu$ l = $10^{-6}$ litros)



---

# 1. INTRODUCCIÓN

---

- 
- 1.1 La piel
  - 1.2 Verrugas
    - 1.2.1 Etiología
    - 1.2.2 Biología molecular de VPH
    - 1.2.3 Función de los genes del VPH
    - 1.2.4 Ciclo biológico
    - 1.2.5 Tipos de papilomavirus
    - 1.2.6 Epidemiología
    - 1.2.7 Manifestaciones clínicas
    - 1.2.8 Histopatología
    - 1.2.9 Diagnóstico
    - 1.2.10 Diagnóstico diferencial
    - 1.2.11 Tratamiento
  - 1.3 Láser
    - 1.3.1 Introducción
    - 1.3.2 Principios físicos de la luz láser
    - 1.3.3 Tipos de láser
    - 1.3.4 Efectos biológicos del láser
-



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 La piel

La piel es el órgano de mayor tamaño del cuerpo humano. Se compone de un tejido que crece, se diferencia y se renueva continuamente. Es un tejido delgado y resistente que recubre todo el cuerpo y proporciona una cubierta protectora. El grosor de la piel varía según la zona [1].

La piel se divide en tres capas: la más interna es la *hipodermis* o *tejido subcutáneo*, la intermedia es la *dermis* y la más externa es la *epidermis*.

### Tejido subcutáneo

Es la estructura que contiene la mayor cantidad de tejido adiposo del organismo. El grosor de la grasa subcutánea varía en dependencia de la zona del cuerpo; así pues en los párpados es muy fina y más gruesa en las palmas y plantas de manos y pies, respectivamente.

### Dermis

Es la estructura de soporte de la piel y le proporciona resistencia y elasticidad. Está formada por tejido conectivo, elementos celulares y una matriz. El tejido contiene fibras de colágeno, reticulares (reticulina) y elásticas. Estas fibras participan en el sostén y elasticidad de la piel.

La dermis se divide en dos capas, que desde el exterior al interior son la capa papilar y la capa reticular.

La capa papilar recibe este nombre por la presencia de proyecciones hacia el interior de la epidermis, estas proyecciones se denominan papilas dérmicas y se alternan con los procesos interpapilares de la epidermis. En las papilas se encuentran las asas

capilares (sistema circulatorio) que proporcionan los nutrientes a la epidermis avascular. La capa papilar también contiene numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos.

La capa reticular es más gruesa que la papilar, y recibe ese nombre por el entramado o retícula de las fibras colágenas que forman gruesos haces entrelazados con haces de fibras elásticas.

## Epidermis

Es la más superficial de las tres capas de la piel. Contiene diferentes tipos de células: queratinocitos, células dendríticas (melanocitos y células de Langerhans) y células de Merkel. Los queratinocitos que son las células productoras de queratina son las más abundantes.

Durante el desarrollo de la epidermis se diferencian cuatro capas. La llamada epidermis viva está constituida por la capa basal, la espinosa y la granulosa. La capa córnea forma el producto final muerto.

La capa basal está situada encima de la dermis. Este estrato está formado por células madre capaces de madurar progresivamente para llegar a las formas presentes en las capas superiores.

La capa espinosa, o estrato de Malpighi, está formada por diversas capas de células epidérmicas, de formas poligonales, con un ligero aplanamiento horizontal en las capas superiores.

La capa granulosa está compuesta por cinco capas de células aplanadas y, contiene unos gránulos proteicos denominados gránulos de queratohialina. Cuando los queratinocitos llegan a la última capa de este estrato, las células epidérmicas mueren y vacían su contenido en el espacio intercelular [2].



La capa córnea es la más externa de la epidermis. Está formada por células queratinizadas muertas estratificadas que se eliminan constantemente. Estas células contienen queratina, una proteína que puede absorber grandes cantidades de agua. La capa córnea constituye una barrera protectora básica para el organismo [3].

La queratinización es un proceso de la epidermis en el cual las células de la capa basal se transforman y llegan a la capa córnea. Este proceso tarda veintiocho días [4]. En aquellas zonas de la piel con mayor irrigación o que está sometidas a microtraumatismos, el proceso es más rápido. En este caso, la producción celular es más elevada, existe un incremento del grosor de la capa córnea y una mayor concentración de queratina.

La epidermis plantar se caracteriza por estar más queratinizada que la epidermis que no soporta apoyo. El estrato córneo plantar (de 600  $\mu$  de grosor) es 60 veces más grueso que el del abdomen o la espalda. Esto se debe a la presencia de un mayor número de células, que pueden ser hasta 30 veces más gruesas que las células del estrato córneo menos queratinizado, característico de otras zonas del cuerpo. Esta diferenciación respecto a otros tipos de piel hace que la superficie plantar del pie sea un reservorio ecológico en el que los agentes patógenos pueden producir lesiones distintas de las lesiones originadas por los mismos agentes patógenos en otras zonas de la piel [5].

El integumento plantar es una barrera defensiva con un potencial de crecimiento elevado. Está bien adaptado para el apoyo, compresión, cizallamiento, torsión y fricción consecuente a la deambulación [6; 7].

## **1.2 Verrugas**

Las verrugas son tumores benignos intraepidérmicos de la piel y la mucosa causadas por la infección del virus del papiloma (VP) [8 - 10]. Estos virus no causan signos ni síntomas agudos, sino que provocan una expansión focal y lenta de células epiteliales

[10]. Las lesiones pueden remitir espontáneamente por acción del sistema inmune del huésped [11], pueden permanecer subclínicas durante periodos prolongados o pueden crecer para formar grandes masas que persisten durante meses o años [10].

### **1.2.1 Etiología**

Los papilomavirus son virus DNA de la familia papovaviridae. El nombre de la familia viene designada por la combinación de las letras iniciales de cada uno de sus géneros mayores (*PApilomavirus*, *POliomavirus* y *virus VAcuolizante de los simios*) [12].

El nombre del género *Papillomavirus* deriva del latín *papilla*: pezón y, del griego *oma*: tumor [13]. El virus del papiloma, de aproximadamente 55 nm de diámetro, presenta una cubierta esférica o cápside compuesta por dos proteínas codificadas por el virus [14].

M.J. Strauss y colaboradores demostraron el origen vírico de las verrugas en 1949 [15; 16].

Los virus del VP pueden encontrarse en muchas especies, entre ellas los seres humanos [17]. Dado que los VP son específicos del huésped, el subgrupo de VP humanos (VPH) sólo infecta a seres humanos [9; 10].

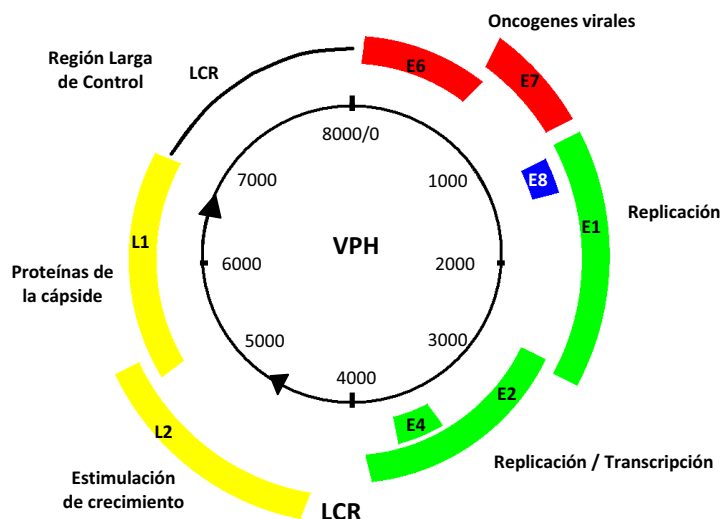
### **1.2.2 El genoma de VPH**

El genoma de los VP se encuentra en el interior del virus como un único círculo cerrado de 5,2 millones de daltons (Da) en forma covalente de DNA bicatenario [10]. Cada genoma está formado por 8.000 pares de bases (pb) de nucleótidos, sin cubierta lipídica pero protegido por una cápside icosaédrica de proteína viral de aproximadamente 52-55 nm de diámetro. Esta proteína, a su vez, está compuesta de

72 proteínas capsoméricas (sesenta hexaméricas y doce pentaméricas) que cierran el genoma viral. [10; 17 - 23].

El genoma del VPH consta de tres dominios [10; 12; 23]. (Fig. 1.1):

1. Posee ocho pautas de lectura abierta (*Open Reading Frames, ORF*) de expresión precoz, designados con la letra E (*Early*). Contiene los genes E1 al E7, que codifican las proteínas implicadas en el proceso de replicación y transcripción del DNA vírico;
2. Dos pautas de lectura abierta de expresión tardía, designados con la letra L (*Late*); contiene los genes L1 y L2, que intervienen en la producción de las proteínas de la cápside; y
3. Una región de control larga no codificable (URL), que recibe el nombre de región reguladora (URR)



**Fig. 1.1**  
Organización genética de los papilomavirus

### 1.2.3 Función de los genes del VPH

- La proteína E1 es primordial para la replicación plasmídica del DNA. Se trata de una proteína reguladora que se une de manera específica al lugar de origen de la replicación, contenido en la URR vírica. Cuando a esta unión, de baja afinidad, se le agrega la proteína E2, pasa a ser de alta afinidad [24]. La región que codifica la proteína E1 es la más conservada de todos los VPH. Esta proteína tiene un peso molecular de 68 kDa, y se expresa en bajos niveles en células VPH-positivas [23; 25]. La E1 forma dos dominios: el N-terminal es el responsable de la unión al DNA y, el C-terminal que es el responsable de la actividad enzimática. Además, la proteína E1 se une al DNA polimerasa  $\alpha$  y ayuda a incorporar complejos de la replicación celular para la replicación viral [23].
- La proteína E2 se necesita para la replicación viral y la regulación de la transcripción. Con un peso molecular aproximado de 50 kDa funciona como dímero<sup>1</sup>. Esta proteína ejerce tanto un efecto positivo como negativo sobre la transcripción [26; 27].
- La proteína E4 no tiene una función muy conocida. Se supone que contribuye a la salida del virus mediante la interrupción de la red de citoqueratina, permitiendo el fenómeno de coilocitosis [8; 16; 20; 28; 29].
- La proteína E5 es una proteína asociada a la membrana celular que actúa sobre el receptor queratinocítico del factor de crecimiento epidérmico. Frena la degradación o aumenta la vida media de sensibilidad de este factor [30; 31].
- La proteína E6 y E7 son las principales oncoproteínas de los VPH. Interfieren en el ciclo celular y mecanismos de apoptosis, permitiendo potencialmente la proliferación y transformación que parece ser un mecanismo importante en el proceso de carcinogénesis inducido en ciertos tipos de VPH [32; 33].

---

<sup>1</sup> Dímero: complejo macromolecular formado por dos macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, por lo general mediante enlaces no covalentes. Es un tipo de estructura cuaternaria de las proteínas

- La proteína L1 es el componente principal de la cápside, representa entre el 80-95% del peso del virión. Tiene un peso molecular de 56 kDa. Es un antígeno específico de grupo y se expresa en las lesiones de coilocitosis. Como es una región altamente conservada entre los diversos tipos de VPH, sirve como molde para diseñar los *primers* de consenso, que permiten detectar VPH con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [8; 20; 23; 28; 34].
- La L2, proteína estructural menor, tiene un peso molecular entre 49-60 kDa y es más variable entre los diversos tipos de VPH. Tiene la función de completar el acoplamiento de la cápside mediante la introducción del DNA vírico a las partículas formadas por la fusión de los dos componentes estructurales de la cápside, las proteínas L1 y L2 [34]. La transcripción de las regiones tardías parece estar influenciada por reguladores celulares, que aparecen sólo en las células de las capas superiores e intermedias del epitelio escamoso [8; 17; 20; 21; 28].
- La región no codificable o *Upstream regulatory region* (URR) contiene el lugar donde se inicia la transcripción y la replicación.

#### 1.2.4 Ciclo biológico

La infección del VPH se produce por inoculación directa mediante contacto a través de fricción con individuos que presentan lesiones asociadas con el VPH clínicas o subclínicas, o indirectamente a través de superficies y objetos contaminados. La autoinoculación es otra vía de diseminación del virus [8; 9; 10; 14].

El virus se replica dentro del núcleo y produce lesiones hiperproliferativas [48]. Las partículas del virus del papiloma sólo se han encontrado en el núcleo y nucleolo de las capas de queratina y estrato granuloso de la epidermis [10].

El contagio de estos virus favorece el crecimiento de células córneas (acantosis), engrosamiento de la piel, y la producción de queratina (hiperqueratosis) [35].

La inoculación del virus en los queratinocitos basales, objetivo de la infección por VPH, es viable a través de la alteración mecánica de la barrera cutánea que provoca un defecto del epitelio [9; 10]. Es probable que pequeños traumatismos y la maceración de la piel sea un factor predisponente importante [36], como indica la mayor incidencia de verrugas plantares en nadadores que frecuentan piscinas públicas.

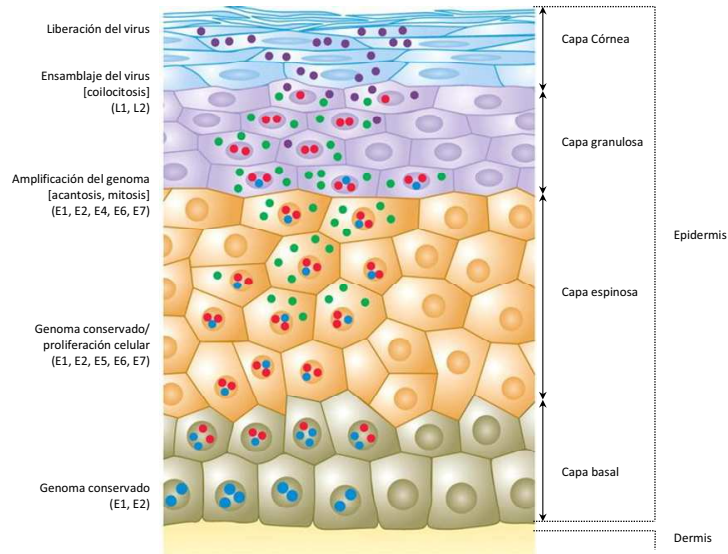
El heparán sulfato de la superficie celular, que está codificado por proteoglucanos y se une con alta afinidad a partículas de VP, es necesario para la entrada, si bien no se han identificado receptores de VPH [36; 37]. El virus ataca las capas de queratina y granular de la epidermis y, la producción de proteína. El DNA viral tiene lugar en la capa espinosa superior, con el ensamblaje final del virus en la capa granular. El genoma del virus no se integra en el DNA de la célula del huésped, sino que permanece libre en el núcleo de la célula [18; 19]. Una sola copia o unas pocas copias del genoma viral son mantenidas como un plásmido extracromosómico dentro de las células basales epiteliales infectadas. Cuando estas células se dividen, el genoma viral también se replica y se reparte entre cada célula de la división; después es transportado dentro de las células replicadas cuando migran en sentido ascendente para formar las capas diferenciadas.

En la figura 1.2 se esquematiza el ciclo viral de VPH, mostrando la función de los diferentes genes en los diferentes estratos de la epidermis [29].

La incubación del virus del papiloma oscila entre 4-20 meses [37], tras los cuales aparece la verruga. La superficie rugosa de la verruga puede lesionar la piel adyacente y permitir la inoculación del virus en zonas próximas, con la aparición de nuevas verrugas en semanas o meses. Cada nueva lesión es debida a la exposición inicial o a la diseminación de otra verruga. No hay evidencias de diseminación hematógona.

La expresión de RNA viral (transcripción) es sumamente baja hasta la parte superior de la capa de Malpigi, justo antes de la capa granulosa, donde la síntesis de DNA viral suele determinar cientos de copias de genomas virales por célula. El DNA recién

sintetizado es empaquetado en los viriones nucleares de estas células de Malpigi diferenciadas.



**Fig. 1.2**  
Ciclo biológico del VPH

Se postula el hecho que la proteína viral (denominada E1-E4) pueda provocar colapso de la red de filamentos de queratina citoplasmática, lo que facilitaría la liberación de viriones al citoesqueleto con uniones transversales de los queratinocitos, de forma que el virus puede ser inoculado en otro lugar o descamado hacia el entorno.

### 1.2.5 Tipos de papilomavirus humano

El *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) ha reconocido y dividido oficialmente los miembros de la antigua familia de papovavirus en dos de separadas: papilomavirus y poliomavirus. Esta clasificación biológica se basa en criterios bien definidos, fundamentados en la disposición de algunos nucleótidos a lo largo del DNA vírico o genoma y, en concreto, el gen L1, que codifica la forma de la cápside [38].

Se determina un nuevo *tipo* de VPH cuando el genoma completo presenta en la secuencia del gen L1 una divergencia de al menos un 10% respecto a cualquier otro tipo que haya sido descrito. Estos nuevos tipos vienen dados por cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas virales codificadas [39]. Si la diferencia en la región L1 es entre el 2-10% respecto a un VPH ya conocido, se tratará de un *subtipo* [39; 40]. Si las diferencias son inferiores al 2%, se considera una *variante*. Las variantes de un mismo tipo viral muestran diferencias biológicas y patológicas de gran importancia clínica [38].

El *género* es otra relación filogenética entre los tipos de VPH. La nomenclatura de los géneros se basa en el alfabeto griego, siendo esta designación aceptada rápidamente y ampliamente usada por los miembros del ICTV y comunidad investigadora del VP [12]. Los tipos de VPH descritos según las secuencias de su DNA están distribuidos en 5 géneros (*Alfa-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Mu-*, y *Nu-VPH*) y sólo 16 especies infectan la piel [15; 41; 42].

En 2004, habían identificados más de 200 tipos de VP, de los cuales 130 se habían aislado y caracterizado mediante la secuenciación del DNA de la región L1 del genoma viral [12; 20; 43 - 45]. La figura 1.3 muestra el árbol filogenético que contiene las secuencias de 118 tipos de VP (96 del tipo VPH y 22 tipos del VP animal) según las secuencias completa de L1 ORF. El número al final de cada rama identifica el tipo de PV. El número en el exterior del semicírculo pequeño indica las diferentes especies de PV y por fuera de los semicírculos mayores los diferentes géneros virales.

La descripción de nuevos VP ha determinado el aumento de la clasificación de la familia *Papillomaviridae* que ahora contiene 29 géneros, formados por 189 tipos de VP, de los cuales, 120 son VPH, 64 de mamíferos no humanos, 3 de aves y 2 de reptiles. Para incluir el número de géneros de PV que exceden el alfabeto griego, se ha utilizado el prefijo “*dyo*”<sup>2</sup> después del género omega-VP. Se propone omitir las designaciones Dyoalfa, Dyobeta y Dyogamma debido a que los géneros *alfa-VP*, *beta* y *gamma*

---

<sup>2</sup> Prefijo *dyo-*, del griego que significa *segunda vez*



incluyen los VPH más frecuentes y médicamente más importantes. De esta manera el nuevo género se designa como Dyodelta-VP (Fig. 1.4) [42].

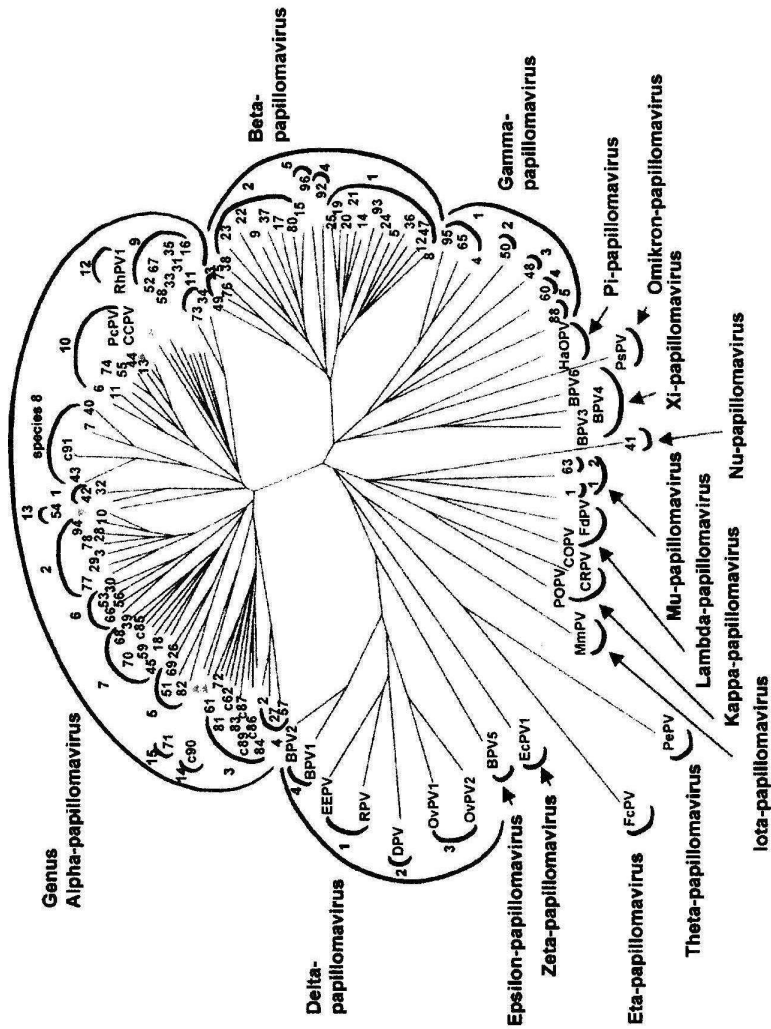
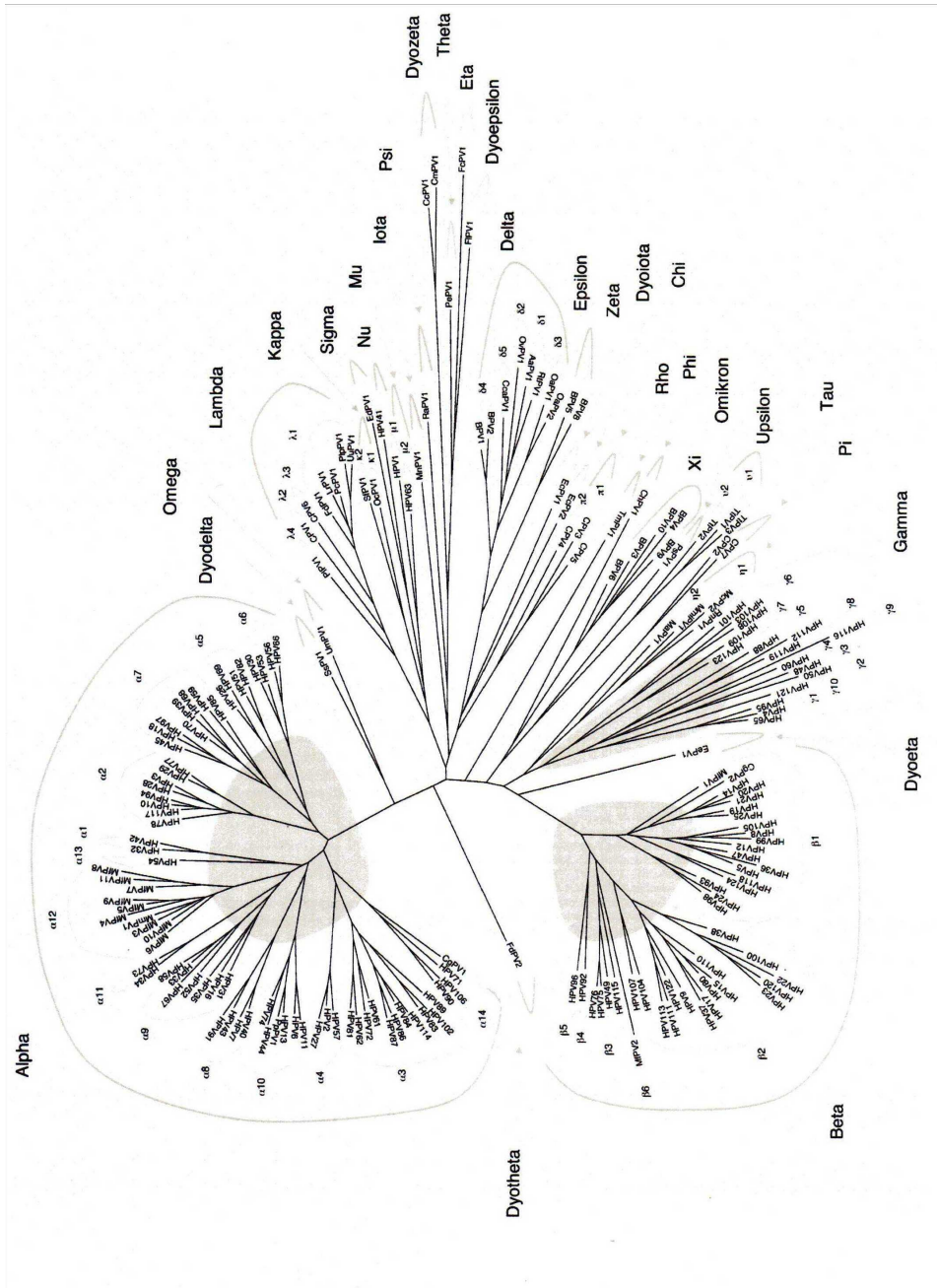


Fig. 1.3  
Cladograma con los diferentes tipos de VP (de Villiers, 2004)



**Fig. 1.4**  
Cladograma con actuales géneros de VP (Bernard, 2010)

Los VPH han sido clasificados en tres grupos según su especialización, a partir de diferentes según estudios, clínicos, virológicos y epidemiológicos [9; 10; 40]:

- Extragenitales o cutáneos: Aislados en lesiones verrugas vulgares y planas, como VPH-1, 2, 3, y 4.
- Mucogenitales: Afectan a mucosas tanto orofaríngeas como la región anogenital. Dentro de este grupo podemos distinguir los VPH de bajo riesgo que raramente producen una transformación maligna (VPH-6, 11) aislados en condilomas acuminados y papilomas de laringe. Los de alto riesgo (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, y 52) se han identificado en cáncer uterino, pene, vulva, ano y, algunos cánceres laríngeos y esofágicos entre otros.
- Los aislados de las lesiones de pacientes con epidermodisplasia verruciforme (EV). Los más importantes son VPH-5 y 8; también caben destacar el VPH-1, 7, 14, y 20.

### **1.2.6 Epidemiología**

La adquisición de VPH depende de varios factores, tales como la localización de las lesiones, la cantidad de viriones infecciosos presentes, el grado y el carácter de contacto, y el estado de inmunidad general y específico para VPH del individuo expuesto. La disminución de la frecuencia de verrugas con la edad implica que, con el tiempo, se desarrolla resistencia a la infección, y gran parte de ella puede ser inmunitaria.

Se considera que la fuente o el reservorio de VPH son individuos con infección clínica y subclínica, así como la presencia del virus en el ambiente.

No se conoce la prevalencia exacta de las verrugas cutáneas, pero son muy frecuentes, afectando al 7-10% de la población [46]. Existen escasos estudios sobre la incidencia y

frecuencia de las verrugas plantares en grupos de población definidos. Según diferentes estudios consultados sobre la incidencia de verrugas plantares en población británica, algunos autores refieren una afectación entre el 3 y el 9% de la población infantil [47], los hay que afirman que esta afectación es en un tercio de los niños de primaria [41]. Según Stender, aproximadamente el 22% de los niños en edad escolar tiene verrugas [48], si bien Kirnbauer afirma una prevalencia del 10% en niños de 2 a 12 años [8]. Las verrugas virales se encuentran entre las tres dermatosis más frecuentes en este grupo de edad, y la frecuencia es igual en ambos sexos. Los pacientes que viven en familias numerosas, a menudo refieren la infección de otro miembro de la familia, lo que apoya el concepto de transmisión persona a persona. La mayoría de las verrugas desaparecen espontáneamente en 1-2 años. La reinfección por el mismo tipo de VPH es poco frecuente después de la desaparición, lo que sugiere que se puede desarrollar inmunidad específica de tipo protector [8].

En cuanto a los porcentajes de frecuencia de aparición de verrugas plantares según la edad, Luger *et al.* consideran que el pico mayor se encuentra entre los 16-20 años [49], con una incidencia del 10% entre niños y adultos jóvenes [50, 51]. Esto se debe a que en esta etapa de la vida se produce un aumento de la sudoración, lo que favorece la apertura del poro de la piel y la penetración del virus en la epidermis. Hay autores que consideran que el 65% de los casos se produce entre el intervalo de edad de 5 a 20 años [52 - 55].

La relación entre la presencia de verrugas y el sexo difiere entre los autores. Mientras que los hay que no hallan diferencias entre ambos sexos [52 - 55], hay quien estima que hay una mayor frecuencia en el sexo femenino [56].

En cuanto a la localización, las verrugas plantares aparecen más frecuentemente en zonas de presión como son el talón y zona metatarsal. Un estudio de la Universidad de Sevilla sobre verrugas plantares, refiere su presencia en zonas de presión en un 72%, un 19% en zonas de media carga y un 9% en zona de no apoyo [52]. Otro estudio, en este caso de la Universidad Complutense de Madrid, concluye que la localización más frecuente es en la zona metatarsal, en un 80% [55].

La causa que puede favorecer la aparición de verrugas plantares, es la contaminación de los lugares donde transite un elevado número de personas, con una temperatura y un nivel de humedad relativa elevadas. Zonas húmedas donde se camina descalzo son una fuente de transmisión de enfermedades víricas. Por ejemplo, vestuarios, duchas, colchonetas, tatamis, etc. [8 - 10; 57 - 59].

El contacto de la piel con instrumentos contaminados, como piedra pómez, limas, cuchillas, etc., también puede producir contagio directo por inoculación del virus.

El contagio por autoinoculación provocada por el rascado por parte del paciente de la zona infectada de una parte a otra del cuerpo provoca la extensión de la lesión a otras zonas del cuerpo [8 - 10; 14; 60 - 62].

### **1.2.7 Manifestaciones clínicas**

La morfología clínica y localización de la verruga determinan la estructura de la misma; es decir, si muestran hiperqueratosis, paraqueratosis y papilomatosis [63].

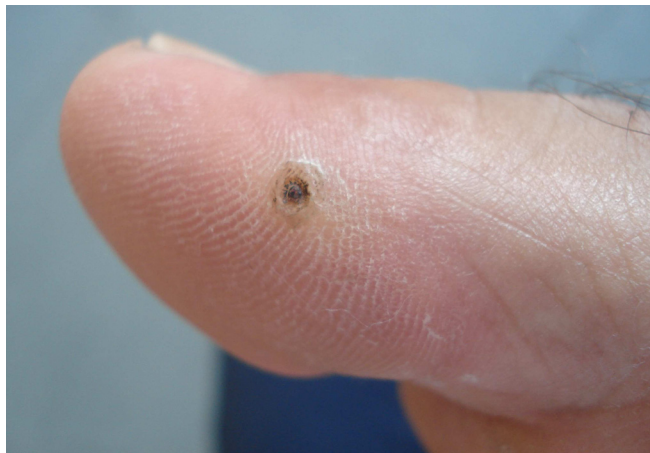
La clasificación de las verrugas se basa en su morfología y localización anatómica. Sin embargo, estudios recientes indican que las características histológicas y clínicas de las verrugas están determinadas por el genotipo viral, y señalan que la identificación del tipo de VPH podría permitir una clasificación más precisa [8, 14].

Entre todos los genotipos de VPH se incluyen un pequeño grupo de virus que infectan la piel y producen verrugas vulgares (*verrucae vulgaris*), verrugas palmares y plantares (*verrucae palmares et plantares*), verruga en mosaico, verrugas planas (*verrucae planae*) y verrugas del carnicero [8].

#### **1.2.7.1 Verrugas vulgares**

Son pápulas o nódulos escamosos, hiperqueratósicos, exofíticos en forma de cúpula con un núcleo queratósico rodeado de un borde hiperqueratósico y se

asocian generalmente a VPH-1, 2, y 4. Se localizan en cualquier superficie cutánea siendo frecuentes en los dedos, la superficie dorsal de las manos y otras zonas que sufren microtraumatismos, como las rodillas y los codos, pero pueden aparecer en cualquier localización anatómica. Se presentan con forma filiforme o como durezas cutáneas. Se caracterizan por puntos negros que representan capilares trombosados y hemorragia capilar que sigue al rasurado de la superficie hiperqueratósica (Fig. 1.5). La autoinoculación por rascado puede determinar que las verrugas aparezcan alineadas [8; 44; 64].



**Fig. 1.5**  
Verruga vulgar en borde lateral del 1<sup>er</sup> dedo del pie

#### 1.2.7.2 Verrugas plantares y palmares

En su inicio, tienen el aspecto de una pápula pequeña y brillante en forma de grano de mijo, pero después adopta su forma característica de lesión redondeada bien definida con una superficie rugosa de color de la piel, amarillenta o marrón, rodeada de un anillo liso de capa córnea engrosada [65; 79].

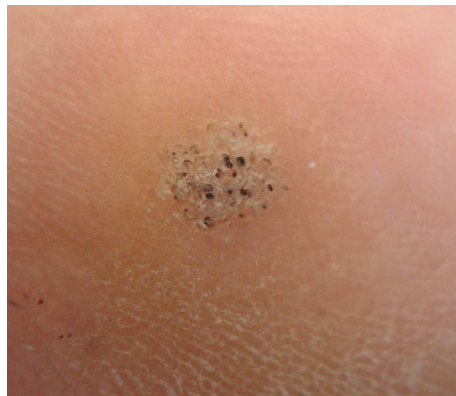
Las verrugas tipo mirmecia son pápulas gruesas de superficie lisa y profunda, endofíticas e hiperqueratósicas en las plantas, palmas y bordes laterales de las

manos y pies, con márgenes inclinados con una depresión central que recuerda un hormiguero (de ahí el término mirmecia, que significa hormiguero) (Fig. 1.6). En la planta son dolorosas al andar debido al crecimiento profundo hacia dentro, siendo este más agudo si la lesión se encuentra cerca de una terminación nerviosa [8; 48; 66].



**Fig. 1.6**  
Mirmecia en verruga plantar

Los puntos negros que se observan después de rasurar la superficie externa queratinosa representan capilares trombosados de la verruga (Fig. 1.7).



**Fig. 1.7**  
Capilares trombosados

Las verrugas en mosaico son lesiones más superficiales fruto de la coalescencia de verrugas plantares o palmares en grandes placas. Son poco dolorosas. [8 - 10; 44]. Pueden estar causadas por el VPH-2 [62] (Fig. 1.8).



**Fig. 1.8**  
Verruga en mosaico en cabezas metatarsales.

Se han observado verrucosis extensa crónica marcadamente resistente al tratamiento en pacientes inmunodeprimidos, y a veces en pacientes sin disfunción inmunológica aparente [8].

Las verrugas de inclusión o quistes verrucosos plantares en las plantas son quistes con epitelio arrugado, de 1,5-2 cm, en la superficie plantar. Los quistes tienden a aparecer en zonas de apoyo, sugiriendo que la epidermis infectada por el VPH se introduce en la dermis formando el quiste [67]. Se han aislado los tipos VPH-4, 60, 63 y 65 de VPH [62; 68].

En un amplio estudio realizado en Europa, la mayoría de las verrugas palmoplantares estaban producidas por los tipos de VPH-2, 27 y 57, que están íntimamente relacionados y que aparecen con más frecuencia en pacientes de 6-10 años [69].



El VPH-60 origina un tipo de verruga plantar llamada *verruca en cresta*, por la presencia de dermatoglifos sobre su superficie. Por lo general, las verrugas son pápulas del color de la piel, ligeramente elevadas, de 3 a 5 mm. No aparecen en zonas de apoyo, a diferencia de las verrugas plantares típicas [67].

#### 1.2.7.3 Verrugas planas

Son pápulas color piel o rojizas, de superficie lisa, de 1 a 4 mm, ligeramente sobreelevadas, con escamas mínimas, localizadas con frecuencia en el dorso de las manos, brazos, piernas o cara, y a menudo alineadas (Fig. 1.9). Habitualmente están producidas por los tipos 3 o 10, y con menos frecuencia por VPH-28 y 29 [8 - 10].

#### 1.2.7.4 Verrugas del carnicero

Reciben este nombre porque se observan en profesionales que procesan carne. Son pápulas verrugosas extensas o lesiones en forma de coliflor en el dorso, palma o bordes periungueales de las manos y dedos y se asocian a VPH-7 [70]. No existe evidencia que el causante sea un virus de papiloma animal [8; 14]. La combinación de maceración y trauma parece ser un factor predisponente en su aparición [14].



**Fig. 1.9**  
Verruga plana en dorso del pie

La tabla 1.1 muestra las diferentes manifestaciones clínicas de los tipos de VPH que afectan a la piel del pie, así como la asiduidad de su aparición, según diferentes autores. Puede comprobarse que hay disparidad entre alguno de ellos.

**Tabla 1.1**  
Asociaciones clínicas de los tipos de papilomavirus humano (VPH)

Manifestación clínica	Tipo de VPH		Autor
	Más frecuente	Raramente detectable	
Lesiones de la piel Verrugas vulgares/comunes	1, 2, 4	26, 27, 29, 41, 57, 60, 63, 65	Handisurya <sup>[14]</sup>
	2, 4, 27, 29	1, 16, 18, 31, 33-35, 39, 40, 51-60	Androphy <sup>[79]</sup>
	2	1, 4, 7	Odom <sup>[67]</sup>
	2, 27, 57		De Villiers <sup>[12]</sup>
	1,2, 4		Yelverton <sup>[9]</sup>
	2, 4	26, 29, 49, 57	Conejo <sup>[62]</sup>
	2a, b, c, d, e	4	Weston <sup>[85]</sup>
	1, 2, 4, 27, 57, 63		James <sup>[66]</sup>
	1, 2, 4	26, 27, 29, 41, 57, 60, 63, 65	Handisurya <sup>[14]</sup>
	1	2, 4, 27, 29	Androphy <sup>[79]</sup>
	1	2, 4, otros	Odom <sup>[67]</sup>
	1		Orth <sup>[133]</sup>
	1,2, 4		Yelverton <sup>[9]</sup>
	1		Conejo <sup>[62]</sup>
	1a, b, c, 4, 60, 63, 65		Weston <sup>[85]</sup>
	1, 2, 4, 27, 57		James <sup>[66]</sup>
Verrugas planas	3, 10	28, 29	Handisurya <sup>[14]</sup>
	3, 10, 28, 49		Androphy <sup>[79]</sup>
	3, 10, 28, 29, 77, 78, 94, 117		Bernard <sup>[42]</sup>
	3	10, 27, 41	Odom <sup>[67]</sup>
	3, 10		Yelverton <sup>[9]</sup>
	3, 10	28, 29	Conejo <sup>[62]</sup>
	3a, b; 10a, b		Weston <sup>[85]</sup>
	3, 10, 28, 41		James <sup>[66]</sup>

### 1.2.8 Histopatología

Las verrugas se caracterizan por acantosis de la epidermis con papilomatosis, hiperqueratosis y paraqueratosis. Las crestas interpapilares alargadas a menudo apuntan al centro de la verruga. Los capilares de la dermis son prominentes, pueden

estar trombosados, y observarse la presencia de células mononucleares [9; 10; 71]. Las verrugas asociadas a VPH se caracterizan por queratinocitos grandes con un núcleo picnótico excéntrico rodeado por un halo perinuclear (coilocitos) [63; 71].

Las verrugas palmoplantares, mediante microscopia de bajo aumento, se observan bien delimitadas de la piel circundante, existe ortoqueratosis y paraqueratosis intensas, acantosis y papilomatosis extensas. Las crestas epidérmicas penetran en la dermis más que las de la piel no afectada y las crestas de los bordes laterales de la verruga se inclinan hacia adentro, creando una invaginación en forma de copa por debajo de la papilomatosis [8].

La dermis papilar por debajo de las crestas elongadas muestra un aumento de vascularización, con alguna trombosis. Estas trombosis corresponden a los “puntos negros” (capilares trombosados) que se observan en la exploración clínica, sobre todo en verrugas deslaminadas [8].

A mayor aumento, se observan numerosos gránulos eosinofílicos intracitoplasmáticos similares a la queratohilaina dentro de las células epiteliales del estrato inferior de Malpigio. En niveles epiteliales superiores, los gránulos confluyen y forman cuerpos de inclusión más grandes; se pueden detectar también núcleos vacuolados, halos perinucleares y gránulos eosinofílicos intranucleares [8, 68].

Las verrugas planas tienen menor acantosis e hiperqueratosis, no contienen paraqueratosis o papilomatosis, pero tienen abundantes coilocitos [71].

### **1.2.9 Diagnóstico**

El diagnóstico generalmente es clínico [72], si bien actualmente existen métodos diagnósticos basados en la detección del DNA viral [28]. Estos son la PCR (polymerase chain reaction) y la hibridación *in-situ* [28].

Los signos clínicos incluyen líneas de la piel divergentes, múltiples puntos pequeños y oscuros e, hiperqueratosis. Los pliegues papilares de normales de la piel, dermatoglifos, no sobrepasan la superficie de la verruga [73]. Una vez deslaminada la zona, pueden observarse múltiples puntas capilares perpendiculares a la superficie de la lesión. Cuando el deslaminado es más profundo estos pueden sangrar [74] (Fig.1.10).

La compresión de la verruga plantar de medial a lateral, a modo de pellizco, realizada por el clínico, provoca dolor agudo [75; 76]. Esta maniobra exploratoria recibe el nombre de signo del timbre [77].



**Fig. 1.10**  
Aspecto de una verruga plantar una vez deslaminada. Pueden apreciarse las líneas divergentes de la piel y el sangrado de los capilares

La dermatoscopia es una técnica sencilla, simple y no invasiva que permite la visualización de características morfológicas de la piel que no son visibles a simple vista, formando un vínculo entre dermatología clínica macroscópica y dermatopatología microscópica; siendo útil el uso del dermatoscopio a la hora de realizar el diagnóstico de verrugas [64].

También pueden realizarse pruebas basadas en la respuesta tisular, a través de la microscopía óptica o electrónica. El estudio de la biopsia de toda la lesión o parte de ella por un especialista en anatomía patológica también puede confirmar el diagnóstico [78].

### 1.2.10 Diagnóstico diferencial

Lesiones comunes pueden asemejarse a las verrugas. El diagnóstico diferencial varía considerablemente según el tipo de lesión y localización [8; 78; 79]. Las que aparecen en la tabla 1.2, se han centrado a nivel de la planta del pie.

**Tabla 1.2**

Diagnóstico diferencial de lesiones de tipo verrugoso en palmas y plantas

Localización	Número de lesiones	
	Lesión aislada	Lesiones múltiples
Palmas y plantas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiloma, callo/heloma</li> <li>- Queratosis plantar intratable</li> <li>- Poroqueratosis punteada, porosa y punteada hiperhidrótica</li> <li>- Angioqueratoma</li> <li>- Quiste de inclusión epidérmico (Inclusión de cuerpo extraño)</li> <li>- Carcinoma escamoso</li> <li>- Carcinoma verrucoso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Helomas miliares</li> </ul>

#### *Tiloma*

Lesión hiperqueratósica difusa de color amarillento, sin núcleo [80; 81].

#### *Callo o Heloma*

Los callos y las callosidades son áreas de piel engrosada que aparecen en sitios de presión o de fricción prolongada.

El heloma o callo presenta un engrosamiento de todas las capas de la epidermis y está más circunscrito (2-5 mm) que la callosidad. Aparecen como una masa córnea, seca y dura de color beige, amarillento o blanco-amarillento y puede ser doloroso a la presión. La eliminación de la superficie de la lesión pondrá al descubierto un núcleo central en un callo. En el centro se aprecia un núcleo compacto de coloración más pálida, que se extiende hacia el interior de la epidermis. La eliminación de la superficie de estas lesiones pondrá al descubierto los dermatoglifos [80; 82 - 85].

#### *Heloma por inclusión*

La cronificación de un heloma provoca que su base se haga más profunda y forme un núcleo quístico-fibrótico [82].

#### *Helomas miliares*

En caso de apreciarse formaciones de queratina bien encapsulada en forma de heloma de pequeño tamaño y poca profundidad reciben el nombre de helomas miliares [82].

#### *Queratosis plantar intratable*

Mann y Duvries introdujeron el término queratosis plantar intratable (IPK) para describir una callosidad plantar sintomática que no se resuelve [40].

#### *Poroqueratosis*

Trastorno crónico y progresivo de la queratinización, caracterizado por pápulas o placas hiperqueratósicas anulares bien delimitadas, rodeadas por un anillo hiperqueratósico elevado asociado a un área de atrofia central [66; 84].

#### *Angioqueratoma*

Se aplica a un conjunto de enfermedades agrupadas bajo una base clínica de lesiones vasculares. Las malformaciones capilares hiperqueratósicas se distinguen por una epidermis hiperqueratósica y acantosis recubriendo una malformación capilar [84; 85].

### *Quiste de inclusión epidérmico*

Formación quística secundaria a la inclusión traumática de la dermis. Una vez dentro de la dermis, las células epidérmicas crecen lentamente y producen una cavidad quística cuyo interior contiene partículas de queratina y lípidos. Esta implantación de epidermis dentro de la dermis puede ser consecuencia de una cirugía, fuerzas biomecánicas o en conjunción con la penetración de un cuerpo extraño [86].

### *Carcinoma verrucoso*

Variante del carcinoma epidermoide, que se denomina de varias formas según su localización anatómica. Cuando se encuentran en el pie se denominan carcinomas o epiteliomas cuniculados. Su aspecto es el de una gran verruga plantar de aspecto verrucoso y endofítico, en cuya superficie se observan múltiples orificios a modo de túneles. Son tumores de crecimiento lento [87].

## **1.2.11 Tratamiento**

El abordaje terapéutico óptimo suscita controversias. El tratamiento ha de ser de fácil aplicación, económico, eficaz y libre de efectos secundarios. No se ha mostrado que exista el tratamiento efectivo al 100% [88].

El tratamiento de las verrugas depende del grado de molestia física y emocional, de la extensión y duración de las lesiones, del estado inmunológico del paciente y del deseo de tratamiento de éste. El objetivo del tratamiento se basa en eliminar la verruga, sus signos y síntomas.

El tratamiento ideal sería aquel que cura todas o un elevado porcentaje de verrugas, en una o tres sesiones, indoloro, que no provoque cicatrices, que ofrezca inmunidad al HPV de por vida y esté disponible para todos los pacientes [71]. En 1995, la Academia Americana de Dermatología estableció una serie de criterios para la indicación del

tratamiento de las verrugas [71]: 1) Deseo del paciente para la terapia, 2) síntomas de dolor, sangrado, pinchazo o quemazón, 3) lesiones incapacitantes o desfigurativas, 4) elevado número o gran tamaño de las lesiones, 5) deseo del paciente para prevenir la diseminación de las verrugas a piel sana, tanto suya como la de los demás, 6) enfermedad con un compromiso inmunológico.

Existen numerosas opciones de tratamiento para la eliminación de las verrugas. Entre las cuales cabe destacar los siguientes:

#### *Tratamientos físicos*

- Crioterapia: La congelación provoca destrucción del tejido mediante el efecto del frío producido sobre la célula y su aporte vascular y, se cree que también estimula el sistema inmune [89]. Puede realizarse con nitrógeno líquido, dióxido de carbono, dimetil-éter-propano, etc.
- Terapia hipertérmica:
  - o Láser: El tratamiento de las verrugas mediante láser se basa en la elevación exógena de la temperatura del tejido (hipertermia local), ya que está comprobado que el tejido infectado es más sensible a los efectos de la temperatura elevada que el tejido normal [90], destruyendo la red capilar que nutre a la verruga [91].
  - o Terapia fotodinámica (TFD): En la TFD se usa una reacción química activada por la energía de la luz para destruir el tejido de forma selectiva [92]. Tiene un efecto antiinflamatorio y antiproliferativo sobre las verrugas. La TFD destruye los queratinocitos infectados y las partículas virales de los virus sin cubierta [93].



### *Tratamientos químicos*

Se trata de la aplicación tópica de preparados comerciales o el principio activo formulado. Su mecanismo de acción consiste en provocar la coagulación química de las proteínas. Pueden ser:

- Alcalis, como el hidróxido de potasio.
  
- Sales:
  - Nitrato de plata: Produce alteración de las proteínas celulares, provocando su desnaturalización y precipitación. A concentraciones altas presenta acción cáustica [94].
  
- Ácidos:
  - Acido salicílico: Se trata de un agente queratolítico, cuyo mecanismo de acción aún es incierto [95]. Se cree que actúa reduciendo la cohesión entre los queratinocitos, y permite la descamación de la superficie córnea de la piel antes de la lisis de la queratina [71; 96; 97].
  
  - Acido láctico: Sustancia queratolítica [62].
  
  - Acido tricloroacético 70-80%.
  
  - Acido monocloroacético: Compuesto irritante que rompe las proteínas y causa una reacción inflamatoria que favorece la destrucción celular [36].
  
  - Glutaraldehído: El glutaraldehído es un desinfectante con acción germicida de amplio espectro. La solución de glutaraldehído al 25% es viricida y ligeramente cáustica [94].
  
  - Podofilino-Podofilotoxina: El podofilino es extracto vegetal que se obtiene a partir de una mezcla de resinas obtenidas del rizoma del *Podophyllum*. La podofilotoxina es el ingrediente del podofilino

biológicamente activo purificado [96]. Posee acción citotóxica, inhibiendo la mitosis de las células epiteliales durante la mitosis, interrumpe el proceso de división celular y permite la necrosis celular [96; 98; 99].

- Cantaridina: (C<sub>10</sub>-H<sub>12</sub>-O<sub>4</sub>): Se trata de un anhídrido cristalino del ácido cantárico que se obtiene de la desecación y pulverización de la cantarida, insecto coleóptero de la familia Meloidae, usado como vesicante. La aplicación tópica de este compuesto formulado produce hipertermia en la piel, calor, prurito y flictenas de contenido amarillo-albuminoso. La cantaridina actúa inhibiendo la proteína fosfatasa 2<sup>a</sup>, un importante enzima en el metabolismo del glucógeno [98]. Degenera la capa desmosómica, permitiendo la separación de monofilamentos de los desmosomas por la activación o liberación de serina-proteasas neutras [100]. Este proceso permite acantolisis, flictenas intraepidérmicas y, lisis no específica de la piel [101].

#### *Tratamientos medicamentosos-inmunomoduladores*

- Interferón: Proteína segregada por células nucleadas infectadas por virus y que actúa sobre otras células vecinas, previniendo que sean infectadas, es decir, capaces de "interferir" con la replicación viral. Existen diferentes tipos de interferones. Su aplicación puede ser tópica, intralesional y sistémica en dependencia del tipo de verruga (extragenitales o mucogenital).
- Dinitroclorobenceno (DNCB): Inmunoterapia de contacto, que causa una respuesta inmune *in situ* que precipita la sensibilización al un mediada por células respuesta inmune *in situ* que precipita la sensibilización al antígeno viral mediada por células [5].
- Difenciprona (DCP): Sensibilizador estándar utilizado para la inmunoterapia tópica. No es mutagénico y está disponible en solución de acetona [102].

- Cidofovir: actúa inhibiendo la síntesis de DNA viral. No existe una pauta posológica ni duración de tratamiento establecida. Hay que tener en consideración el elevado coste asociado a la preparación del cidofovir tópico [103].
- Cimetidina: aumenta la respuesta inmunitaria bloqueando los receptores de las células T-supresoras [104].
- Imiquimod: Potente estimulador de la respuesta inmunitaria innata y adquirida, induce la formación de alfa interferón, interleuquinas y la formación de factores de necrosis tumorales, y activa citoquinas y linfocitos citotóxicos. Mediado por este mecanismo, se ha observado que disminuye los VPH [94].

### *Tratamientos antimitóticos*

#### Inhiben la replicación del VPH

- Retinoides: El crecimiento de la verruga queda afectado debido a que los retinoides interrumpen el crecimiento y la diferenciación epidérmica. También son potentes inmunomoduladores. Existe cierta evidencia de que los retinoides pueden disminuir la transcripción del VPH en las células que estén afectadas [105].
- 5-Fluorouracilo (tópico): Se trata de un citostático y antivírico capaz de inhibir la duplicación celular del VPH. Bloquea la síntesis del ácido tímídico y como consecuencia la del DNA [94; 106 - 108].

### *Tratamiento quirúrgico*

La cirugía supone la escisión primaria de la lesión. Se puede realizar mediante cirugía clásica, curetaje, electrobisturí o cirugía láser.

### *Combinación de tratamientos*

Debido a la capacidad de resistencia y la recurrencia de muchas verrugas, a veces se realizan combinaciones de terapias [71]. Como ejemplos podríamos citar:

- Ácido salicílico + ácido láctico.
- Crioterapia + ácido salicílico [109].
- Crioterapia + podofilotoxina.

### *“Tratamientos” Alternativos*

- Homeopatía: A pesar que no existe explicación científica para el mecanismo de acción de la homeopatía, ni base científica alguna, está ampliamente aceptada, a pesar del debate y la falta de base [110].
- Hipnosis: Si bien aún no está comprobado, se ha postulado que la hipnosis o terapia sugestiva podría estimular el sistema inmune durante el tratamiento de verrugas [111].
- Acupuntura.
- Remedios caseros como extracto de ajo. Se ha mostrado que componentes del ajo tienen actividad antiviral e inhiben la proliferación celular de células infectadas víricamente [112].

## **1.3 Láser**

### **1.3.1 Introducción**

El término Láser es un acrónimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. Así pues, el láser es una luz amplificada mediante la emisión estimulada de

radiación [113]. Dentro del espectro electromagnético, está localizado entre las longitudes de onda de  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  metros.

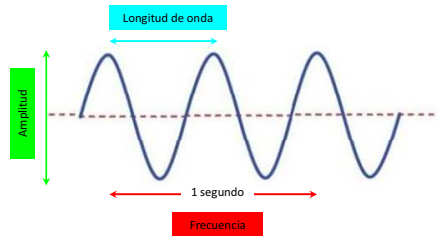
Theodore Maiman (1960) construyó el primer láser, a partir de los estudios de Charles Townes y Arthur Leonard Schawlow sobre el amplificador de microondas por emisión estimulada de radiación. El medio activo utilizado era el rubí. Este láser emitía una luz de 694 nm de longitud de onda. En 1961, Elias Snitzer construyó el primer láser de Neodimio (Nd:YAG de 1064 nm).

### 1.3.2 Principios físicos de la luz láser

El significado de cada una de las palabras que componen el acrónimo del término láser es importante para entender su funcionamiento y sus características.

La luz es una forma de energía electromagnética que se transmite mediante ondas. Estas ondas pueden definirse según tres propiedades (Fig. 1.11)

- Amplitud de onda: Distancia máxima que existe entre la cresta y el valle de una misma onda. Es la medida de la cantidad de energía que tiene una determinada onda; cuanto mayor sea la amplitud mayor será la cantidad de energía que puede realizar un trabajo útil. La energía se mide generalmente en Julios (J).
- Longitud de onda ( $\lambda$ ): Distancia comprendida entre dos puntos cualquiera equivalentes de una onda (entre dos crestas consecutivas en una onda). Se mide en nanómetros (nm).
- Frecuencia (f): Número completo de longitudes de onda que pasan durante un segundo. Se mide en ciclos por segundo y su unidad es el Hertz (Hz).



**Fig. 1.11**  
Propiedades que definen una onda

La emisión estimulada de radiación se produce cuando un átomo en estado de excitación es activado por un fotón. Cuando esto acontece, se produce un nuevo fotón que tiene idénticas características al fotón incidente. Así pues, se originan nuevos fotones que van a tener la misma longitud de onda y frecuencia [114].

La amplificación de la luz se produce cuando tiene lugar el “estado de inversión” de los átomos debido a una fuente externa de energía. Este estado se produce cuando la mayor parte de los átomos se hallan en estado de excitación. En condiciones normales estos átomos tendrían que estar en reposo mientras que unos pocos se encontrarían en estado de excitación. A la radiación que se emite se suma la radiación incidente.

### 1.3.3 Tipos de láser

Los láseres se pueden clasificar de múltiples formas; las más habituales se diferencian según su medio activo, espectro de emisión, potencia de emisión y densidad de potencia, y su forma de emisión.

- a) Según el medio activo se dividen en:
  - Gases (CO<sub>2</sub>, argón, helio-neón).

- Líquidos (colorantes inorgánicos).
  - Sólidos (Nd:YAG, Nd:YAP, Er:YAG, Er, Cr:YSGG, alejandrita, rubí, KTP, semiconductores).
- b) Según su espectro de emisión, se clasifican en base al lugar donde se sitúa la longitud de onda respecto al espectro electromagnético.
- Infrarrojos:  $\lambda > 700$  nm.
  - Visibles:  $\lambda = 400 - 700$  nm.
  - Ultravioletas:  $\lambda < 400$  nm.
- c) En función de la potencia de emisión es posible conocer los efectos y sus aplicaciones prácticas.
- Alta potencia: Se les denomina láseres quirúrgicos. Actúan sobre el tejido por medio del efecto térmico produciendo su ablación. Su utilización es principalmente quirúrgica, si bien en algunos casos se emplea como terapia no invasiva.
  - Baja potencia: Se trata de láseres terapéuticos ya que producen un efecto de bioestimulación tisular.
- d) Referente a la densidad de potencia, se clasifican en:
- Alta densidad de potencia o HLLT (*High Level Laser Therapy*): su utilidad principal es la quirúrgica.
  - Baja densidad de potencia o LLLT (*Low Level Laser Therapy*): su uso es terapéutico no invasivo.
- e) En cuanto a su forma de emitir, se clasifican en base al modo de emisión:
- Continua (*continuous wave, CW*).

- Pulsado: en este caso hay diferentes tipos en función de cómo sean estos pulsos; así pues existen láseres superpulsados, Q-switched, etc.

No obstante, la clasificación más comprensible y útil es la que hace referencia al medio activo que utilizan los láseres.

#### 1.3.3.1 Láseres sólidos

Los medios más comunes en los láseres de estado sólido son varillas de cristal de rubí y cristales con impurezas de neodimio. Los extremos de la varilla se tallan de forma que sus superficies sean paralelas y luego se recubren con una capa reflectante no metálica. Los láseres en estado sólido proporcionan las emisiones de mayor energía. Normalmente, funcionan por pulsos, generando un destello de luz durante un tiempo breve.

Se han logrado pulsos de sólo  $1.2 \times 10^{-14}$  segundos, que son útiles para estudiar fenómenos físicos de duración muy corta. El bombeo se realiza mediante luz de lámparas de xenón, lámparas de arco o lámparas de vapor metálico. La gama de frecuencias se ha ampliado desde el infrarrojo (IR) hasta el ultravioleta (UV) al multiplicar la frecuencia original del láser con cristales de dihidrogenofosfato de potasio, y se han obtenido longitudes de onda aún más cortas, correspondientes a rayos X, enfocando el haz de un láser sobre blancos de itrio.

##### 1.3.3.1.1 Láser de Nd:YAG

El láser de Neodimio: YAG es un láser sólido que está compuesto por un cristal sintético formado por itrio y aluminio y contaminado con neodimio (Nd:  $Y_3Al_5O_{12}$ ). El cristal está dopado con neodimio cuando el 1% de los átomos de itrio son sustituidos por los de neodimio.

Es un láser pulsado que emite en el infrarrojo cercano a una longitud de onda de 1064nm. Como esta longitud de onda no es visible al ojo humano se incorpora otro láser, o una luz roja, para que sirva de guía durante el tratamiento. Las longitudes de



onda más largas concentran menos energía en la dermis y la epidermis y pueden penetrar más profundamente. Para una longitud de onda de 1064 nm, la absorción de radiación por la melanina es mínima [115].

Este láser produce un elevado efecto térmico, es muy poco absorbido en la superficie, y según algunos autores su capacidad de penetración puede llegar a los 6-8 mm de profundidad [113; 116]. La utilización de un pigmento (tinta china) que crea una barrera óptica actúa como iniciador bloqueando el paso de la luz, produciendo efectos por absorción [114].

#### **1.3.4 Efectos biológicos del láser**

La extensión de los efectos del láser sobre los tejidos viene determinada por dos variables [118]:

- Los parámetros físicos y de emisión del láser.
- Las propiedades ópticas de cada tejido en particular.

##### **1.3.4.1 Parámetros físicos**

Los parámetros físicos del láser son aquellos que son propios de cada instrumento y están predefinidos por el fabricante (longitud de onda, forma, distribución y tiempo de emisión del haz), y los que pueden ser modificados por el operador.

Los parámetros que son modificables por el operador van a condicionar la diferencias entre la interacción entre láser y materia.

##### **a) Frecuencia**

Es el número de pulsos que se producen en 1 segundo y se miden en Hz. Sólo puede hacerse referencia a la frecuencia en el caso de los láseres pulsados. Los

láseres que emiten en pulsado son aquellos que durante la emisión del haz inducen algunos picos en los cuales se produce emisión mientras que en otros picos no. Mientras está activado el láser sólo habrá algunos picos durante los cuales se emitirán fotones.

b) Energía y potencia

La potencia de emisión es la energía emitida en un segundo. Su unidad es el vatio (W).

[Potencia=Energía/Tiempo].

La energía es la potencia aportada en un tiempo determinado. Su unidad es el julio (J).

[Energía=Potencia x Tiempo].

Cabe tener en cuenta que, 100 J de energía liberada pueden equivaler a 100 W aplicados en 1 segundo, pero también pueden equivaler a 10 W aplicados en 10 segundos. La energía liberada es la misma, si bien los efectos biológicos producidos sobre el tejido son totalmente diferentes y también dependerán del tiempo de irradiación. Los efectos biológicos pueden ser térmico, eléctrico, mecánico y fotoquímico [113].

c) Densidad de potencia (DP) y densidad de energía

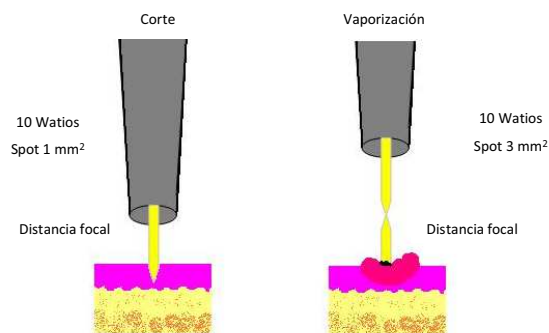
La densidad de potencia, también llamada irradiancia o intensidad, es la relación que existe entre la potencia real de salida del emisor láser y la superficie del haz (spot) que emite el mismo [119].

[DP=Potencia/área de impacto del láser= Potencia/( $\pi \times r^2$ )= W/cm<sup>2</sup>].

La densidad de potencia da el umbral del efecto de la radiación láser indicando que un láser que emite a una misma potencia puede producir diferentes efectos si se varía la superficie irradiada [120].

La superficie del haz de irradiación sobre el tejido diana (spot) puede cambiar cuando la distancia entre el láser y el tejido varía por la desfocalización del haz y por la divergencia del área iluminada.

La distancia focal es la distancia que existe entre el láser y el tejido diana con la que se obtiene la menor superficie posible del spot. La figura 1.12 muestra como cuando se irradia a distancia focal se produce un corte del tejido ya que se trabaja a la máxima concentración de potencia por unidad de superficie, mientras que si se desfocaliza el haz, se aumenta el diámetro del spot con lo que se reparte la misma cantidad de potencia en una superficie mayor, resultando en una vaporización o coagulación sobre el tejido.



**Fig. 1.12**  
Efecto de la densidad de potencia

La densidad de energía o fluencia es la relación que existe entre la potencia del láser y la superficie donde impacta el haz por unidad de tiempo [120].

$$[\text{Fluencia} = (\text{Potencia} \times \text{tiempo}) / \text{Superficie del haz del láser} = \text{W} \cdot \text{s} / \text{cm}^2 = \text{J} / \text{cm}^2]$$

### 1.3.4.2 Propiedades ópticas de los tejidos

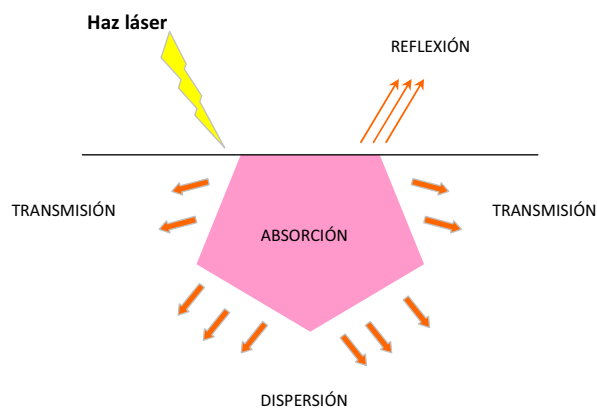
La ley de Grothus-Drayer postula que la luz sólo puede tener efectos si es absorbida por el tejido. La luz que incide sobre un tejido puede reflejarse, transmitirse, dispersarse y absorberse (Fig. 1.13).

#### a) Reflexión

Es la primera interacción de la energía láser al incidir sobre el tejido. No produce ningún tipo de efecto sobre el mismo. Este efecto es importante ya que el reflejo sobre el tejido o superficie puede afectar los ojos del operador. Es necesaria la utilización de gafas de protección para evitar esta reflexión nociva durante el uso del láser.

#### b) Transmisión

La energía que no ha sido reflejada se transmite al interior del tejido sobre el cual incide el láser.



**Fig. 1.13**  
Esquema de las propiedades ópticas de los tejidos

## c) Dispersión

La falta de homogeneidad y el índice de refracción de los diferentes tejidos por los cuales se transmite la luz es la causa por la que se produce la dispersión de la luz en el interior del tejido.

## d) Absorción

Es la que produce la transferencia de energía desde el haz de láser al tejido. El efecto del láser sobre los tejidos sólo se produce si se absorbe la luz. La absorción de la energía determina el efecto sobre el tejido y cada tejido tiene un coeficiente de absorción que depende en parte de sus características ópticas y de su longitud de onda de emisión.

Los diferentes efectos que se pueden producir en los tejidos dependen de la longitud de onda, tiempo de emisión, densidad de potencia y densidad de energía. En función de los diferentes parámetros los efectos del láser se pueden clasificar en cuatro grupos:

- Electromecánico o fotoacústico
- Fotoablativo
- Fototérmico
- Fotobioquímico

El efecto fototérmico es el más conocido y utilizado del láser. Uno de los láseres más utilizados que producen este efecto es el Nd:YAG (1064 nm). La longitud de onda es la que determina la penetración del láser en el interior del tejido en función de la absorción y la dispersión de la luz. Cuando se aumenta la densidad de potencia

también aumenta la temperatura del tejido irradiado, provocando diferentes efectos tisulares (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3.**  
Efecto fototérmico sobre los tejidos

Temperatura	Efecto tisular
42-45 °C	Hipertermia transitoria
> 65 °C	Desecación, desnaturalización proteica y coagulación
70 – 90 °C	Coagulación y fusión tisular
100 °C	Vaporización
> 100 °C	Carbonización

---

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

---





## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **2.1 Objetivos**

#### **2.1.1 Objetivo principal**

- Identificar los genotipos de los virus que ocasionan verrugas plantares diagnosticadas en el Hospital Podològic de la UB.

#### **2.1.2 Objetivos secundarios**

- Evaluar la eficacia del tratamiento de las verrugas plantares mediante el láser de 1064 nm de longitud de onda.
- Valorar el tiempo de curación de las verrugas plantares con el tratamiento con láser así como comprobar la tolerabilidad del tratamiento en estudio.

### **2.2 Hipótesis**

El genotipo predominante en las verrugas plantares diagnosticadas en el Hospital Podològic de la UB pertenecen al género *alfa*

El genotipo del virus que ocasiona las verrugas plantares no influye en la curación de las mismas con el láser de 1064 nm de longitud de onda.



---

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

- 
- 3.1 Diseño
  - 3.2 Verrugas Población en estudio
    - 3.2.1 Muestra
    - 3.2.2 Criterios de selección
  - 3.3 Metodología clínica
    - 3.3.1 Recogida de datos
    - 3.3.2 Recogida de muestras
    - 3.3.3 Descripción del aparato láser
    - 3.3.4 Metodología de aplicación del láser
    - 3.3.5 Seguimiento del paciente
  - 3.4 Metodología experimental
    - 3.4.1 Extracción del DNA cromosómico
    - 3.4.2 Cuantificación del DNA
    - 3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa
    - 3.4.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa
    - 3.4.5 Purificación de productos amplificados
    - 3.4.6 Determinación de las secuencias
    - 3.4.7 Alineamiento de secuencias
-



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

El Comité de Bioètica de la Universitat de Barcelona informó positivamente sobre este proyecto, aprobando los procedimientos del estudio.

#### **3.1 Diseño**

La primera fase de este estudio fue de tipo observacional, prospectivo, abierto carente de grupo control y unic trico. El presente estudio pretendió evaluar la eficacia del tratamiento de las verrugas plantares mediante el láser de 1064 nm de longitud de onda.

En la segunda fase se ha efectuado un estudio molecular del tejido lesional para detectar el VPH y conocer su genotipo. Las técnicas de biología molecular aplicadas a tejidos conservados permit an efectuar estudios retrospectivos de amplias series de pacientes.

#### **3.2 Población en estudio**

##### **3.2.1 Muestra**

La población objeto de estudio estuvo formada por pacientes atendidos en la *Unitat de Láser del Hospital Podol gic-Universitat de Barcelona*, diagnosticados clínicamente de verruga plantar. Todos fueron informados oralmente del objeto del estudio y se les entregó documento informativo como participante en el tratamiento de verrugas con láser (Anexo 10.1). Para poder ser incluidos como participantes, era necesaria la firma de la hoja de consentimiento informado de las características del estudio (Anexo 10.2).

### **3.2.2 Criterios de selección**

En el presente estudio se incluyeron pacientes con verrugas plantares confirmadas por diagnóstico clínico. Para ser incluidos, los pacientes debían satisfacer los criterios descritos a continuación.

### **3.2.3 Criterios de inclusión**

- Se incluyeron pacientes de ambos sexos.
- Pacientes con diagnóstico clínico de verruga plantar.
- Se incluyeron pacientes con tratamiento tópico para las verrugas plantares pero que hubieran suspendido su aplicación durante 2-3 meses como mínimo.

### **3.2.4 Criterios de exclusión**

- Pacientes tratados en los 2-3 meses previos a la inclusión.
- Pacientes con neuropatía y/o vasculopatía.

## **3.3 Metodología clínica**

### **3.3.1 Recogida de datos**

Se diseñó un protocolo clínico que incluía la recogida de datos en una anamnesis y una valoración física y clínica de la lesión (Anexo 10.3).

#### **Características de los pacientes**

De cada paciente se llevó a cabo el registro de los siguientes datos: sexo; edad (4-11 años vs. 12-20 años vs. mayor de 21 años); ocupación (tipo de actividad laboral); tipo de calzado (habitual, actividad laboral); actividad deportiva (gimnasio, natación

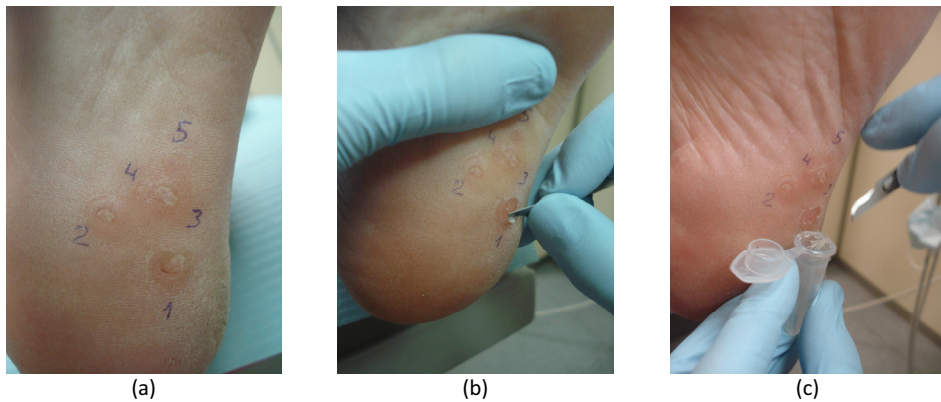
deportes de equipo, deportes al aire libre, actividad descalzo); actividades complementarias (caminar, senderismo, baile, otras); localización de las verrugas plantares (pie derecho vs. pie izquierdo, talón [borde interno vs. borde externo], mediopie [borde interno vs. borde externo], zona antepie [1<sup>er</sup> radio vs. 2<sup>o</sup> radio vs. 3<sup>er</sup> radio vs. 4<sup>o</sup> radio vs. 5<sup>o</sup> radio], dedos [1<sup>er</sup> dedo vs. 2<sup>o</sup> dedo vs. 3<sup>er</sup> dedo vs. 4<sup>o</sup> dedo vs. 5<sup>o</sup> dedo]); tiempo de evolución de las verrugas (< 6 meses, 6 - 12 meses,  $\geq$  12 meses, NS/NC); número de verrugas por paciente; presencia de verrugas en mosaico.

### 3.3.2 Recogida de muestras

Antes de la toma de las muestras, se realizó la desinfección de la zona con alcohol 96°. Posteriormente, se enumeraban las lesiones y se tomaba fotografía a nivel macroscópico para llevar a cabo su identificación. Las muestras fueron recogidas previo corte laminar de la hiperqueratosis superficial de la verruga plantar, mediante bisturí. La muestra, hiperqueratosis próxima al interior de la verruga que se obtenía mediante el raspado con nueva hoja de bisturí, era depositada en un eppendorf. (Fig. 3.1). Para conservar la muestra se añadía 0,5 ml de suero fisiológico y se congelaba a -80°C.

### 3.3.3 Descripción del aparato láser

El equipo S30 PODYLAS<sup>TM</sup> (*INTERmedic*) es un equipo láser portátil. Está dotado de un generador láser de 1064 nm de longitud de onda y de 30 W de potencia sobre el tejido. Este láser cuenta con certificados CE y FDA. La pieza de mano utilizada da un spot de 4 mm de diámetro.



**Fig. 3.1**

(a) Marcaje de las lesiones a tratar. (b) Deslaminación de la hiperqueratosis superficial de la verruga. (c) Recogida de de la hiperqueratosis profunda en el eppendorf.

### 3.3.4 Metodología de aplicación del láser

#### 3.3.4.1 Medidas de protección al emplear el láser

Debido a que el láser podía producir efectos tisulares era imprescindible adoptar medidas de seguridad para evitar daños en la piel y fundamentalmente en los ojos, en los cuales puede provocar efectos irreversibles en la retina. Por tanto, antes de iniciar cualquier tratamiento había de seguirse las siguientes recomendaciones [113]:

##### a) Generales

- Seguir las indicaciones del fabricante del equipo, para evitar riesgos eléctricos (se generan corrientes de alto voltaje), mecánicos (por desplazamiento del equipo) o químicos (por sustancias empleadas, como colorantes, refrigerantes, etc.).
- Realizar el calibrado del equipo para comprobar la eficacia de la radiación.
- Llevar a cabo revisiones periódicas de los equipos.



**b) Protección de los ojos**

- Identificar el lugar donde se utiliza el láser.
- Usar las gafas de protección, tanto para el podólogo como para el paciente u otra persona que se encontrase en la sala de tratamiento.
- Nunca dirigir el láser hacia los ojos, manteniendo la pieza de mano en posición perpendicular al área a tratar, para evitar incidencias que provocasen refracción y reflexión del haz hacia otras zonas.
- Sólo dirigir el láser hacia el orificio de calibración o el área a tratar.

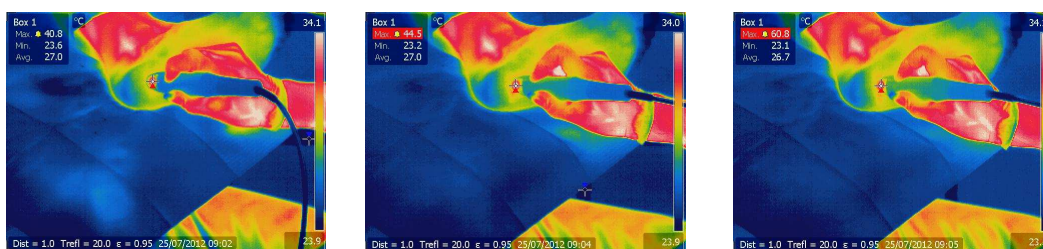
**c) Protección contra quemaduras o explosiones**

- Mantener el sitio donde se utilizaba el láser libre de sustancias inflamables (p.ej. anestésicos) o que tuviesen riesgo de explosión (p.ej. equipos de oxígeno).
- No usar alcohol para limpiar o refrigerar el área a tratar. En el caso de utilizar alcohol para limpiar o desinfectar cualquier parte de la pieza de mano, debía secarse antes de iniciar cualquier maniobra con el láser.

**3.3.4.2 El sistema de enfriamiento**

Con la intención de reducir daños en tejidos circundantes a la verruga y reducir el dolor se empleó el frío como elemento coadyuvante; aunque sus resultados pudiesen ser cuestionables. El enfriamiento epidérmico era fundamental para impedir la lesión de la piel por el calor que ascendía desde las capas más profundas a las más superficiales tras la destrucción de la verruga.

Al inicio de la investigación se tomaron diversas imágenes con una cámara termográfica, con el fin de evaluar el efecto térmico del láser. En la figura 3.2 puede apreciarse el aumento de la temperatura después de tres disparos con las siguientes características: Pulso 250 ms, Pausa 800 ms, Potencia 30 w, Fluencia 106 J/cm<sup>2</sup>.



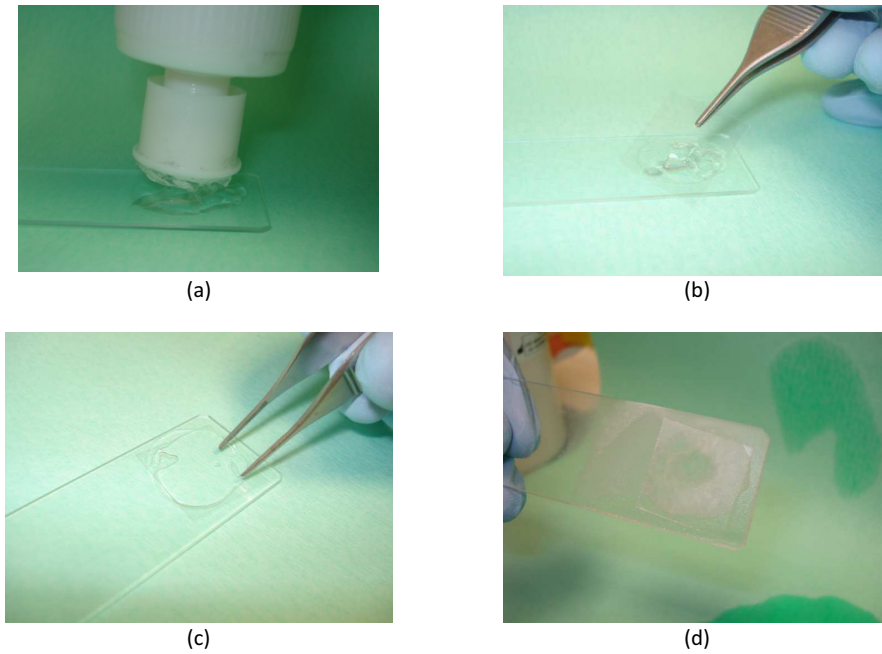
**Fig. 3.2**  
Aumento de la temperatura en 20 °C en el punto de aplicación del láser, después de tres disparos

Durante la aplicación del láser era muy aconsejable el empleo de algún sistema de enfriamiento para la piel [121]. Resulta difícil cuantificar el “grado” o intensidad de enfriamiento que hay que aplicar específicamente en cada paciente y en cada zona a tratar. El sistema de enfriamiento puede ser de contacto continuo o spray dinámico [122] (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.**  
Sistemas de enfriamiento para laserterapia

Tipo de enfriamiento	Tiempo de contacto	Reducción de temperatura
Contacto continuo	De 1 a 10 s	De 10 a 19 ° C
Spray dinámico	Sincronizado con el pulso de láser, pocos ms antes	De 17 a 20 ° C

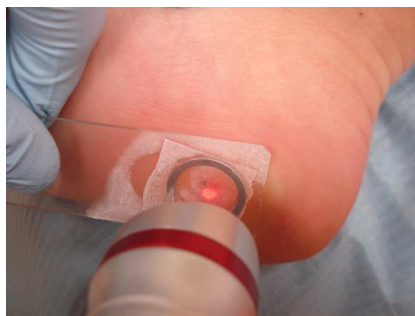
En el estudio, el sistema de enfriamiento se llevó a cabo mediante la aplicación de gel transparente utilizado en ultrasonografía sobre un portaobjetos. Se aplicaba un cubreobjetos sobre el gel y se presionaba para esparcir uniformemente el gel en el portaobjetos. A continuación, y por la parte del cubreobjetos se pulverizaba con *cloruro de etilo* hasta conseguir la cristalización del gel por congelación (Fig. 3.3).



**Fig. 3.3**

(a) Aplicación de gel transparente sobre portaobjetos. (b) Cubreobjetos cubriendo el gel. (c) Presión sobre el cubre objetos para esparcir y unificar la superficie del gel. (d) Aspecto que presenta el gel una vez congelado

El conjunto de porta-cubreobjetos se colocaba encima de la verruga y se procedía a disparar (Fig. 3.4).



**Fig. 3.4**

Utilización del sistema de enfriamiento *in situ*

Se utilizó este sistema porque al realizar el contacto del portaobjetos sobre el tejido, la superficie del tejido se uniformiza a un mismo plano permitiendo que la zona donde se aplica el láser forme un ángulo de 90° con la pieza de mano. Esta perpendicularidad hace que la distancia focal (distancia láser-tejido diana) sea la óptima para obtener la superficie efectiva del spot.

### 3.3.4.3 Ajuste de la dosis

Se pretendía determinar unos parámetros de láser con las cuales obtener una efectividad de tratamiento óptima y evitar el dolor para el paciente. De acuerdo a la literatura consultada [90; 121; 123] se inició el tratamiento con los parámetros de la tabla 3.2.:

**Tabla 3.2**  
Parámetros iniciales del tratamiento láser

Pulso	Pausa	Potencia (w)	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Energía (J)	Energía - tiempo de exposición (mínimo efectivo)
250 ms	800 ms	30	106	7	45 J – 1 s

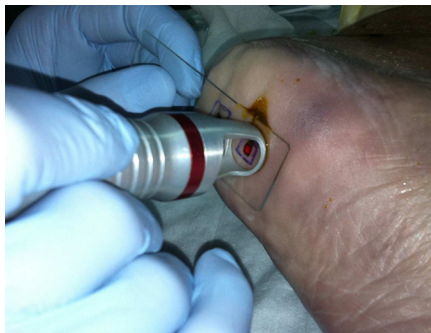
Durante el estudio, los parámetros se fueron modificando para conseguir mayor efectividad, con menos tiempo y menor dolor (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3**  
Evolución de las parámetros del tratamiento láser

Pulso	Pausa	Potencia (w)	Fluencia ((J/cm <sup>2</sup> )	Energía (J)
7,5 s	1.0 s	10		4
7.5 s	1.0 s	07		3
300 ms	1.0 s	13		3
200 ms	1.0 s	30	84	6
300 ms	1.0 s	30	127	9

Basándonos en la diversidad de criterios en cuanto a los parámetros del láser utilizados por diferentes autores al llevar a cabo el tratamiento con láser, y teniendo en consideración los diferentes efectos tisulares que éste puede producir sobre el tejido a

temperaturas elevadas (vaporización, carbonización); se realizó una prueba sobre espécimen fresco en la sala de disección del *Campus de Ciències de la Salut de Bellvitge*. Esta prueba se basó en la utilización de los parámetros mínimos usados para la eliminación de la verruga plantar en pacientes anestesiados, evaluando la profundidad a nivel dérmico una vez aplicados.(Fig. 3.5)



(a)

**Fig. 3.5**

- (a) Aplicación del láser sobre zona del talón en espécimen fresco.
- (b) Aspecto de la zona una vez aplicado el láser (Imagen dermatoscópica)
- (c) Disección de 1 cm<sup>2</sup> de la zona incluyendo tejido subcutáneo.
- (d) Sección del tejido, donde apreciar la capacidad de penetración del láser de Nd-YAG



(b)



(c)



(d)

La sección del tejido (Fig. 3.5.d) mostraba que la profundidad conseguida con la vaporización del tejido, con un spot del láser de 4 mm, era la suficiente para que la profundidad obtenida llegase a los 6-8 mm de profundidad [113; 116]. La utilización del pigmento (tinta negra) creaba una barrera óptica y actuaba como iniciador bloqueando el paso de la luz y produciendo efectos por absorción que favorecían esta penetración [117].

Los parámetros que finalmente fueron objeto de estudio en la valoración de la efectividad del tratamiento con láser en el tratamiento de las verrugas plantares se reflejan en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4**  
Parámetros finales del tratamiento láser

Pulso	Pausa	Potencia (w)	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Energía (J)	Energía - tiempo de exposición (mínimo efectivo)
500 ms	1.0 s	30	212	15	120 J – 4 s

#### 3.3.4.4 Técnica anestésica de la zona

A los pacientes que solicitaron anestesia de la zona antes de iniciar el tratamiento o aquellos en que la técnica de enfriamiento para disminuir la sensación de dolor no fuera efectiva, se les ofreció la posibilidad de anestesiarse la zona. La técnica anestésica, en caso de ser una lesión única, fue una técnica local. Cuando las lesiones fueron múltiples se realizó un bloqueo del nervio tibial posterior.

#### 3.3.4.5 Técnica de aplicación del láser

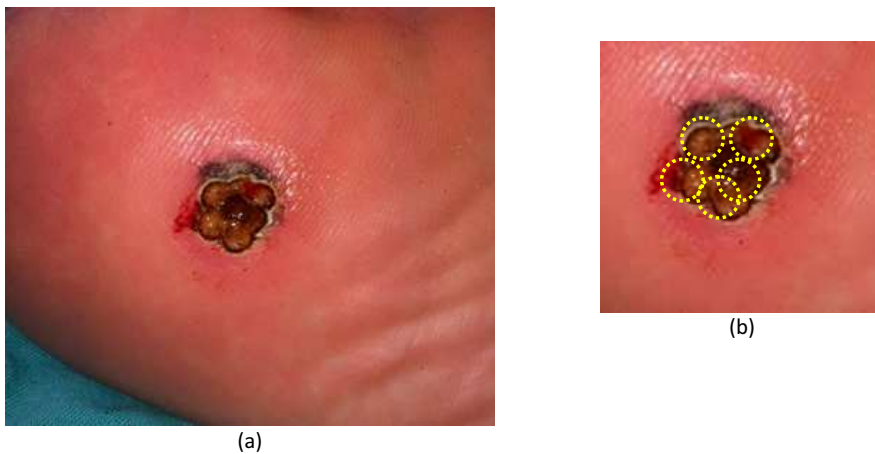
Se tiñó la superficie de la verruga mediante hisopo con tinta negra. Una vez se aplicó sobre la verruga el sistema de enfriamiento (Fig. 3.4), se realizaron los sucesivos disparos del láser mediante la pieza de mano con el spot de 4 mm de diámetro. En caso de que el paciente refería molestia, se aplicó de nuevo el sistema de enfriamiento y se repitió el tratamiento hasta aplicar la dosis de energía descrita en la Tabla 3.4.

Si el diámetro de la verruga era mayor de 4 mm, se realizaba la división de la superficie de la misma, con el fin de poder abarcar toda la superficie con el láser (Fig. 3.6.b y 3.7).

Tras la aplicación del láser, se observaba mediante dermatoscopia la vaporización del tejido, así como la efectividad del tratamiento (Fig. 3.6.a).

En caso de apreciarse aún papilas y si el investigador creía oportuno podían realizarse más disparos, hasta visualizar el tejido subcutáneo.

Posteriormente, se confeccionaba una descarga con fieltro de 4 mm para evitar el apoyo de la zona.



**Fig. 3.6** Verruga plantar de diámetro superior a 4mm. (a) Aspecto de la verruga una vez realizado el tratamiento con láser. (b) Simulación de la aplicación de los diferentes puntos de disparo con el spot de 4 mm para abarcar la superficie total de la verruga.

### 3.3.5 Seguimiento del paciente

#### 3.3.5.1 Cuidados posteriores al tratamiento

El paciente realizaba curas tópicas una vez al día mediante la aplicación de antiséptico, previo lavado y secado de la zona y, apósito de protección debido a que la vaporización del tejido provocaba exudado seroso de la zona.

### 3.3.5.2 Visitas posteriores

El paciente era citado a la semana del tratamiento para evaluar estado de la lesión. Después de deslaminar la zona queratósica superficial, si se apreciaba continuidad de los dermatoglifos y no se observaban papilas mediante dermatoscopia se daba el alta del proceso (Fig. 3.7). Se citaba al paciente a las tres semanas para dar el alta definitiva.

En caso que al deslaminar la zona presentase una ligera ulceración, se prescribiría el tratamiento adecuado para la regeneración del tejido y se citaba al paciente para volver a ser evaluado del proceso.



**Fig. 3.7**  
Verruga plantar de diámetro superior a 4 mm, a la semana de haber sido tratada

Si se observaban papilas, se realizaba nuevo tratamiento con el láser. En estas sesiones sucesivas, según estado de la zona y criterio del investigador, la energía aplicada podía ser igual o menor a la establecida como objeto del estudio.



### 3.4 Metodología experimental

#### 3.4.1 Extracción del DNA cromosómico

La lisis celular y extracción del DNA se llevó a cabo mediante el método descrito por Green *et al.* descrito a continuación [125].

1. En un tubo tipo Falcon de polipropileno cónico, se adicionaban 8  $\mu$ l de proteinasa K y 2 ml de solución SNET. Añadir a la solución tamponada de lisis, el tejido hiperqueratósico verrucoso.
2. Incubar el tubo durante toda la noche a 55°C, con una inclinación de 30° en un agitador orbital a 50 rpm.

Era importante que la muestra fuese mezclada adecuadamente durante la digestión. Después de la incubación, el tejido no había de ser visible y la solución tampón había de tener una coloración blanco-grisácea.

3. Se extraía 1 ml del contenido incubado a un nuevo tubo Falcon y se añadía igual volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamil (25:24:1), incubándolo a temperatura ambiente (24 °C) durante 30 minutos, con una inclinación de 30° en un agitador orbital a 50 rpm.
4. Se procedía a separar las fases orgánica y acuosa mediante centrifugación. En un tubo eppendorf de 2 ml se transferían los 2 ml de muestra y se centrifugaba a 14000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se transferían 900  $\mu$ l la fase acuosa superior a un nuevo tubo de microcentrífuga.
5. El DNA solubilizado se precipitaba añadiendo una décima parte del volumen (90  $\mu$ l) de acetato de sodio 3 M e igual volumen (900  $\mu$ l) de isopropanol. Se sedimentaba el DNA por centrifugación a 14000 rpm, a 24 °C durante 15 minutos.
6. Se extraía el isopropanol por decantación. Se lavaba el sedimento con 1 ml de etanol 70% frío. Se extraía el etanol por decantación y, se dejaba que el sedimento se secase al aire durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.

7. El DNA cromosómico se resuspendía en 0,5 ml de solución tampón TE (pH 8,0) y se conservaba a 4 °C.

### **Soluciones y tampones utilizados**

#### ***Proteinasa K***

Proteinasa K	20 mg
H <sub>2</sub> O MiliQ	1 ml

Se adicionaba cada uno de los componentes en el orden señalado y se agitó hasta su completa disolución. Se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenaba a -20°C.

#### ***Solución de SNET***

Tris HCl (pH 8,0)	20 mM
EDTA (pH 8,0)	5 mM
NaCl	400 mM
SDS	1% (w/v)

Se mezclaba bien y se ajustaba el pH a 8,0.

#### ***Solución de fenol equilibrado***

1. A un volumen inicial de fenol, se añadía igual volumen de solución tampón de Tris HCL 0,5M (pH 8,0). Se agitaba la mezcla, mediante un agitador magnético durante 15 minutos. Se retiraba el agitador, y cuando las dos fases se habían separado, se aspiraba la fase superior (acuosa), utilizando una pipeta de vidrio equipada con un sistema de aspiración.

2. Se añadía un volumen igual de solución tampón de Tris HCl 0,1M (pH 8,0) al fenol. Agitando de nuevo la mezcla durante 15 minutos mediante el agitador magnético. Se retiraba de nuevo el agitador y se extraía la fase acuosa como se había descrito anteriormente. Se comprobó, mediante una tira de papel indicadora de pH, que el pH de la fase fenólica fuese mayor que 7,8. Las extracciones se repetirían en caso que el pH de la solución fenólica no tuviese el pH indicado.
3. Añadir 0,1 de volumen de Tris HCl 0,1M (pH 8,0).
4. La solución fenólica había de almacenarse a resguardo de la luz a 4°C.

#### ***Solución de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamil (25:24:1)***

Se mezclaban, 25 volúmenes de fenol con 24 volúmenes de cloroformo y un volumen de alcohol isoamílico.

#### ***Solución tampón TE***

Tris HCl pH 8,0	10 mM
EDTA 0,5 M pH 8,0	1 mM

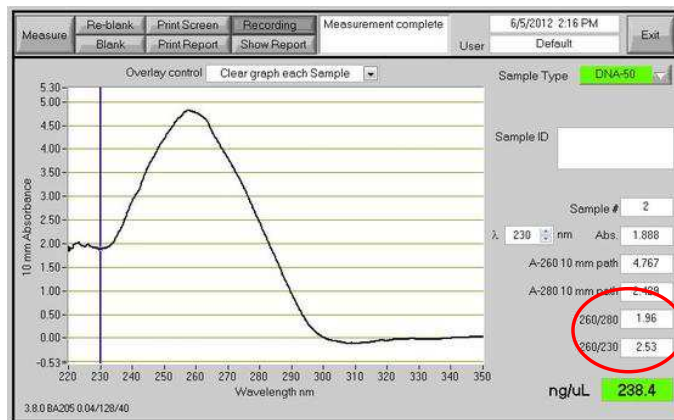
Se mezclaba bien y se ajustaba el pH a 8,0. Se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

### **3.4.2 Cuantificación de DNA**

La concentración de DNA se determinó mediante un espectrofotómetro, *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000*.

La calidad de las muestras obtenidas se determinaba por la pureza, que está relacionada con el valor de máxima absorbancia de los ácidos nucleicos detectada a una longitud de onda de 260 nm (Fig. 3.8).

La relación de las absorbancias A260/280 permitía saber si el DNA obtenido estaba contaminado por la presencia de compuestos aromáticos ya que éstos absorbían en una longitud de onda de 280 nm. Se consideró que el DNA es de calidad óptima cuando la relación 260/280 es mayor de 1,8. La relación de absorbancia A260/230 se utilizó como medida adicional para determinar la pureza del DNA ya que a 230 nm se detectaba la máxima absorbancia de sales presentes en la solución, carbohidratos u otros posibles contaminantes. Se consideraba que el DNA es puro si el ratio 260/230 oscila entre 1,5 y 2,2.



**Fig. 3.8**  
Imagen de una muestra donde aparecían la concentración de DNA y la absorbancia de los ácidos nucleicos.

### 3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Saiki *et al.* que se

basa en la amplificación de forma exponencial *in vitro* de un fragmento específico de DNA localizado entre dos regiones de secuencia conocidas denominadas cebadores o *primers* [126]. Además de obtener grandes cantidades de DNA, a partir de un ácido nucleico molde, la PCR hace posible la introducción de modificaciones específicas, con dianas de restricción en los extremos del DNA, mutagénesis dirigidas, etc.

### 3.4.3.1 Cebadores utilizados y fragmento amplificado

Los cebadores o *primers* utilizados fueron diseñados Sasagawa *et al.* para amplificar una región bien conservada de diversos VPH: un fragmento de la región L1 del genoma viral, que codifica la proteína mayoritaria de la cápside (L1), de 210-238 pb de longitud [124].

La secuencia de estos primers se muestra en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5.**

Oligonucleótidos o cebadores utilizados en la amplificación del DNA

Gen amplificado	Primer	Secuencia de nucleótidos
L1	SKF1	AAATATCCAGATTATCTRAARATG
	SKF2	AAATATCCTGATTATTTTRGGMATG
	SKR1	ATACCATAGAYCCACTRGG
	SKR2	AAACYATAGAGCCACTWGG

### 3.4.3.2 Mezcla de los componentes o Master Mix

Para llevar a cabo la reacción preparamos la mezcla o *Master Mix* de todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación.

Todos los productos utilizados, con excepción de los *primers*, son de *Fermentas*, (Lithuania).

***Master Mix*** (volumen total: 100  $\mu$ l)

---

2 mM  $MgCl_2$

1x Tampón con KCl

0,2 mM Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

0,01 u/ $\mu$ l Taq-polimerasa

0,4 pmol/ $\mu$ l SKF1

0,4 pmol/ $\mu$ l SKF2

0,4 pmol/ $\mu$ l SKR1

0,4 pmol/ $\mu$ l SKR2

H<sub>2</sub>O MiliQ, estéril, c.s.p

### 3.4.3.3 Amplificación del DNA

Una vez preparadas las reacciones se procedió a la amplificación de fragmentos de DNA; ésta se llevó a cabo en un termociclador *Techné TC-312*.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Número de ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Pre-desnaturalización	3 min	95 °C
	Desnaturalización	30 seg	95 °C
35	<i>Annealing</i>	30 seg	45 °C
	Extensión	30 seg	72 °C
1	Extensión final	2 min	72 °C

### 3.4.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es un método que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Se basa en la carga negativa que presenta el DNA a pH neutro, y que condiciona su migración hacia el polo positivo cuando está sometido a un campo eléctrico. Forzando este desplazamiento a través de una matriz porosa, se consigue una separación por tamaño (la velocidad de migración es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular), de los diferentes fragmentos de DNA que pueda contener una mezcla heterogénea, valorando su tamaño frente a un patrón de medidas adecuado.

El porcentaje de agarosa requerido depende del tamaño del fragmento amplificado. La tabla 3.6 muestra la concentración de gel de agarosa recomendada para separar moléculas de DNA lineales.

**Tabla 3.6**

Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas de DNA lineales

% de agarosa	Gamas de tamaños de DNA (pb)
0,75	10.000 – 15.000
1,0	500 – 10.000
1,25	300 – 5.000
1,5	200 – 4.000
2,0	100 – 2.500
2,5	50 – 1.000

En el presente estudio, se utilizó una solución de agarosa al 2,5% y se siguió el siguiente protocolo:

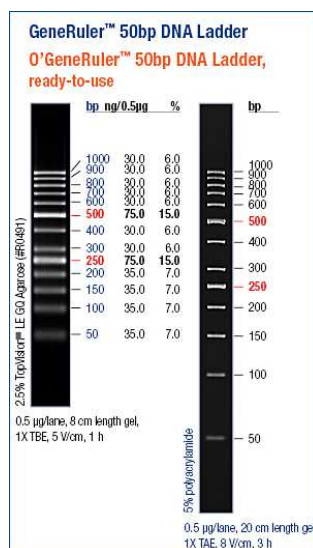
1. Se añadían 2,5% de agarosa a 100 ml de tampón TBE x1.
2. Se calentó la solución hasta que la agarosa quedaba totalmente disuelta.





En todos los geles, se incluyó un marcador de peso molecular, con el fin de determinar, el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados observados. Se utilizó el marcador *GeneRuler™ 50bp DNA Ladder* (Fermentas) que cubre un rango de entre 50 y 1000 pb (Fig. 3.9).

La muestra se definió como VPH positiva cuando la banda observada en el gel se encontraba entre 210-238 pb [124].



**Fig. 3.9**  
 Patrón utilizado en la identificación de fragmentos de DNA: *GeneRuler™ 50bp DNA Ladder*

### 3.4.5 Purificación de los productos amplificados

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR se purificaron con el kit de la casa comercial Promega, *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, con referencia A9281. Este método de purificación permite purificar fragmentos amplificados de DNA de entre 100 pb y 10Kb, obteniendo fragmentos de DNA altamente concentrados.

### 3.4.6 Determinación de las secuencias de los fragmentos amplificados

Posteriormente a la purificación de los fragmentos amplificados obtenidos, se llevaron las muestras a la *Unitat de Genòmica* de los *Serveis Científicotècnics* (CCiT) de la *Universitat de Barcelona* para proceder a la determinación de su secuencia.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Mezclar el DNA y los *primers*, en un eppendorf, teniendo en cuenta las cantidades necesarias en la reacción:
  - 100 ng por 1 Kb de DNA molde (fragmento de PCR).
  - 4 pmol/ $\mu$ l de *primers*: SKF1 y SKF2.
2. Dejar el tubo abierto y secar el DNA y el primer ya mezclados en un termociclador a 80 °C durante 15 minutos, hasta la total evaporación de la muestra.
3. Tapar las muestras desecadas y guardar a -20 °C hasta su procesamiento.

### 3.4.7 Alineamiento de secuencias

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación del CCiT, se accede a la web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para realizar el alineamiento de las secuencias “resultado” con las secuencias disponibles en la base de datos: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

Se utilizó el método aproximativo BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) que se basa en la realización de análisis comparativos entre secuencias.

1. Se introduce la secuencia en el formato FASTA<sup>3</sup>
2. Se eligen los parámetros de búsqueda más adecuados. Se optimizó que las secuencias fueran las más similares.
3. Se procede a la obtención de los resultados (BLAST).

El programa muestra la coincidencia de la secuencia con el genotipo del VPH correspondiente (Fig. 3.10).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
285 bits(154)	2e-73	159/161(99%)	2/161(1%)	Plus/Plus
Query 16	GTTCTTTTCGCTGCGTAGAGAACAGATGGTTCACCCGGTCATTTTTCAATAGGGCTGGT	75		
sbjct 6492	GTTCTTTTCGCTGCGTAGAGAACAGATG-TTCACCC-GTCATTTTTCAATAGGGCTGGT	6549		
Query 76	AAGATGGGTGACACAATCCCAGATGAGTTGTACATTAAAAGTACCCTATCTCGGACCCC	135		
sbjct 6550	AAGATGGGTGACACAATCCCAGATGAGTTGTACATTAAAAGTACCCTATCTCGGACCCC	6609		
Query 136	GGCAGTCATGTGTATACCTCCACTCCTAGTGGCTCTATGGT	176		
sbjct 6610	GGCAGTCATGTGTATACCTCCACTCCTAGTGGCTCTATGGT	6650		

**Fig. 3.10**  
Resultado obtenido mediante el programa BLAST de alineamiento de secuencias, tomando como ejemplo la muestra 94. (99% de identidad con VPH27)

<sup>3</sup> En bioinformática, el formato FASTA es un formato de fichero basado en texto, utilizado para representar secuencias bien de ácidos nucleico, bien de péptido, y en el que los pares de bases o los aminoácidos se representan usando códigos de una única letra. Un ejemplo de una secuencia en el formato FASTA, en el que el identificador de la secuencia es A5, puede ser:

```
>A5
GGGGGATTACTTTT
```



---

## 4. RESULTADOS

---

- 
- 4.1 Pacientes y muestras
  - 4.2 Prevalencia del tipo de VPH
  - 4.3 Tipo de VPH y características de los pacientes
  - 4.4 Pacientes con múltiples verrugas
  - 4.5 Distribución de las verrugas plantares según zona de aparición
  - 4.6 Distribución de los genotipos según zona aparición
  - 4.7 Efectividad del tratamiento con láser en verrugas plantares
-



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Pacientes y muestras

En el estudio se incluyeron 72 pacientes a los que se les tomó muestra de hiperqueratosis profunda de las verrugas plantares. La media de edad fue de 34 años (rango 6 – 89) y un 61,6% de los participantes fueron mujeres. En la mayoría de casos, los pacientes presentaron una única verruga plantar (78%); un 12,3% de los pacientes presentaron dos y el 9,7% restante, tres o más verrugas (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1**  
Características de los pacientes de la población de estudio (n=72).

Sexo:		
	Mujeres	44 (61,1%)
	Hombre	28 (38,9%)
Edad:		
	4-11 años	3 (4,2%)
	12-20 años	16 (22,2%)
	> 21 años	53 (73,6%)
Localización de las verrugas:		
	Verrugas plantares	72 (100%)
Evolución de las verrugas:		
	< 6 meses	17 (23,6%)
	6 - 12 meses	14 (19,4%)
	≥ 12 meses	18 (25,0%)
	NS/NC	23 (31,9%)
Número de verrugas:		
	1	56 (77,8%)
	2	9 (12,5%)
	3	3 (4,2%)
	4	2 (2,8%)
	5	1 (1,4%)
	6 o más	1 (1,4%)

### 4.2. Prevalencia del tipo de VPH

El número total de verrugas fue de 105, de las cuales se obtuvo DNA para la posterior amplificación y secuenciación del fragmento de la región L1 del genoma viral, que codifica la proteína mayoritaria de la cápside (L1), de 210-238 pb de longitud. Las

secuencias de las 105 muestras fueron alineadas mediante el programa de secuenciación BLAST, obteniéndose un único genotipo de VPH.

La tabla 4.2 presenta los diferentes genotipos resultantes de la alineación de secuencias mediante el programa BLAST, así como la posición en el genoma de la secuencia problema, el valor de E (*Expect value*) obtenido y el nivel de homología.

**Tabla 4.2**

Resultados de la alineación de secuencias mediante el programa BLAST y el nivel de homología

Muestra	HPV	Posición del genoma	Posición en la secuencia problema	E (Expect)	Homología (%)
1	57b	6490 - 6648	15 - 176	4,00E-65	96%
2	27	6492 - 6647	17 - 179	1,00E-64	96%
3	2	6504 - 6670	5 - 173	1,00E-74	98%
4	27b	6492 - 6647	15 - 175	2,00E-67	97%
5	57b	6486 - 6650	11 - 175	3,00E-66	95%
6	57b	6492 - 6648	21 - 181	1,00E-61	94%
7	57	6474 - 6634	9 - 170	8,00E-67	96%
8	57b	6481 - 6648	7 - 172	2,00E-67	95%
9	57	6485 - 6634	19-167	4,00E-55	93%
10	1a	6156 - 6335	7-192	7,00E-78	96%
11	57	6502 - 6634	36 - 169	1,00E-54	96%
12	27b	6492 - 6646	19 - 184	1,00E-51	90%
13	57	6479 - 6634	13 - 166	3,00E-66	97%
14	27b	6492 - 6650	16 - 177	8,00E-72	98%
15	57	6479 - 6639	16 - 176	1,00E-75	99%
16	57	6468 - 6639	7 - 179	2,00E-73	97%
17	27	6495 - 6650	23 - 191	2,00E-54	92%
18	27b	6492 - 6647	16 - 179	5,00E-59	93%
19	57b	6486 - 6648	10 - 174	2,00E-67	96%
20	2	6531 - 6670	29 - 174	7,00E-48	92%
21	1a	6173 - 6334	38 - 207	6,00E-34	81%
22	1a	6152 - 6335	8 - 191	1,00E-80	97%
23	57	6469 - 6639	6 - 174	5,00E-74	97%
24	57	6468 - 6639	5 - 175	6,00E-78	98%
25	2	6523 - 6673	26 - 180	2,00E-58	94%
26	27	6492 - 6650	10 - 174	3,00E-66	96%
27	27b	6531 - 6648	77 - 207	1,00E-32	89%
28	57	6491 - 6637	28 - 176	4,00E-53	93%



29	27b	6489 - 6647	12 - 178	4,00E-65	95%
30	27b	6480 - 6647	4 - 170	5,00E-74	98%
31	57b	6479 - 6650	6 - 175	8,00E-72	96%
32	2	6510 - 6673	10 - 173	2,00E-77	99%
33	1a	6152 - 6335	8 - 193	1,00E-80	97%
34	27	6489 - 6650	12 - 177	2,00E-72	98%
35	2	6504 - 6670	5 - 170	8,00E-77	99%
36	1a	6152 - 6334	8 - 196	7,00E-73	94%
37	2	6523 - 6670	23 - 174	9,00E-52	92%
38	2	6547 - 6670	46 - 175	2,00E-48	95%
39	2	6549 - 6670	49 - 180	9,00E-42	92%
40	1a	6152 - 6329	6 - 181	7,00E-78	97%
41	57b	6486 - 6648	10 - 173	2,00E-67	96%
42	1a	6176 - 6335	33 - 192	8,00E-73	98%
43	1a	6152 - 6335	6 - 190	2,00E-77	96%
44	1a	6163 - 6335	19 - 195	1,00E-75	97%
45	1a	6152 - 6334	7 - 188	2,00E-78	96%
46	57b	6485 - 6559	7-84	6,00E-15	88%
47	1a	6152 - 6335	6 - 188	7,00E-78	96%
48	1a	6152 - 6335	8 - 193	3,00E-82	97%
49	1a	6152 - 6335	7 - 191	2,00E-82	97%
50	1a	6152 - 6335	7 - 190	5,00E-79	96%
51	27	6492 - 6647	14 - 172	4,00E-70	98%
52	27	6492 - 6647	11 - 176	1,00E-60	94%
53	27	6492 - 6650	18 - 184	4,00E-65	95%
54	27	6492 - 6647	16 - 175	3,00E-66	96%
55	57b	6485 - 6648	11 - 175	5,00E-69	96%
56	27b	6492 - 6650	18 - 185	9,00E-62	94%
57	27b	6492 - 6650	18 - 184	4,00E-65	95%
58	1a	6152 - 6335	7 - 191	1,00E-80	97%
59	1a	6156 - 6335	11 - 189	5,00E-79	97%
60	27b	6351 - 6647	197 - 493	8,00E-121	92%
61	57	6481 - 6634	16 - 172	5,00E-64	96%
62	65	6065 - 6253	12 - 197	5,00E-79	96%
63	1a	6152 - 6334	8 - 191	9,00E-77	96%
64	57b	6481 - 6648	7 - 171	4,00E-70	96%
65	57b	6485 - 6650	9 - 174	2,00E-68	96%
66	57b	6479 - 6650	5 - 173	3,00E-71	96%
67	57b	6486 - 6650	11 - 173	1,00E-70	97%
68	57b	6479 - 6648	5 - 172	8,00E-72	96%
69	1a	6163 - 6335	18 - 191	6,00E-79	98%
70	2	6531 - 6670	31 - 181	1,00E-45	91%
71	2	6554 - 6673	56 - 179	5,00E-49	97%

Resultados

72	2	6531 - 6670	38 - 188	8,00E-43	90%
73	57b	6496 - 6648	20 - 172	9,00E-67	97%
74	57b	6479 - 6650	2 - 170	2,00E-72	97%
75	1a	6152 - 6335	8 - 195	3,00E-76	95%
76	57	6484 - 6634	20 - 170	9,00E-67	98%
77	27b	6351 - 6488	199 - 336	9,00E-17	72%
78	2	6531 - 6670	29 - 173	1,00E-50	93%
79	1a	6159 - 6335	12 - 190	7,00E-78	97%
80	27b	6492 - 6647	18 - 187	5,00E-54	91%
81	65	6065 - 6253	10 - 197	8,00E-83	97%
82	57	6475 - 6637	12 - 178	7,00E-63	93%
83	57	6485 - 6637	18 - 170	8,00E-44	87%
84	27	6492 - 6650	16 - 179	5,00E-69	97%
85	65	6061 - 6253	8 - 197	3,00E-81	96%
86	27b	6492 - 6650	15 - 176	8,00E-72	98%
87	27b	6492 - 6650	17 - 179	1,00E-69	97%
88	57	6484 - 6634	19 - 169	1,00E-65	97%
89	1a	6152 - 6335	8 - 188	2,00E-82	98%
90	2	6510 - 6673	12 - 177	1,00E-74	98%
91	57	6479 - 6637	18 - 178	1,00E-65	95%
92	57	6481 - 6634	15 - 169	1,00E-65	97%
93	27	6492 - 6650	16 - 176	2,00E-73	99%
94	27b	6511 - 6650	35 - 179	2,00E-32	86%
95	2	6510 - 6673	12 - 183	4,00E-65	94%
96	57	6474 - 6634	5 - 165	6,00E-68	96%
97	2	6504 - 6673	6 - 178	8,00E-72	96%
98	1a	6156 - 6335	11 - 191	7,00E-83	98%
99	57	6474 - 6634	6 - 169	2,00E-63	94%
100	2	6517 - 6673	18 - 184	7,00E-58	93%
101	57	6474 - 6644	10 - 179	1,00E-59	91%
102	57	6474 - 6644	9 - 177	7,00E-51	88%
103	57	6474 - 6637	6 - 175	7,00E-51	89%
104	57	6481 - 6634	14 - 167	5,00E-64	95%
105	57	6479 - 6634	16 - 176	4,00E-60	94%

El valor de E (*Expect value*) obtenido en cada análisis sirvió para considerar aquellas homologías que fueron significativas. Es un parámetro que describe el número de éxitos que se puede dar por azar, teniendo en cuenta el tamaño de las secuencias comparadas. Cuanto más bajo sea el valor de E (o más cercano a 0), más significativo es. Por lo tanto, puesto que los valores de E obtenidos en todas las alineaciones son

extremadamente pequeños, podemos afirmar que los resultados obtenidos son altamente significativos.

La homología entre las secuencias problema y las secuencias de la base de datos del NCBI fue muy elevada en todos los casos. El 92,38% (97 muestras) osciló entre el 90-99% de homología, un 6,67% (7 muestras) se encontró entre el 80-89% y el 0,95% (1 muestra) presentó un 72% de homología.

La tabla 4.3 presenta la prevalencia de los genotipos de VPH en todas las verrugas positivas al VPH. El genotipo más prevalente fue el VPH-57 (37,14%). A continuación fue el VPH-27 (23,81%) y el VPH-1a (20,95%). Los restantes genotipos fueron el VPH-2 (15,24%) y VPH-65 (2,86%).

**Tabla 4.3**  
Tipos de virus del papiloma humano aislados

Genotipo VPH		Nº pacientes (%)	
1a		22	(20,95)
2		16	(15,24)
27	27a	10	(9,52)
	27b	15	(14,29)
57	57a	23	(21,90)
	57b	16	(15,24)
65		3	(2,86)

### 4.3 Tipo de VPH y características de los pacientes

La tabla 4.4 muestra los datos de la relación entre las características de los pacientes y los tipos de VPH obtenidos. El 57,14% de las verrugas fueron diagnosticadas en mujeres. El genotipo con más incidencia en la población femenina fue el VPH-57 (n=30, 50%) y en el masculino el VPH-1a (n=16, 35,55%).

La mayoría de los genotipos del género *alfa* (2, 27b, 57a y 57b) estuvieron presentes en la edad adulta, siendo nula o prácticamente nula su presencia en la edad infantil. En el caso del género *mu*, su presencia se aprecia repartida en las diferentes etapas de la vida.

En cuanto al tiempo de evolución de las lesiones que el paciente refirió, en el caso de los VPH-2, los pacientes afirmaban tener la lesión hacía más de 6 meses, llegando a ser el tiempo máximo de aparición superior al año. En contraposición, el VPH-1a presentaba un tiempo de aparición inferior al año.

**Tabla 4.4.**  
Perfiles demográficos y clínicos de todos los tipos de VPH (n=105)

	Número de verrugas, n (%)							Todas las verrugas n=105
	<i>Alfa</i> (Esp. 4)					<i>Gamma</i> (Esp. 1)	<i>Mu</i> (Esp. 1)	
	VPH 2 N=16	VPH 27a N=10	VPH 27b n=15	VPH 57a n=23	VPH 57b n=16	VPH 65 n=3	VPH 1a N=22	
<b>Sexo</b>								
Hombres	6 (37,5)	4 (40)	9 (60)	4 (17,4)	5 (31,3)	1 (33,3)	16 (72,7)	45 (42,86)
Mujeres	10 (62,5)	6 (60)	6 (40)	19 (82,6)	11 (68,8)	2 (66,7)	6 (27,3)	60 (57,14)
<b>Edad</b>								
4-11 años	0 (0)	0 (0)	1 (6,7)	1 (4,3)	1 (6,2)	0 (0)	8 (36,4)	11 (10,48)
12-20 años	1 (6,25)	5 (50)	3 (20)	1 (4,3)	3 (18,8)	1 (33,3)	6 (27,3)	20 (19,05)
> 21 años	15 (93,75)	5 (50)	11 (73,3)	21 (91,3)	12 (75)	2 (66,7)	8 (36,4)	74 (70,48)
<b>Evolución de las verrugas</b>								
< 6 meses	0 (0)	2 (20)	1 (6,7)	5 (21,7)	1 (6,2)	1 (33,3)	7 (31,8)	17 (16,19)
6 - 12 meses	6 (37,5)	2 (20)	3 (20)	2 (8,7)	8 (50)	1 (33,3)	9 (40,9)	31 (29,59)
≥ 12 meses	6 (37,5)	5 (50)	3 (20)	8 (34,8)	2 (12,5)	0 (0)	3 (13,6)	27 (25,71)
NS/NC	4 (25)	1 (10)	8 (53,3)	8 (34,8)	5 (31,3)	1 (33,3)	3 (13,6)	30 (28,57)

#### 4.4 Pacientes con múltiples verrugas

El 22,22% de los pacientes (n=16) presentó múltiples verrugas. El genotipo del género *alfa* estaba presente en 14 de ellos. El 50% de estos pacientes (n=8) presentó el mismo genotipo en todas las verrugas. Los genotipos 2 y 57a estaban presentes, cada uno, en 2 pacientes. Los genotipos 1a, 27a, 27b y 57b aparecieron sólo en 1 paciente.

El 50% restante presentaron diferentes genotipos (Tabla 4.5). Cabe reseñar que un paciente (LV-09) presentaba un único genotipo (VPH-57) en sus dos subtipos (a y b).

**Tabla 4.5**  
Relación de pacientes con múltiples verrugas de diferentes genotipos

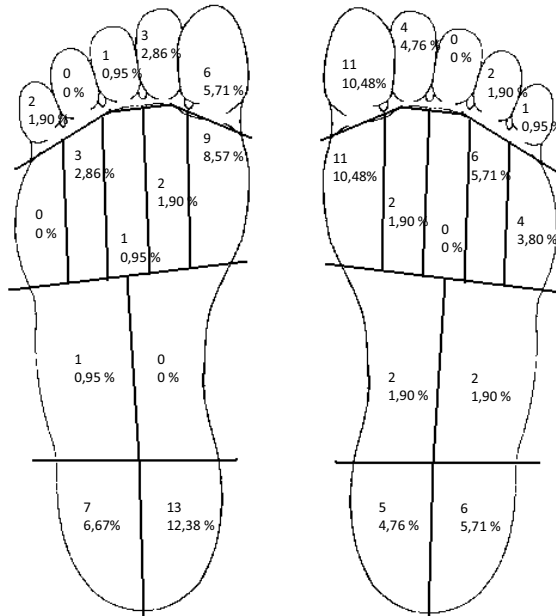
Num ID	Muestra	Genotipo
LV-08	2	27a
	3	2
	4	27b
LV-09	5	57b
	6	57b
	7	57a
	8	57b
LV-35	30	27b
	31	57b
LV-44	42	1a
	43	1a
	44	1a
	45	1a
	46	57b
	47	1a
	48	1a
	49	1a
	50	1a
	LV-50	60
61		57a
LV-60	76	57a
	77	27b
LV-78	92	57a
	93	27a
LV-85	96	57a
	97	2

Num ID: Número de identificación del paciente

#### 4.5 Distribución de las verrugas plantares según zona de aparición

La figura 4.1 muestra la distribución de todas las verrugas plantares. Esta distribución se realizó a partir de la recogida de datos.

El número de verrugas que aparecieron en la zona de los dedos, antepie y talón es muy similar. A nivel de talón, aparecieron en un 58,1% en el borde interno; en la zona del antepie, la cabeza del primer metatarsiano fue la más afectada con un 52,6%, finalmente el dedo más afectado fue el primer dedo con un 54,8%.



**Fig. 4.1.** Esquema de la distribución de las verrugas en la planta del pie

#### 4.6 Distribución de los diferentes genotipos según la zona de aparición

La tabla 4.6 muestra las diferentes zonas del pie y los genotipos que aparecen en cada una de ellas. El 51,61% del total de verrugas que aparecieron en el talón fueron del genotipo VPH-57. Del total de todas las verrugas del antepie, el 28,95% pertenecían al VPH-2. Los genotipos VPH-27 y 57 aparecieron en los dedos en un mismo porcentaje.

Se observó que el género *alfa* afecta tanto a la zona de los dedos y antepie como la del talón.

**Tabla 4.6**  
Distribución de los genotipos según la zona de aparición

Localización			Género					Gamma 65	Mu 1a
			Alfa						
			2	27a	27b	57a	57b		
Ambos pies	Talón	Borde interno	2	0	3	7	1	0	5
		Borde externo	0	0	0	2	6	0	5
	Mediopia	Borde interno	0	0	0	1	0	0	1
		Borde externo	0	1	1	1	0	0	0
	Antepie	I radio	8	2	4	2	3	0	1
		II radio	0	0	0	0	2	1	1
		III radio	0	0	0	0	0	0	1
		IV radio	2	0	2	2	0	0	3
		V radio	1	1	0	0	1	1	0
	Dedos	1er	2	4	2	4	2	1	2
		2º	1	2	1	2	0	0	2
		3º	0	0	0	0	0	0	1
		4º	0	0	1	1	0	0	0
		5º	0	0	1	1	1	0	0

## 4.7 Efectividad del tratamiento con láser de las verrugas plantares

### 4.7.1 Estudio preliminar

En la valoración de la efectividad del tratamiento con láser de las verrugas plantares se realizó un estudio preliminar en el que se llevó a cabo el ajuste de los parámetros del láser con los cuales se quería conseguir la efectividad de tratamiento sin dolor para el paciente. Durante este periodo los parámetros de pulso, pausa, potencia y fluencia fueron variando. En los casos en que el paciente notaba dolor, se le ofrecía la posibilidad de anestesiarse la zona.

El 84,38% de las verrugas fueron curadas después de realizar el tratamiento con el láser de 1064nm de longitud de onda con los diferentes parámetros utilizados. Se considerando *abandonos de tratamiento* aquellas verrugas a las cuales no se les pudo

realizar el seguimiento de su evolución porque los pacientes no acudieron a las vistas de control o porque el paciente no quiso seguir con el tratamiento con láser. En este caso, se describió un 10,94% de abandono de tratamiento. Al 4,69% restante se le realizó un cambio de tratamiento debido a que la evolución de la curación con el tratamiento láser no era el esperado (Tabla 4.7).

El genotipo con un porcentaje de curación del 100% fue el VPH-57a. Un porcentaje de curación elevado, superior al 90%, se apreció en el genotipo VPH-1a. Las verrugas con el genotipo VPH-27 fueron las que registraron un mayor abandono del tratamiento, con un 25% en el subtipo 27a y un 30% en el 27b. El VPH-2 fue el que presentó un mayor porcentaje, de entre todos los genotipos, de cambio de tratamiento (25%) (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7**Efectividad del tratamiento láser (estudio preliminar) *versus* genotipo del VPH

Genotipo	Total	%	Muestra			Porcentajes		
			Curados	Cambio de tratamiento	Abando del tratamiento	Curados	Cambio de tratamiento	Abando del tratamiento
1a	16	15,24	15	0	1	93,75	0,00	6,25
2	8	7,62	6	2	0	75,00	25,00	0,00
27a	8	7,62	6	0	2	75,00	0,00	25,00
27b	10	9,52	6	1	3	60,00	10,00	30,00
57a	13	12,38	13	0	0	100,00	0,00	0,00
57b	9	8,57	8	0	1	88,89	0,00	11,11
65	0	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,00
	<u>64</u>		<u>54</u>	<u>3</u>	<u>7</u>	<u>84,38</u>	<u>4,69</u>	<u>10,94</u>

#### 4.7.2 Estudio final

A partir de los resultados obtenidos del estudio preliminar, los parámetros se modificaron para conseguir mayor efectividad, con menos tiempo de tratamiento y menor dolor. Los pacientes que fueron tratados con los parámetros finales



establecidos en este estudio (Pulso: 500 ms; Pausa: 1,0 s; Potencia: 30 w; Fluencia: 212 J/cm<sup>2</sup>) fueron 32. Se extrajeron un total de 41 muestras para conocer su genotipo.

Los genotipos con el 100% de curación fueron el VPH-1a, 27a, 57b y 65. El VPH-57a tuvo una curación del 90% y el 27b del 80%. El VPH-2 presentó sólo una curación en la mitad de los casos. El abandono del tratamiento se presentó en los genotipos VPH-2 y 27b, en un 12,5% y 20%, respectivamente. El VPH-2 fue el único que presentó un porcentaje de cambio de tratamiento del 37,5% (Tabla 4.8).

**Tabla 4.8.**

Efectividad del tratamiento láser (con los parámetros finales) *versus* genotipo del VPH

Genotipo	Total	%	Muestra			Porcentajes		
			Curados	Cambio de tratamiento	Abando del tratamiento	Curados	Cambio de tratamiento	Abando del tratamiento
1a	6	14,6	6	0	0	100,00	0,00	0,00
2	8	19,5	4	3	1	50	37,5	12,5
27a	2	4,9	2	0	0	100,00	0,00	0,00
27b	5	12,2	4	0	1	80	0,00	20,00
57a	10	24,4	9	1	0	90	10	0,00
57b	7	17,1	7	0	0	100,00	0,00	0,00
65	3	7,32	3	0	0	100,00	0,00	0,00
	<u>41</u>		<u>35</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>85,00</u>	<u>9,8</u>	<u>4,9</u>

La tabla 4.9 muestra las diferentes dosis de energía administra en cada sesión de los pacientes que se les dio el alta (n=35). Los pacientes que en la primera visita recibieron una energía igual o inferior a 120 J, presentaban una verruga con un diámetro igual o inferior a 4 mm. La pieza de mano con un *spot* de 4 mm era la que se utilizaba para el tratamiento.

En los tratamientos sucesivos de todas las verrugas, la energía administrada podía variar a razón de:

- La disminución del diámetro de la lesión, que implicó una disminución de la energía administrada.

- La comprobación mediante dermatoscopio de presencia de verruga después de la aplicación del tratamiento, que suponía un aumento de la energía administrada.

Los pacientes que solicitaron la anestesia de la zona fueron el 15,62% (n=5).

**Tabla 4.9**

Energía total administrada en las diferentes verrugas plantares con los parámetros finales

Muestra	Energía/sesión (J)				
	1ª sesión	2ª sesión	3ª sesión	4ª sesión	5ª sesión
62	135	-	-	-	-
63	180	150	315	-	-
64	360	450	135	195	240
65	360	285	135	180	210
66	120	120	-	-	-
67	120	120	-	-	-
68	120	120	-	-	-
69	180	195	-	-	-
73	210	120	-	-	-
74	345	255	210	-	-
75	120	135	300	-	-
77	120	-	-	-	-
78	360	420	-	-	-
79	285	315	900*	-	-
80	165	165	165	135	285
81	150	-	-	-	-
82	195	195	135	-	-
83	120	120	120	-	-
84	120	120	120	-	-
85	210	210	300	-	-
87	285	330	480*	-	-
88	225	585*	-	-	-
89	270	270	-	-	-
91	120	-	-	-	-
92	360	180	390	450	105
93	90	90	120	150	-
94	60	90	135*	-	-
95	120	120	-	-	-
96	330	330	150	360	240
97	120	120	90	-	-
98	135	165	-	-	-
99	120	-	-	-	-
100	120	60	90	-	-
101	75	-	-	-	-
102	300*	-	-	-	-

\* Sesión en la que se le administró anestesia

El 42,85% de todas las verrugas presentaban un diámetro igual o inferior a 4 mm (n=15). El 26,66% de estas verrugas sólo precisó de una sesión de láser para su eliminación, el mismo porcentaje precisó de dos sesiones, el 40% de estas verrugas precisaron de 3 sesiones de láser y el 6,68% de cuatro sesiones.

Las verrugas con un diámetro superior a 4 mm fueron el 57,15% (n=20). El 11,53% de estas verrugas sólo precisó de una sesión de láser para su eliminación, el 23,07% de estas verrugas precisaron de dos sesiones, el mismo porcentaje precisó de tres sesiones y el 19,23% de cinco sesiones.



---

## 5. DISCUSIÓN

---

- 
- 5.1 Pacientes y muestras
  - 5.2 Obtención de la muestra
  - 5.3 Prevalencia de los genotipos del VPH
  - 5.4 Tipos de VPH y características de los pacientes
  - 5.5 Pacientes con múltiples verrugas
  - 5.6 Distribución de las VP y los diferentes genotipos según zona de aparición
  - 5.7 Efectividad del tratamiento con láser de las VP
-



## **5. DISCUSIÓN**

Las verrugas son tumores benignos que aparecen en la piel y están causados por el virus del papiloma humano. En el caso de las verrugas palmo-plantares, su zona de aparición se produce en las palmas y plantas de los pies.

En el presente estudio, llevado a cabo en el Hospital Podològic de la Universitat de Barcelona, se incluyeron pacientes sin restricciones de edad o sexo, que presentaron verrugas plantares. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia del tratamiento de las verrugas plantares mediante el láser de 1064 nm de longitud de onda y determinar el genotipo de los virus presentes en las verrugas diagnosticadas en el hospital podológico.

### **5.1 Pacientes y muestras**

Un 61,6% de la población de estudio pertenecía al sexo femenino. Este resultado refleja la predisposición del género femenino a acudir con mayor asiduidad a los diferentes profesionales de la salud, como es el caso del podólogo cuando aparece un problema de salud en los pies, en sus estados iniciales. Este dato concuerda con el porcentaje de mujeres asistidas que acude regularmente a visitarse al Hospital Podològic UB, siendo del 60%, respecto al 40% de hombres. Sólo se ha encontrado un estudio que refleje la prevalencia de la aparición de verrugas en el sexo femenino. Se trata de un estudio sobre verrugas cutáneas en niños y adolescentes, que manifiesta que las verrugas cutáneas aparecen con mayor frecuencia en niñas adolescentes, aunque no proporciona en qué porcentaje [56].

En el presente estudio, la edad de la población no fue un factor determinante, debido a que cualquier persona de cualquier edad puede ser susceptible del tratamiento de

las verrugas plantares con el láser utilizado, si bien se constata que la mayoría de los pacientes tratados fueron adultos mayores de 21 años. Este rango de edad mostraría la necesidad de buscar un tratamiento resolutivo para evitar una incapacidad temporal o la sobre-solicitud de permisos retribuidos para visitas al especialista. Hay estudios en los cuales los participantes son sólo niños [128], sólo adultos [129; 130], incluso estudios en los cuales el rango de edad no queda bien definido.

En nuestro estudio, tenemos un elevado número de personas a las cuales les es difícil recordar el tiempo de evolución de su verruga. Clínicamente sabemos que según el tipo de verruga y la zona de aparición, las verrugas pueden ser indoloras y no presentar sintomatología, de manera que el paciente puede no ser consciente de la presencia de la verruga hasta que no cursa con clínica. Posiblemente por este mismo motivo no se han encontrado estudios en los cuales se refleje la prevalencia del tiempo de aparición o evolución de las verrugas plantares.

## **5.2 Obtención de la muestra**

En el presente estudio, las muestras sobre las cuales se realizó la extracción del DNA viral fueron hiperqueratosis laminares de las verrugas. A nivel podológico, el protocolo de actuación en la verruga plantar se inicia con el corte laminar de la hiperqueratosis superficial, con el fin de eliminar toda la capa de queratina. La muestra se obtiene posteriormente mediante el raspado de la queratosis más profunda con una hoja de bisturí. En todas las muestras obtenidas con este método se obtuvo DNA para la posterior amplificación y secuenciación.

Se han descrito distintos métodos para la obtención de muestras de verrugas. En el estudio de Bruggink *et al.* la extracción de la muestra se realizaba en verrugas plantares y verrugas vulgares localizadas en manos y resto del cuerpo [41]. La técnica de obtención de la muestra descrita en este estudio fue mediante el frotado de la superficie de la verruga con una torunda de algodón pre-humedecida, según el método



descrito por Koning *et al.* [131]. El 7% de las muestras obtenidas mediante este método fueron negativas en la detección de DNA para la posterior amplificación y secuenciación.

Sasagawa *et al.* obtienen la muestra a partir de la resección de la verruga mediante láser de dióxido de carbono, la mitad de la cual es troceada para realizar la extracción de DNA. En todas las muestras se identificó un genotipo concreto de VPH [127].

Giannaki *et al.* presentaron un estudio sobre el tipo de genotipo de VPH de verrugas cutáneas en niños griegos [132]. La población objeto de estudio presentaba múltiples tipos de verrugas cutáneas y localizadas en diferentes zonas del cuerpo. El DNA viral se extraía a partir del laminado de las muestras de biopsia de la piel. En el 26,5% de las muestras no se identificó ningún genotipo de VPH.

Por lo tanto, el método de obtención de muestras utilizado en nuestro estudio aparece como un método óptimo y eficaz para la posterior extracción del DNA, con una efectividad del 100% comparable al método de Sasagawa mediante láser de CO<sub>2</sub> [127].

### **5.3 Prevalencia de los genotipos de VPH**

En nuestro estudio, para determinar el genotipo de las verrugas plantares se realizó la amplificación del genoma viral utilizando los cebadores que fueron diseñados por Sasagawa *et al.*, que amplificaban un fragmento de la región L1 del genoma viral de 17 tipos de VPH: VPH-1a, 2a, 3, 4, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 57, 60, 63, 65, 77, 91 y 94. Después de la purificación de los fragmentos amplificados y su secuenciación, cada muestra presentó un único genotipo [127].

Del total de las muestras analizadas, el genotipo prevalente fue el VPH-57 con un 37,14% (VPH-57a, 21,90%; VPH-57b, 15,24%), seguido del VPH-27 (VPH-27a, 9,52%; VPH-27b, 14,29%). El genotipo del VPH-65 presentó una prevalencia próxima al 3%. Los porcentajes de prevalencia encontrados para el genotipo VPH-1a, del género *mu*

(20,95%) y el del VPH-2 (15,24%) difirieron ostensiblemente de los presentados en el estudio de Sasagawa *et al.* [127].

Según la bibliografía consultada, el estudio de Sasagawa *et al.* es el único en el que las muestras provienen sólo de verrugas plantares. Las muestras de este estudio fueron 50 verrugas plantares, obteniéndose un único genotipo para cada muestra. El genotipo prevalente del 44% de las muestras era el VPH-27, seguido del VPH-57 con un 30% y el VPH-2a con un 18%. Todos ellos del género *alfa*. El género *mu* fue prevalente en un 2% en el genotipo VPH-1a y 63, respectivamente. Y el VPH-4 y VPH-65, del género *gamma*, de manera equitativa, en el 4% restante [127]. La población de este estudio tenía una media de edad próxima a la nuestra, si bien la presencia de las lesiones llegaba a ser de 10 años.

Tanto en nuestro estudio como en el de Sasagawa [127], los genotipos VPH-27 y 57 son los más prevalentes.

El resto de publicaciones disponibles hacen referencia a verrugas cutáneas. Por lo tanto es difícil establecer una comparación. El estudio de Bruggink *et al.* [41] refiere que un 17% de las verrugas cutáneas analizadas presentaban varios genotipos de VPH en una misma muestra; sin embargo hipotetizan que aunque en una misma verruga existan diferentes genotipos, sólo uno de estos genotipos es el responsable del desarrollo de la verruga. El estudio no determina cuál es el genotipo que prevalece sobre el resto. Giannaki *et al.* en su estudio sobre verrugas cutáneas revelan que su porcentaje es del 5,9% si bien apuntan que la presencia de diferentes genotipos de VPH en una sola muestra podría sugerir que los tipos de VPH que se producen en la piel pueden no ser naturalmente competitivos. También mencionan que no puede excluirse la posibilidad de contaminación, a pesar de las condiciones de esterilidad utilizadas durante el proceso [132].

En el estudio que realizó Rübben *et al.* [69] para analizar la epidemiología y la presentación clínica de verrugas comunes se describió que la mayoría de las verrugas vulgares localizadas en palmas y plantas eran inducidas por los genotipos VPH-2, 27 y

57. Este estudio señaló que en una misma verruga existen diferentes genotipos, pero no explica cuál de los genotipos prevalecía sobre otro, con lo cual se desconoce la prevalencia exacta de cada uno de estos tres genotipos.

En la literatura consultada, el genotipo VPH-1 es el más frecuente en las verrugas palmo-plantares, si bien no aparece porcentaje de prevalencia [9; 10; 14; 62; 66; 67; 85; 133]. El VPH-2 y VPH-4 aparecían también como genotipos muy frecuentes [9; 14; 66; 85], pero también se referían a ellos como raramente detectables [10; 67]. Los genotipos VPH-27, 57, 65 se describían como raramente detectables a nivel palmo-plantar [10; 14], si bien en otras localizaciones anatómicas con lesiones del tipo de verruga plantar/común son más frecuentes [10; 17; 66]. Cabe mencionar que no se dispone de información acerca de las poblaciones de estudio.

#### **5.4 Tipo de VPH y características de los pacientes**

En nuestro estudio sobre verrugas plantares, el genotipo con más incidencia en el sexo femenino fue el VPH-57 y en el sexo masculino el VPH-1. Cabe destacar que ambos genotipos pertenecen a géneros diferentes, *alfa* y *mu*, respectivamente. Bruggink *et al.* [41], en su estudio sobre la prevalencia y la relación de los tipos de VPH asociados a las verrugas cutáneas con las características del paciente, señala en sus tablas estos mismos resultados.

En nuestro estudio se observa que el genotipo VPH-1 está relacionado con pacientes varones de cualquier edad, con una evolución de la lesión entre 6 meses y un año. El genotipo VPH-65 está relacionado con pacientes mujeres, mayores de 21 años, con una evolución inferior a un año. En el caso del género *alfa*, los genotipos están relacionados con pacientes del género femenino (a excepción del VPH-27), mayores de 21 años y una evolución de la lesión de más de 6 meses.

Los resultados obtenidos sólo pueden equipararse con el estudio de Bruggink *et al.*, a pesar de que incluye tanto verrugas cutáneas vulgares como plantares [41]. El

genotipo VPH-1 aparece en edades infantiles y con un periodo de evolución inferior a los 6 meses, con una mayor localización plantar. El VPH-65 aparece por igual en ambos sexos y mayormente en la edad infantil, entre los 4-11. Todos los genotipos del género *alfa* se relacionan con el sexo femenino, en pacientes mayores de 21 años, a excepción del VPH-2 que aparece en la edad infantil, y con un tiempo de evolución mayor a los 6 meses en todos ellos.

En la literatura consultada, no se han encontrado otros estudios que relacionen el genotipo del VPH con el sexo, edad del paciente, y el tiempo de evolución.

### **5.5 Pacientes con múltiples verrugas**

En el presente estudio, el 22,22% de los pacientes presentó múltiples verrugas. La mitad de estos pacientes presentaba el mismo genotipo de VPH. Este hecho muestra que un componente en la transmisión del VPH es el autocontagio. Autores como Yelverton, Handisurya, Kirnbauer, Kopera, Salk, Conejo, Androphy, señalan el contagio por autoinoculación como fuente de infección de las verrugas cutáneas de una parte a otra del cuerpo, en nuestro caso la planta del pie [9; 14; 23; 60 - 62; 79]. El 50% restante presentaron diferentes genotipos. En todos estos casos, a excepción de un paciente, los genotipos encontrados fueron el VPH-2, 27 y 57, todos ellos pertenecientes al género *alfa*. Rübben *et al.* [69] en su estudio sobre características clínicas y distribución por edad de pacientes con verrugas vulgares hace referencia a las verrugas vulgares inducidas por el VPH 2, 27 y 57, englobando juntos estos tres genotipos del mismo género.

Un único paciente de nuestro estudio presentó genotipos de VPH de diferentes géneros. El 90% del género *mu* (1a) y el 10% del género *alfa* (57b). Podría considerarse que un mismo paciente puede presentar vía de transmisión por autoinoculación e infección *ex-novo*.

No se han encontrado estudios en los cuales se refleje la infección por diferentes tipos de genotipos de VPH en un mismo paciente.

### **5.6 Distribución de las verrugas plantares y los diferentes genotipos según zona de aparición**

En nuestro estudio, la localización de las verrugas plantares en las cuatro zonas que se dividió el pie (talón, mediopie, antepie y dedos) fue parecida. A nivel de talón, aparecieron en un 58,1% en el borde interno, con el genotipo VPH-57 siendo el más prevalente; en la zona del antepie, la cabeza del primer metatarsiano fue la más afectada con un 52,6%, siendo el genotipo VPH-2 el hallado con más frecuencia; finalmente el dedo más afectado fue el primer dedo con un 54,8%, con los genotipos VPH-27 y 57.

Este patrón de aparición es coincidente con el patrón de apoyo del pie durante la deambulación. Los puntos de máxima carga durante la deambulación, tanto en superficie como en tiempo de apoyo, son la cara medial (interna) del talón en el inicio del ciclo de la marcha y en el final, en la fase propulsiva, se utilizan dos sistemas de balancín: el primer metatarsiano y el primer dedo, para propulsar [134].

El estudio de Lafuente refiere la distribución de las verrugas plantares según la zona sea de presión (72%), de media carga (19%) o no apoyo (9%) [52]. En este caso no especifica la anatomía de localización de estas zonas. Bueno afirmó que la zona más frecuente era la zona metatarsal (80%) [55].

Referente a la distribución de los diferentes genotipos según su aparición, en nuestro estudio se aprecia que en el patrón de apoyo el género más frecuente es el *alfa* (VPH-2, 27 y 57). Si bien no se han encontrado estudios en los cuales se refleje la relación entre genotipo de verruga y lugar de aparición en el pie, es de destacar la relación de genotipos del mismo género que insta Rübben en su estudio (VPH 2, 27 y 57) con los aparecidos en el patrón de apoyo [69].

### 5.7 Efectividad del tratamiento con láser de las verrugas plantares

En el estudio preliminar que realizamos para llevar a cabo el ajuste de los parámetros de pulso, pausa, potencia y fluencia del láser de 1064 nm de longitud de onda, la efectividad del tratamiento fue del 84,38%. En este estudio preliminar no se tenía en consideración el tiempo de curación de la verruga, si bien se obtuvo una media de 8 sesiones para la curación. En el estudio con los parámetros finales establecidos, el porcentaje de curación fue ligeramente más elevado, un 85%. Sin embargo, los tiempos de curación oscilaron de 1 a 5 sesiones.

Los parámetros finales establecidos fueron un pulso de 500 ms, 30 W de potencia y una fluencia de 212 J/cm<sup>2</sup>. Con estas características, en el tiempo de emisión de un pulso, la zona recibía una energía de 15 J. Con una energía de emisión de 120 J, la efectividad del tratamiento queda reflejada sin que ello produzca un algia no tolerable para el paciente, con una media de 2 o 3 sesiones, según el diámetro de la verruga.

Se han encontrado estudios como los de Kimura *et al.* [135] y Han *et al.* [121] en los cuales se muestra la utilización del láser de 1064 nm para el tratamiento de verrugas cutáneas e incluidas en ellas, las verrugas plantares. Ambos estudios señalan la utilización de la pieza de mano con un diámetro de *spot* de 5 mm. En el estudio de Kimura, los parámetros de aplicación son una duración del pulso de 15 ms y una fluencia de 150-185 J/cm<sup>2</sup>, el número de sesiones son seis con un intervalo de 4 semanas entre cada sesión. El porcentaje global de curación es del 56%, siendo el específico en las verrugas plantares del 39% [135]. Han utiliza una duración del pulso de 20 ms y una fluencia de 200 J/cm<sup>2</sup>, el número de sesiones son cuatro con un intervalo de 4 semanas entre cada sesión. En este caso, el porcentaje de curación es del 96% [121]. En ambos estudios para evitar el dolor, antes del tratamiento se aplicaba hielo en la zona, anestésico tópico en pomada o infiltración de lidocaína 1%. no refieren la energía final administrada en la verruga. Tampoco se han encontrado estudios en los cuales se refleje este dato.

Bacelieri *et al.* [56], en su estudio sobre el abordaje terapéutico de las verrugas plantares para el tratamiento, presentan valores globales de curación de 48 a 93% para las verrugas localizadas en diferentes localizaciones cutáneas mediante el tratamiento con láser de colorante pulsado de 585 nm. Tan *et al.* [136] describieron un índice de curación del 50% en el caso de las verrugas plantares con el mismo tipo de láser.

Con los parámetros de nuestro estudio final, los géneros con un 100% de curación fueron el *mu* (VPH-1a) y el *gamma* (VPH-65). El género *alfa* obtuvo un 100% de curación en el genotipo VPH-27a, y 57. El porcentaje de curación de los restantes genotipos de este género, VPH-2, 27b y 57a, osciló entre el 50%, 80% y 90%, respectivamente. Se desconoce la causa de esta disminución de éxito de curación, si bien al pertenecer todos al mismo género el efecto terapéutico del láser tendría que ser similar. En el caso del VPH-2, podría correlacionarse con que la evolución de las verrugas plantares con este genotipo en nuestro estudio es superior a los 6 meses. No se han encontrado estudios en los cuales se refleje la relación entre los parámetros del láser y la energía administrada según el genotipo de verruga.

En cuanto a los denominados *abandonos de tratamiento*<sup>4</sup>, en el caso del estudio preliminar fue del 10,94% y en el estudio final del 4,9%. De estos porcentajes, no se pudo conocer si alguno de los pacientes no acudió a las visitas de control después del tratamiento por no observar la presencia de la verruga (esto podría equivaler a una eficacia del tratamiento y sin embargo, se registra como abandono de tratamiento).

---

<sup>4</sup> Son aquellas verrugas a las cuales no se les pudo realizar el seguimiento de su evolución porque los pacientes no acudieron a las visitas de control o porque el paciente no quiso seguir con el tratamiento con láser y abandonó el estudio.





---

## **6. CONCLUSIONES**

---



## 6. CONCLUSIONES

1. Los parámetros de aplicación del láser de 1064 nm de longitud de onda óptimos en nuestro estudio, con una media de 2 o 3 sesiones y sin que éste produzca un algia intolerable para el paciente, fueron: pulsos de 500 ms, 30 W de potencia, una fluencia de 212 J/cm<sup>2</sup> y una energía de emisión de 120 J.
2. El láser de 1064 nm ha demostrado su eficacia en el tratamiento de las verrugas plantares. Por lo tanto, estos resultados sugieren el uso del láser de 1064 nm de longitud de onda como tratamiento de elección de las verrugas plantares.
3. En lo que se refiere a los diferentes genotipos presentes en las verrugas plantares, nuestro trabajo confirma y amplía resultados al tener un mayor número de muestras analizadas (n=105) que los estudios anteriores.
4. La obtención de la muestra mediante corte laminar de la hiperqueratosis superficial de la verruga plantar es un método óptimo y eficaz, puesto que permitió la extracción del DNA viral con una efectividad del 100%.
5. La determinación de las secuencias de los fragmentos amplificados mostró que el género *alfa*, con el genotipo 27 y 57 en sus dos subtipos (a y b), fue el más prevalente en las verrugas plantares. Estos resultados obtenidos concuerdan con datos previamente publicados.
6. Este estudio mostró que en el sexo femenino el género prevalente fue el *alfa* con el genotipo VPH-57 y en el sexo masculino fue el género *mu* con el genotipo VPH-1.
7. Los individuos con múltiples verrugas plantares pueden presentar vía de transmisión tanto por autoinoculación como por infección *ex-novo*.
8. La localización de las verrugas en la planta del pie es coincidente con los puntos de máxima carga durante la deambulación, tanto en superficie como en tiempo de apoyo. El género *alfa*, con los genotipos VPH-2, 27 y 57, es el más coincidente con este patrón de apoyo.



---

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Watson KR, Kligora CJ. Estructura de la piel. En Hall JC. *Sauer Manual de enfermedades de la piel*. 9ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2008: 3-9.
- [2] Welsh U. Histología de Sobotta. 3ª ed. México D.F.: Editorial Médica Panamericana; 2014: 465-475.
- [3] Vela Romera A, Fernández Segura E, Correa Gámiz JJ, Garrido Colmenero C. Especificidades de la piel en ingeniería tisular. *Revista Española de Podología*. Junio 2013; 24 (2): 68-75.
- [4] De Lauro T. Callos. En: Freedberg I, Eisen A, Wolff, Austen F, Goldsmith L, Katz S. (ed) *Dermatología en Medicina General*. 7ª ed. Madrid: Panamericana: 2009: 1402-1404.
- [5] Powell J. Papillomavirus research and plantar warts. *The Foot*. March 1998; 8 (1): 26-32. doi:10.1016/S0958-2592(98)90016-5.
- [6] Scheuplein R. The skin as a barrier. En Jarret A (ed). *The physiology and pathophysiology of the skin*. vol 5. London: Academic Press, 1978:1680-1692.
- [7] Bresslerr S, Bressler CH. Skin and superficial fascia of the foot. *J Am Pod Med Ass*. 1991; 81: 379-383. doi: 10.7547/87507315-81-7-379.
- [8] Kirnbauer R, Klenz P, Okun MM. Virus del papiloma humano. EN: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RR. (eds) *Dermatologia*. vol I. Madrid: Elsevier, cop. 2004: 1217-1225.
- [9] Yelverton CB. Verrugas. En Arndt KA, Hsu JH. *Manual de tratamiento de las enfermedades dermatológicas*. 7ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 233-241.
- [10] Androphy EJ, Lowy DR. Verrugas. En Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. (dir). *Dermatología en medicina general [de Fitzpatrick: 7a edición*. Madrid: Médica Panamericana, cop. 2009: 1914-1923.

- [11] Burns D. Warts and all the history and folklore of warts. A review. *J Royal Soc Med.* 1992; 85 (1): 37-40. PMC1293460.
- [12] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* Jun 2004; 324 (1): 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033.
- [13] Pfister H. Papillomaviruses: general description, taxonomy and classification. En Salzman NP, Howley PM (ed). *The papovaviridae. vol2: The Papillomaviruses.* New York: Plenum Press, 1987: 1-38.
- [14] Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R. Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *JDDG;* 2009;7:453-466. doi: 10.1111/j.1610-0387.2009.06988.x.
- [15] Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. "Crystalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Exp Biol Med.* Oct 1949; 72 (1): 46-50. doi: 10.3181/00379727-72-17328.
- [16] Sanclemente G. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *European Academy of Dermatology and Venerology.* May 2002; 16 (3): 231-240. doi: 10.1046/j.1473-2165.2002.00419.x.
- [17] de Villiers E.M. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994; 186, 1-12. doi: 10.1007/978-3-642-78487-3\_1.
- [18] Glover MG: Plantar warts. *Foot & Ankle.* 1990, 11 (3): 172-178. doi: 10.1177/107110079001100308.
- [19] Massing AM, Epstein WL: Natural history of warts. *Arch Dermatol.* 1963; 87: 306.
- [20] Penneys N. Diseases Caused by Viruses. En Elder D, Elenitasas R, Jaworsky C (ed), *Lever's Histopathology of the Skin*, 8th ed, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:578.
- [21] Smotkin D. *Virología del papiloma humano. Infección genital por papilomavirus humano.* México: Ed Interamericana; 1989.



- [22] Richart RM, Massod S, Syrjanen KJ, Vassilakos P, Kaufman RH. Human papillomavirus. International Academy of Cytology Task Force Summary. Diagnostic Cytology Towards the 21<sup>st</sup> century: an international expert conference and tutorial. *Act Cytol.* 1998; (42): 50-58.
- [23] Kimbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89 (24): 12180-12184.
- [24] Ball E. Virus Papiloma Humano. Biología Molecular, genética y mecanismo oncogénico. *Derm Venez.* 1998; (37): 136-141.
- [25] Turek LP. The structure function and regulation of papillomavirus gene in infection and cervical cancer. *Adv Viral Res.* 1994; (44): 305-356.
- [26] Chen G, Stenlund A. Two patches of amino acids on the E2 AND binding domine define the surface for interaction with E1. *J Virol.* 2000; 74: 1506-1512. doi: 10.1128/JVI.74.3.1506-1512.2000.
- [27] Cowsert LM, Fox MC, Zon G, Miralbelli CK. In vitro evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus: potential treatment for genital warts. *Antimicrob Agents Chermother.* 1993; (37): 171-177. doi: 10.1128/AAC.37.2.171.
- [28] Cardoso JC, Calonje E. Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: A review. *Acta Dermatoven APA.* 2011; 20 (3): 145-154.
- [29] Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev.* June 2009. 73 (2): 348-370. doi: 10.1128/MMBR.00033-08.
- [30] Tan TM, Gloss B, Bernard HU, Ting RC. Mechanism of translation of the bicstronic mRNA encoding human papillomavirus type 16 E6-E7 genes. *The journal of general virology.* 1994; (75): 2663-2670.

- [31] Doobar J, Ely S, Sterling J, Mclean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1990; (352): 824-827. doi:10.1038/352824a0.
- [32] Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene*. 2001; 20 (34): 4740-4749. doi: 10.1038/sj.onc.1204655.
- [33] Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999; 18 (53): 7690-7700. doi: 10.1038/sj.onc.1202953.
- [34] Kornegay JR, Roger M, Davies PO, Shepard AP, Guerrero NA, Lloveras B, *et al*. International proficiency of consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement. *J. Clin. Microbiol.* March 2003; 41 (3): 1080-1086. doi: 10.1128/JCM.41.3.1080-1086.2003.
- [35] Shan KV, Howley PM. Papillomaviruses. En Fields BN, Knipe DM (ed). *Virology*. New York: Raven Press Ltd, 1990: 1651.
- [36] Jennings MB, Ricketti J, Guadara J, Nach W, Goodwin S. Treatment for simple plantar verrucae: monochloroacetic acid and 10% formaldehyde versus 10% formaldehyde alone. *J. Am Podiatr Med Assoc*. 2006; 96(1): 53-58.
- [37] Cobb MW. Human papillomavirus infection. *J Am Acad Dermatol*. 1990; 22 (4): 547-566. doi:10.1016/0190-9622(90)70073-Q.
- [38] Lutzner M. The human papillomaviruses. A review. *Arch Dermatol*. 1983; 119: 631-635.
- [39] Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. Dec 2000; 81 (12): 2959-2968. doi: 10.1099/0022-1317-81-12-2959.
- [40] Singh D, Bentley G, Trevino SG. Fortnightly Review: Callosities, corns and calluses. *Br Med J*. Jun 1996; 312 (7043): 1403-1406.

- [41] Bruggink SC, de Koning M, Gussekloo J, Egberts PF, Schegget J, Feltkamp M, Bavinck JN, Quint W, Assendelft W, Eekhof J. Cutaneous wart-associated HPV types: Prevalence and relation with patient characteristics. *J Clin Virol.* 2012; 55 (3): 250– 255. doi:10.1016/j.jcv.2012.07.014.
- [42] Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Zur Hde H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (HPVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* May 2010; 25, 401 (1): 70–79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002.
- [43] Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Vill LL, Delius H. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994; (170): 1077-1085. doi: 10.1093/infdis/170.5.1077.
- [44] Grayson W. Infectious diseases of the skin. En Calnje E, Brenn T, Lazar A, Mckee R, ediores. *Mckee's skin pathology with clinical correlations.* 4th ed. Toronto: Elsevier; 2012; 760-895.
- [45] Loo SK, Tang WY. Warts (non-genital). *BMJ Clinical Evidence.* 2009; 2009:1710.
- [46] Laurent R, Kienzler JL. Epidemiology of HPV infections. *Clin Dermatol.* 1985; 3: 64-70.
- [47] Sterling JC, Handfield-Jones S, Hudson PM. Guidelines for the Management of cutaneous warts. *British Journal of Dermatology.* 2001; 144 (1): 4-11. doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04066.x.
- [48] Stender I M. Tratamiento del virus del papiloma humano. En Goldman MP, Dover JS, Alam M (edit). *Terapia fotodinámica.* Madrid: Elsevier, 2006.
- [49] Luger EJ, Nissan M, Karpf A, Steinberg EL. Patterns of weight distribution under the metatarsal heads. *J Bone Joint Surg Br.* 1999; 2 (81): 199-202.
- [50] Bryant AR, Tinley P, Singer KP. Normal values of plantar pressure measurements determined using the EMED-SF system. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2000; 90 (6): 295-299. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/87507315-90-6-295>.

## Bibliografía

- [51] Chicharro EL, Alonso C. Factores relacionados con la elección del tratamiento de una verruga plantar. *Revista Española de Podología*. 2007; 18 (5): 218-222.
- [52] Lafuente G, Salcini JL, Galván RJ. Papiloma: estudio observacional, transversal descriptivo. *Revista Española de Podología*. 1999; (2): 92-95.
- [53] Lafuente G, Marugán M, Ruiz A. Monográfico. Lesiones por el virus del papiloma humano (VPH). *Revista Española de Podología*. 2000; XI (3).
- [54] López P. Infecciones por papovirus, papilomas plantares. Posibles tratamientos. *Podoscopio*. 2000; 1 (11): 24-32.
- [55] Bueno R, Fuentes Y. Análisis descriptivo del papiloma en pacientes de la Clínica Universitaria de Podología de la UCM. *Revista Española de Podología*. 2010; 3: 5-12.
- [56] Bacelieri R, Johnson SM. Cutaneous warts: An evidence-based approach to therapy. *Am Fam Physician*. Aug 2005; 15, 72 (4): 647-52.
- [57] Fox PA, Tung MY. Human papillomavirus: burden of illness and treatment cost consideration. *Am J Clin Dermatol*. 2005; 6: 365-381.
- [58] Gibbs S, Harvey I, Sterling JC. Local treatments for cutaneous warts: systematic review. *BMJ*. 2002; 325:461. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.325.7362.461>.
- [59] Rigo MV, Martínez CF, Verdú M. Factores de riesgo asociados a la transmisión de los papillomavirus en un ámbito escolar. Alicante 1999. *Atención primaria*. 2003; 31 (7): 415-420. doi:10.1016/S0212-6567(03)79200-2.
- [60] Kopera D. Verrucae vulgares: flashlamp-pumped pulsed dye laser treatment in 134 patients. *Int J Dermatol*. Nov 2003; 42 (11): 905-908. doi: 10.1046/j.1365-4362.2003.01994.x.
- [61] Salk R, Douglas TS. Intralesional Bleomycin Sulfate Injection for the Treatment of Verruca Plantaris. *J Am Podiatr Med Assoc*. May 2006; 96(3): 220-225. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/0960220>.
- [62] Conejo-Mir JR, Moreno JC, Camacho F. Infección por virus del papiloma humano. *Manual de Dermatología*. Madrid: Grupo Aula Médica, 2010: 787-796.

- [63] Viennet C, Gheit T, Muret P, Aubin F, Cabou J, Marchal A, Tommasino M, Humbert P. Assessment of the efficacy of a new formulation for plantar wart mummification: new experimental design and human papillomavirus identification. *Clinical and Experimental Dermatology*. Jan 2012; 38 (1): 85-88. doi: 10.1111/ced.12025.
- [64] Bae JM, Kang H, Kim HO, Park YM. Differential diagnosis of plantar wart from corn, callus and healed wart with the aid of dermoscopy. *British Journal of Dermatology*. 2009; 160 (1), p. 220-222. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08937.x.
- [65] Rodríguez JL, Garrido M, Calzado L. Verrugas víricas. En: *Dermatología: Correlación clínico-patológica*. Madrid: Área Científica Menarini; 2007. 631-635.
- [66] James WD, Berger TG, Elston DM. *Andrew's Diseases of the skin*. Clinical dermatology. London: Elsevier Saunders 11 ed. 2011. 397-401. ISBN: 9781437703146.
- [67] Odom RB, James WD, Berger TG. *Andrew's Dermatología clínica*. Marbán SL. Madrid: 2004, vol 1: 509-514.
- [68] Egawa K. New types of human papillomaviruses and intracytoplasmic inclusion bodies: a classification of inclusion warts according to clinical features, histology and associated HPV types. *Br J Dermatol*. 1994; 130: 158-66. doi: 10.1111/j.1365-2133.1994.tb02894.x.
- [69] Rübber A, Kalka K, Spelten B, Grußendorf-Conen EI. Clinical features and ge distribution of patients with HPV 2/27/57-induced common warts. *Arch Dermatol Res*. 1997; 289 (6): 337-40. doi: 10.1007/s004030050201.
- [70] Keefe M, A-Ghamdi A, Coggon D, Maitland NJ, Egger P, Keefe CJ, Carey A, Sanders CM. Butchers' warts: no evidence for person to person transmission of HPV7. *Br J Dermatol*. Jan 1994; 130 (1): 15-17. doi: 10.1111/j.1365-2133.1994.tb06875.x.
- [71] Lipke MM; An armamentarium of wart treatments. *Clinical medicine & research*. Dec 2006; 4 (4): 273-293. doi: 10.3121/cmr.4.4.273.

- [72] McCarthy DJ. Therapeutic considerations in the treatment of pedal verrucae. *Clin Podiatr Med Surg*. 1986; 3 (3): 433-448.
- [73] Martínez C. Verruga plantar versus callosidad plantar. *Piel*. 1987; (2): 244-250.
- [74] Bunney MH, Nolan MW, Williams DA. An assessment of methods of treating viral warts by comparative treatment trials based on a standard design. *Br J Dermatol*. Jun 1976; 94 (6): 667-679. doi: 10.1111/j.1365-2133.1976.tb05167.x.
- [75] Young S, Cohen G E. Treatment of verruca plantaris with a combination of topical fluorouracil and salicylic acid. *J Am Podiatr Med Assoc*. July 2005; 95(4): 366-369. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/0950366>.
- [76] Lafont P. *Revista Podología*. [Internet]; 2008 [citada 15 de febrero 2012]. Disponible en:[http://revistapodologia.com/jdownloads/Revista%20Digital%20Gratuita%20Espaola/revistapodologia.com\\_018es.pdf](http://revistapodologia.com/jdownloads/Revista%20Digital%20Gratuita%20Espaola/revistapodologia.com_018es.pdf).
- [77] Arribas PM, Ropa JM, González DJ, Pascual HJ. Monográfico. Lesiones por el virus del papiloma humano (VPH). *Revista Española de Podología*. 2000; XI (3).
- [78] García Carmona FJ. Dermatología Podológica. Guía Práctica Avanzada. Barcelona: Isdin-Ediciones, 2009.
- [79] Androphy EJ. Human papillomavirus: current concepts. *Arch Dermatol*. May 1989; 125 (5): 683-685. doi:10.1001/archderm.1989.01670170097018.
- [80] Freeman, D. Corns and calluses resulting from mechanical hyperkeratosis. *Am Fam Physician*. Jun 2002; 1; 65 (11): 2277-2280.
- [81] Potter J, Potter MJ. Effect of callus removal on Peak plantar pressures. *The Foot*. 2000; 10 (1): 23-26. doi:10.1054/foot.2000.0576.
- [82] Zalacain A, Ogalla JM, García-Patos V. Atlas y sinopsis de enfermedades cutáneas del pie. Barcelona: Edika Med, SL., 2008.
- [83] Grouios, G. Corns and calluses in athletes' feet. A cause for concern. *The Foot*. 2004; (14): 175-184. doi:10.1016/j.foot.2004.07.005.
- [84] Feasel AM. Clavos y callos. En Arndt KA, Hsu JH. *Manual de tratamiento de las enfermedades dermatológicas*. 7ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 46-48.

- [85] Weston WL, Lane AT, Morelli JG. *Dermatología pediátrica. Texto y atlas en color*. Elsevier Masson España. Barcelona, 2008.
- [86] Sheff J, Bregman P, Curran T. Bilaterally Symmetrical epidermal inclusion cysts with foreign-body giant-cell reaction. *J Am Podiatr Med Assoc*. Aug 1988; 88 (8): 410-413. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/87507315-88-8-410>.
- [87] Sheff J, Bregman P, Curran T. Bilaterally Symmetrical epidermal inclusion cysts with foreign-body giant-cell reaction. *J Am Podiatr Med Assoc*. Aug 1988; 88 (8): 410-413. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/87507315-88-8-410>.
- [88] Alcalá J, Aranda Y, Ahumada J, Romero ME, Calvo E. Cantaridina. Revisión bibliográfica como tratamiento de las verrugas plantares. *Revista Española de Podología*. 2011; XXII (3): 107-111.
- [89] Dawber RPR, Colver GB, Pringle F, Jackson A. *Cutaneous cryosurgery: Principles and clinical practice*. 2nd Edition. London: Taylor & Francis Ltd, 1997.
- [90] Pfau A, Abd-El-Raheem TA, Baumler W, Hohenleutner U, Landthaler M. Treatment of recalcitrant verrucae vulgares with Nd:YAG laser hyperthermia (Regensburg's technique) - preliminary results in 31 cases. *J Dermatol Treat*. 1995; 6 (1): 39-42. doi: 10.3109/09546639509080589.
- [91] Borovoy MA, Borovoy M, Elson LM, Sage M. Flashlamp Pulsed Dye Laser (585 nm). Treatment of Resistant Verrucae. *J Am Podiatr Med Assoc*. 1996; 86 (11): 547-550. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/87507315-86-11-547>.
- [92] Zelickson BD. Mecanismo de acción del ácido aminolevulínico tópico. En Goldman MP. (eds) *Terapia fotodinámica*. Madrid: Elsevier, cop. 2006: 1-11.
- [93] Pedraz J, Ruiz R. Nuevas fronteras en terapia fotodinámica. *Piel*. 2008; 23 (10):553-567. doi:10.1016/S0213-9251(08)75799-X.
- [94] Gómez Ortiz S, Gómez Facundo S. *Guía farmacológica de utilización en podología* 2010. Barcelona: Nexus medica Editores S.L. 2010.
- [95] Kwok CS, Gibbs S, Bennet C, Holland R, Abbott R. Topical treatments for Cutaneous warts (Review). *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 9.

- [96] Kaçar N, Taşlı L, Korkmaz S, Ergin Ş, Erdoğan B Ş. Cantharidin podophyllotoxin salicylic acid versus cryotherapy in the treatment of plantar warts: a randomized prospective study. *JEADV*. 2012, 26, 889-893. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04186.x.
- [97] Lin AN, Nakatsui T. Salicylic acid revisited. *International Journal of Dermatology*. 1998; 37 (5): 335-42.
- [98] Becerro de Bengoa R, Losa E, Gómez B, Sánchez R, Sáez A. Application of cantharidin and podophyllotoxin for the treatment of plantar warts. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2008; 98 (6): 445-450. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/0980445>.
- [99] Moed L, Shwayder TA, Chang MW. Cantharidin revisited: a blistering defense of an ancient medicine. *Arch Dermatol*. 2001; 137 (10): 1357–1360. doi:10.1001/archderm.137.10.1357.
- [100] Watkins P. Identifying and treating plantar warts. *Nurs Stand*. Jun 2006; 20 (42): 50–54.
- [101] Uliasz A, Lebwohl M. Other topical medications. In Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds. *Dermatology*, 2nd edn. Madrid: Elsevier, 2008: 1991–2005.
- [102] Higgins E, du Vivier A. topical immunotherapy: unapproved uses, dosages, or indications. *Clin Dermatol*. 2002; 20:515-521. doi:10.1016/S0738-081X(02)00272-9
- [103] Troncoso A, Cuiña JR, Inaranja MT, Allegue F. Cidofovir tópico para el tratamiento de verrugas plantares. *Farmacia hospitalaria*. 2010; 34 (1). doi:10.1016/j.farma.2009.07.004.
- [104] Mullen BR, Guiliana J, Nesheiwat F. Cimetidine as a first-line therapy for podal verruca: eight year retrospective analysis. *J Am Podiatr Med Assoc*. May 2005; 95 (3): 229-234. doi: <http://dx.doi.org/10.7547/0950229>.
- [105] Kubeyinje EP. Evaluation of the efficacy and safety of 0.05% tretinoin cream in the treatment of plane warts in Arab children. *J Dermatol Treat*. 1996; 7 (1): 21-22. doi: 10.3109/09546639609086864.



- [106] McCarthy DJ, Berlin SJ. The ultrastructural effects of 5-fluorouracil in the management of pedal verrucae. *J Am Podiatry Assoc.* 1982; 72 (8): 402-411.
- [107] Hursthouse MW. A controlled trial on the use of topical 5-fluorouracil on viral warts. *Br J Dermatol.* Jan 1975; 92 (1): 93-96. doi:10.1111/j.1365-2133.1975.tb03039.x.
- [108] Lee S, Kim JG, Chun SI. Treatment of verruca plana with 5% 5-fluorouracil ointment. *Dermatology.* 1980; 160 (6): 383-389. doi:10.1159/000250527.
- [109] Van Brederode RL, Engel ED: Combined cryotherapy/70% salicylic acid treatment for plantar verrucae. *J Foot Ankle Surg.* Jan-Feb 2001; 40 (1): 36-41. doi:10.1016/S1067-2516(01)80039-9.
- [110] Cucherat M, Haugh MC, Gooch M, Boissel JP. Evidence of clinical efficacy of homeopathy. A meta-analysis of clinical trials. *Eur J Clin Pharmacol.* Apr 2000; 56 (1): 27-33. doi: 10.1007/s002280050716.
- [111] Gruzelier JH. A review of the impact of hypnosis, relaxation, guided imagery and individual differences on aspects of immunity and health. *Stress* 2002; 5:147-163. doi: 10.1080/10253890290027877.
- [112] Dehghani F, Merat A, Panjehshahin MR, Handjani F. Healing effect of garlic extract on warts and corns. *Int J Dermatol.* 2005; 44: 612-615. doi: 10.1111/j.1365-4632.2004.02348.x.
- [113] Ley J, Guijo I, Vega ME. Fundamentos y novedades terapéuticas del láser vascular. Grupo Vena Estética, cop. 2002.
- [114] Dorros G, Seeley DL. *Understanding lasers.* New York: Futura, 1991.
- [115] Sherwood KA, Murray S, Kurban AK, Tan OT. Effect of wavelength on cutaneous pigment using pulsed irradiation. *J Invest Dermatol.* 1989; 92(5): 717-20. doi:10.1111/1523-1747.ep12721505.
- [116] Gutknecht N, de Paula Eduardo C, eds. A Odontologia e o laser. Atuação do laser na especialidade odontológica. Sao Paulo: Quintessence editora Ltda; 2004.

- [117] Arnabat Domínguez, J. *Efecto bactericida del láser de Er,Cr:YSGG en el interior del conducto radicular*. Director: Leonardo Berini Aytés y Miquel Viñas Ciordia. Barcelona: Universitat de Barcelona. Departamento Ciències Morfològiques i Odontostomatologia, 2005. [<http://hdl.handle.net/2445/36655>].
- [118] Miserendino LJ, Pick RM. Current applications of lasers in dentistry. *Lasers in dentistry*. Singapore: Quintessence publishing Co, Inc. 1995: 126-128.
- [119] Turner J, Hode L, eds. *The laser therapy handbook*. Grängesberg: Prima Books AB; 2004.
- [120] Vélez M, Trelles MA, Rigau J. Características y parámetros dosimétricos de los sistemas láser y otros sistemas lumínicos. En Cisneros JL, Camacho F (eds). *Láser y fuentes de luz pulsada intensa en dermatología y dermocosmética*. Madrid: Aula Médica Ediciones, 2000: 57-68.
- [121] Weiss RA, Sadick NS. Epidermal cooling crystal collar device for improved results and reduced side effects on leg telangiectasias using intense pulsed light. *Dermatol Surg*. Nov 2000; 26(11): 1015-1018. doi: 10.1046/j.1524-4725.2000.0260111015.x.
- [122] Chess C. Does simultaneous contact cooling reduce intravascular temperature during laser irradiation and impinge on selective vascular destruction? *Dermatol Surg*. March 1998; 24: 403-406. doi: 10.1111/j.1524-4725.1998.tb04178.x.
- [123] Huo W, Gao XH, Sun XP, Qi RQ, Hong Y, Mchepange UO, Li XD, Xiao BH, Lin JP, Li Zhang YJ, Li YH, Xiao T, Chen JZS, Chen HD. Local Hyperthermia at 44 C for the Treatment of Plantar Warts: A Randomized, Patient-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *J Infect Dis*. 2010; 201 (8): 1169-1172. doi: 10.1086/651506.
- [124] Han TY, Lee JH, Lee CK, Ahn JY, Seo SJ, Hong CK. Long-Pulsed Nd:YAG Laser Treatment of Warts: Report on a Series of 369 Cases. *J Korean Med Sci*. 2009; 24:889-93. doi: <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2009.24.5.889>.
- [125] Green MR, Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4<sup>a</sup> ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012: 58-63.

- [126] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. Dec 1985; 230 (4732): 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980.
- [127] Sasagawa T, Mitsuishi T. Novel polymerase chain reaction method for detecting cutaneous human papillomavirus DNA. *J. Med. Virol.* Jan 2012; 84 (1): 138-144. doi: 10.1002/jmv.22195.
- [128] de Haen M, Spigt MG, van Uden CJT, van Neer P, Feron FJM, Knotterus A. Efficacy of Duct tape vs placebo in the treatment of verruca vulgaris (warts) in primary school children. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006; 160 (11): 1121-1125. doi:10.1001/archpedi.160.11.1121.
- [129] Passeron T, Sebban K, Mantoux F, Fontas E, Lacour JP, Ortonne JP. 595 nm pulse dye laser therapy for viral warts: a single-blind randomized comparative study versus placebo. *Ann Dermatol Venereol.* Feb 2007; 134 (2): 135-139. doi: 10.1016/S0151-9638(07)91604-X.
- [130] Yazdanfar A, Farshchian M, Ffereydoonnejad M, Farshchian M. Treatment of common warts with an intralesional mixture of 5-Fluorouracil, lidocaine, and epinephrine: A prospective placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Dermatologic Surgery.* May 2008; 34 (5): 656–659. doi: 10.1111/j.1524-4725.2007.34123.x.
- [131] de Koning MNC, Khoe LV, Eekhof JAH, Kamp M, Gussekloo J, ter Schegget J, Bouwes Bavinck JN, Quint WGV. Lesional HPV types of cutaneous warts can be reliably identified by surface swabs. *Journal of Clinical Virology.* Oct 2011; 52 (2): 84–87. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.016.
- [132] Giannaki M, Kakourou T, Theodoridou M, Syriopoulou V, Kabouris M, Louizou E, Chrousos G. Human papillomavirus (HPV) genotyping of cutaneous warts in greek children. *Pediatric Dermatology.* 2013; 30 (6): 730–735. doi: 10.1111/pde.12113.

## Bibliografía

- [133] Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol*. Oct 1977; 24 (1): 108-120.
- [134] Perry J, Burnfield JM. Análisis de la marcha. Función normal y patològica. Barcelona: Limpergraf, 2015.
- [135] Kimura, U., Takeuchi, K., Kinoshita, A., Takamori, K. and Suga, Y. Long-pulsed 1064-nm neodymium:yttrium–aluminum–garnet laser treatment for refractory warts on hands and feet. *The Journal of Dermatology*. March 2014; 41 (3): 252–257. doi: 10.1111/1346-8138.12411.
- [136] Tan OT, Hurwitz RM, Stafford TJ. Pulsed dye laser treatment of recalcitrant verrucae: a preliminary report. *Lasers Surg Med*. 1993; 13 (1): 127-37. doi: 10.1002/lsm.1900130120.

---

## 8. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

---



## 8. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Fig. 1.1	Organización genética de los papilomavirus	7
Fig. 1.2	Ciclo biológico del VPH	11
Fig. 1.3	Cladograma con los diferentes tipos de VP (de Villiers, 2004)	13
Fig. 1.4	Cladograma con actuales géneros de VP (Bernard, 2010)	14
Fig. 1.5	Verruga vulgar en borde lateral del 1 <sup>er</sup> dedo del pie	18
Fig. 1.6	Mirmecia en verruga plantar	19
Fig. 1.7	Capilares trombosados	19
Fig. 1.8	Verruga en mosaico en cabezas metatarsales	20
Fig. 1.9	Verruga plana en dorso del pie	21
Fig. 1.10	Aspecto de una verruga plantar una vez deslaminada	24
Fig. 1.11	Propiedades que definen una onda	34
Fig. 1.12	Efecto de la densidad de potencia	39
Fig. 1.13	Esquema de las propiedades ópticas de los tejidos	40
Fig. 3.1	(a) Marcaje de las lesiones a tratar	52
	(b) Deslaminación de la hiperqueratosis superficial de la verruga.	52
	(c) Recogida de de la hiperqueratosis profunda en el eppendorf	52
Fig. 3.2	Aumento de la temperatura en 20 °C en el punto de aplicación del láser, después de tres disparos	54
Fig. 3.3	(a) Aplicación de gel de ultrasonidos sobre portaobjetos.	55
	(b) Cubreobjetos cubriendo el gel	55
	(c) Presión sobre el cubre objetos para esparcir y unificar la superficie del gel	55
	(d) Aspecto que presenta el gel una vez congelado	55
Fig. 3.4	Utilización del sistema de enfriamiento <i>in situ</i>	55
Fig. 3.5	(a) Aplicación del láser sobre zona del talón en espécimen fresco	57
	(b) Aspecto de la zona una vez aplicado el láser (Imagen dermatoscópica)	57
	(c) Disección de 1 cm <sup>2</sup> de la zona incluyendo tejido subcutáneo	57

	(d) Sección del tejido, donde apreciar la capacidad de penetración del láser de Nd-YAG	57
Fig. 3.6	Verruga plantar de diámetro superior a 4mm	59
	(a) Aspecto de la verruga una vez realizado el tratamiento con láser	59
	(b) Simulación de la aplicación de los diferentes puntos de disparo con el spot de 4mm para abarcar la superficie total de la verruga	59
Fig. 3.7	Verruga plantar de diámetro superior a 4mm, a la semana de haber sido tratada	60
Fig. 3.8	Imagen de una muestra donde aparecían la concentración de DNA y la absorbancia de los ácidos nucleicos	64
Fig. 3.9	Patrón utilizado en la identificación de fragmentos de DNA: <i>GeneRuler™ 50bp DNA Ladder</i>	69
Fig. 3.10	Resultado obtenido mediante el programa BLAST de alineamiento de secuencias, tomando como ejemplo la muestra 94	71
Fig. 4.1	Esquema de la distribución de las verrugas en la planta del pie	82



---

## 9. ÍNDICE DE TABLAS

---



## 9. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Asociaciones clínicas de los tipos de papilomavirus humano	22
Tabla 1.2	Diagnóstico diferencial de lesiones de tipo verrugoso en palmas y plantas	25
Tabla 1.3	Efecto fototérmico sobre los tejidos	42
Tabla 3.1	Sistemas de enfriamiento para laserterapia	54
Tabla 3.2	Parámetros iniciales del tratamiento láser	56
Tabla 3.3	Evolución de los parámetros del tratamiento láser	56
Tabla 3.4	Parámetros finales del tratamiento láser	58
Tabla 3.5	Oligonucleótidos o cebadores utilizados en la amplificación del DNA	65
Tabla 3.6	Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas de DNA lineales	67
Tabla 4.1	Características de los pacientes de la población de estudio	75
Tabla 4.2	Resultados de la alineación de secuencias mediante el programa BLAST y el nivel de homología	76
Tabla 4.3	Tipos de virus del papiloma humano aislados	79
Tabla 4.4	Perfiles demográficos y clínicos de todos los tipos de VPH	80
Tabla 4.5	Relación de pacientes con múltiples verrugas de diferentes genotipos	81
Tabla 4.6	Distribución de los genotipos según la zona de aparición	83
Tabla 4.7	Efectividad del tratamiento láser (estudio preliminar) <i>versus</i> genotipo del VPH	84
Tabla 4.8	Efectividad del tratamiento láser (con los parámetros finales) <i>versus</i> genotipo del VPH	85
Tabla 4.9	Energía total administrada en las diferentes verrugas plantares con los parámetros finales	86



---

## **10. ANEXOS**

---



## 10. ANEXOS

### Anexo 10.1

#### **Información para el participante en el tratamiento de verrugas con láser**

Los beneficios potenciales derivados de este estudio serán:

- La comprobación de la eficacia de aplicación del láser 1064nm en el tratamiento de verrugas plantares en los pies.

Los posibles efectos adversos o incomodidades derivados del estudio serán:

- Posibles reacciones inflamatorias.

En caso de efectos adversos se aplicará un tratamiento alternativo convencional que decidirá el podólogo responsable para cada paciente.

La participación en este estudio es de carácter totalmente voluntario. Existe la posibilidad de retirarse en cualquier momento del estudio, sin que por ello se altere la relación podólogo-paciente ni se produzca perjuicio en su tratamiento.

Los datos de los participantes serán accesibles al equipo de podólogos promotores del estudio. La información se mantendrá confidencial.

Cualquier duda o pregunta puede realizársela al podólogo responsable del estudio (Elena de Planell Mas; n. col 838-08-0564; - Tel. 620 51 31 07)

### **Consentimiento informado de tratamiento de verrugas con láser**

Sr/Sra..... con DNI.....,

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido la suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el podólogo.

Comprendo que mi participación en el estudio es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

De acuerdo con todo lo expuesto, presto libremente mi conformidad para participar en el ensayo, así como para la toma de fotografías durante el proceso.

El/La paciente

Firma

L'Hospitalet,..... de..... de 201.....

Núm ID: LV-.....



## Láser en verrugas plantares

### 1ª Visita

#### Identificación:

Nº Paciente: \_\_\_\_\_ Hª nº: \_\_\_\_\_ Fecha visita inicial: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Podólogo/a: \_\_\_\_\_

#### Datos demográficos:

Año nacimiento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Sexo:  H  M

#### Ocupación:

Trabajo actual: \_\_\_\_\_

Calzado habitual en el trabajo: \_\_\_\_\_

Calzado habitual diario: \_\_\_\_\_

#### Deporte:

- Gimnasio     
  Natación     
  Deportes de equipo     
  Otros deportes al aire libre  
 Actividad descalzo

#### Actividades complementarias:

- Caminar     
  Senderismo     
  Baile     
  Otras: \_\_\_\_\_

#### Tratamientos concomitantes:

Nombre comercial	Principio activo	Indicación
_____	_____	_____
_____	_____	_____

**Antecedentes:**

Antecedentes personales de verrugas:

No       Si    Localización y número: \_\_\_\_\_

**Antecedentes familiares de verrugas:**

No       Si    Localización y número: \_\_\_\_\_

**Varios:**

¿Camina descalzo habitualmente?: \_\_\_\_\_

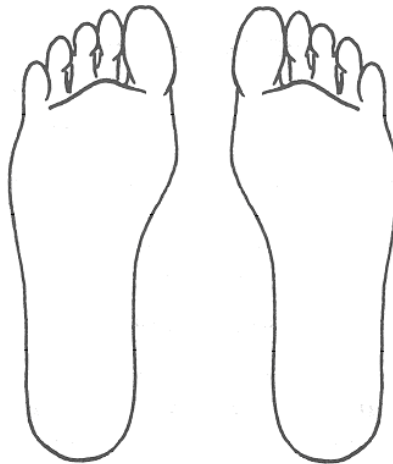
**Información de la lesión:**

Tipo de verruga:

Verruga plantar                      Número de lesiones: \_\_\_\_\_

Verruga en mosaico                  Número de lesiones: \_\_\_\_\_

Localización:



(Anotar área de cada lesión)

Tiempo de evolución: \_\_\_\_\_

**Observaciones:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Foto macroscópica

Foto dermatoscopia

Anexo 10.4

Human papillomaviruses genotyping in plantar warts.

*(Artículo pendiente de publicación)*



# Human Papillomaviruses Genotyping in Plantar Warts

Elena de Planell-Mas,<sup>1,2</sup> Blanca Martínez-Garriga,<sup>1\*</sup> Antonio Jesús Zalacain,<sup>1,2</sup> Teresa Vinuesa,<sup>1</sup> and Miguel Viñas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials, Faculty of Medicine, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Podiatric Hospital, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Podiatric Hospital, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Plantar warts are caused by human papillomaviruses (HPVs) and have been associated with several HPV genotypes. However, there are few studies focused exclusively on plantar warts. In this work, we aim to identify the HPV genotypes of plantar warts and explore their relation to demographic and clinical characteristics of patients. A total of 72 patients diagnosed with plantar warts were recruited at the Laser unit at Podiatric Hospital, University of Barcelona, Spain. Inner hyperkeratosis laminar sections of warts were collected and DNA of samples were extracted. Amplification of a conserved region of the HPV L1 gene was performed with the SK-Polymerase chain reaction method. DNA amplicons were sequenced and HPV types identified. The most prevalent genotypes detected among the 105 analyzed plantar warts were HPV-57 (37.1%), HPV-27 (23.8%), HPV-1a (20.9%), HPV-2 (15.2%), and HPV-65 (2.8%). The majority of patients (78%) presented one single plantar wart, whereas multiple warts were detected in 22.2% of patients. One patient with multiple warts presented HPV types from two different genera, suggesting the spread of warts by self-inoculation as well as by de novo infection. No significant differences between the number of warts in toes, midfoot and heel were found. The most prevalent HPV types detected in all areas belonged to the alpha genus. This work provides new insight on plantar warts and their associated HPV genotypes, and evidences the usefulness and reliability of both the sample collection procedure and the PCR method used for HPV detection and typing. **J. Med. Virol.** © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** human papillomavirus; virus classification; BLAST algorithm; biostatistics and bioinformatics; DNA extraction; DNA purification; research

and analysis methods; plantar warts (or foot warts); HPV genotypes

## INTRODUCTION

Cutaneous warts are benign intraepidermal tumors of the skin with a variety of manifestations, including common warts (*verrucae vulgaris*), palmar and plantar warts (*verrucae palmares et plantares*), mosaic warts, flat warts (*verrucae planae*) and butcher's warts [Kirnbauer et al., 2004]. The most prevalent of these types are vulgar and plantar warts [Bruggink et al., 2012]. They are usually diagnosed by their clinical appearance [McCarthy, 1986] although definitive diagnosis depends upon histopathologic examination. Histologically, the lesions caused by the infection of keratinocytes are characterized by hyperkeratosis, parakeratosis, papillomatosis, and acanthosis [Cardoso and Calonje, 2011; Viennet et al., 2012]. These lesions are capable of resolving spontaneously by the action of the host immune system, or remain asymptomatic for long periods of time evolving ultimately to big tumors that persist for months or years [Yelverton, 2007; Androphy and Lowy, 2009].

Warts are caused by human papillomaviruses (HPVs) [Burns, 1992; Kirnbauer et al., 2004; Androphy and Lowy, 2009]. Currently, over 120 HPV types have been fully characterized and classified into five genera (alpha, beta, gamma, mu, and nu) and 16 species [Strauss et al., 1949; Bernard et al., 2010; Bruggink et al., 2012]. The most frequently HPV types associated with cutaneous warts are

\*Correspondence to: Blanca Martínez-Garriga, Laboratory of Molecular Microbiology, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain. E-mail: blanca.martinez@ub.edu

Accepted 11 October 2016

DOI 10.1002/jmv.24713

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

HPV-2, -3, -7, -10, -27, and -57 from the alpha genus, HPV-4, -60, and -65 from the gamma genus, and HPV-1, -63 from the mu genus [Bruggink et al., 2012; Al Bdour et al., 2013].

Among the cutaneous HPV types, HPV-2, -27, -57, and HPV-1 have been associated with the development of plantar warts [Sasagawa and Mitsuishi, 2012; Al Bdour et al., 2013]. However, there are few studies focused exclusively on plantar warts, and more studies are needed to yield insights regarding their associated HPV types.

In this work, we aim to identify the HPV genotypes present in a sample of Spanish patients with plantar warts, and to explore the relation between HPV types and demographic and clinical parameters.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design and Participants

A total of 72 patients diagnosed with plantar warts were recruited at the Laser unit at Podiatric Hospital, University of Barcelona, Spain.

Subjects were male or female patients, who were not under topical treatment for at least 3 months before the recruitment. Patients with neuropathy and/or vascular diseases were excluded from the study. Eligible patients agreed to participate and provided informed consent. The study was performed in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki and approved by the University of Barcelona Bioethics Committee.

### Patients Characteristics

We recorded the following characteristics: sex; age (4–11 years vs. 12–20 years vs. older than 21 years); location of plantar warts (right foot vs. left foot, heel-internal vs. external-, midfoot-internal vs. external-, barefoot-first ray vs. second ray vs. third ray vs. fourth ray vs. fifth ray-, toes-great toe vs. second toe vs. third toe vs. fourth toe vs. fifth toe); time to development of warts (<6 months, 6–12 months, >12 months, unknown); and number of warts per patient.

### Sample Collection

Before sample collection, plantar warts were recorded on standard forms and pictures of each of them were taken. Then, disinfection with ethanol—was performed. Superficial hyperkeratosis of warts were cut in laminar sections by using a blade and discarded afterwards. A new blade was used to collect the inner hyperkeratosis laminar sections, which were introduced in an eppendorf tube containing 0.5 ml physiological serum and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### HPV Identification

DNA of samples was extracted using a previously described phenol-chloroform-isoamyl alcohol method [Green and Sambrook, 2012]. DNA purity and

concentration were determined spectrophotometrically using a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000.

We used the SK-Polymerase Chain Reaction (SK-PCR) method described by Sasagawa and Mitsuishi [2012], which detects most of the common HPV types causing cutaneous warts. Briefly, this method uses two pairs of degenerated primers (primers SKF1 and F2 and SKR1 and R2) to amplify a conserved region of the HPV L1 gene DNA. The resulting fragment is about 210–238 base pairs length [Sasagawa and Mitsuishi, 2012]. PCR amplicons were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) and sent to the Genomic Unit of the Scientific and Technological Centres of the University of Barcelona (CCiTUB) for DNA sequencing. The results of DNA sequences were compared to available HPV sequences in the GenBank database using the blast server (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

## RESULTS

### Patients Description

The study included 72 patients. Median age was 34 years (range 6–89) and 61.1% (44/72) of the participants were female (Table I). Most patients (77.8%; 56/72) presented one single plantar wart; 12.5% (9/72) had two and 9.7% (7/72) had three or more plantar warts (Table I).

### HPV Type Prevalence and Patient Characteristics

A total of 105 plantar warts were analyzed. All of them were positive for a single HPV DNA. The most prevalent genotype was HPV-57 (37.1%; 39/105), followed by HPV-27 (23.8%; 25/105), HPV-1a (20.9%;

TABLE I. Patients Characteristics (n = 72)

	Number of patients (%)
Sex	
Female	44 (61.11)
Male	28 (38.89)
Age	
4–11 years	3 (4.17)
12–20 years	16 (22.22)
>21 years	53 (73.61)
Time to develop of warts	
<6 month	17 (23.61)
6–12 month	14 (19.44)
> 12 month	18 (25.00)
Unknown	23 (31.94)
Number of warts per patient	
1	56 (77.78)
2	9 (12.50)
3	3 (4.17)
4	2 (2.78)
5	1 (1.39)
6 or more	1 (1.39)

TABLE II. HPV Genotypes Prevalence

HPV genotype	Number of patients (%)
1a	22 (20.95)
2	16 (15.24)
27	
27a	10 (9.52)
27b	15 (14.29)
57	
57a	23 (21.90)
57b	16 (15.24)
65	3 (2.86)

22/105), HPV-2 (15.2%; 16/105), and HPV-65 (2.8%; 3/105) (Table II).

Table III shows the relationship between the HPV types and the patient characteristics. The most prevalent genotype in women was HPV-57 (either -57a or -57b), and HPV-1a in men (corresponding values are shown in bold). HPV genotypes-2, -27b, -57a, and -57b belonging to the alpha genus were present in adults older than 21 years, and absent or minor in childhood. The mu genus was detected in all ages. Time to development of warts was above 6 months in most cases (55.2%; 58/105), although the appearance of 28.6% (30/105) of warts was unknown. Warts belonging to the mu genus mainly developed in less than 1 year, whereas warts of the alpha genus were primarily detected over a prolonged period of time (6 months to more than a year).

Individuals with multiple warts were 22.2% (16/72), being alpha genotype the most prevalent (n = 14). Among all individuals with multiple warts, half of them (n = 8) had different HPV genotypes (Fig. 1). However, HPV types for each patient belonged to the same genus (alpha), except for one of the patients, who presented several warts from two different genera (alpha and mu) (Fig. 1).

**Location of Plantar Warts and HPV Genotypes**

Figure 2 shows the location of all plantar warts. There were no significant differences between the number of warts in toes, midfoot and heel. Taking into account both feet, the most affected areas were the internal ones: medial (inside) zone of the heel (17.1%; 18/105), the first metatarsal head (19.0%; 20/105) and the great toe (16.2%; 17/105).

The most prevalent genotypes detected in all areas belonged to the alpha genus. The most frequently identified genotype in the heel was HPV-57 (51.6%; 16/31), while HPV-2 was more prevalent in barefoot warts (28.9%; 11/38), and both HPV-27 and HPV-57 genotypes in toes (70.9% in total; 22/31) (Table IV).

**DISCUSSION**

In the present study, we analyzed 105 plantar warts from 72 patients. Lamina sections of inner

TABLE III. Clinical and Demographic Characteristics of All Identified HPV Types (n = 105)

	Alpha (Esp. 4)				Gamma (Esp. 1)			All warts n = 105
	HPV 2 n = 16	HPV 27a n = 10	HPV 27b n = 15	HPV 57a n = 23	HPV 57b n = 16	HPV 65 n = 3	Mu (Esp. 1) HPV 1a n = 22	
Sex								
Male	6 (37.50)	4 (40.00)	9 (60.00)	4 (17.39)	5 (31.25)	1 (33.33)	16 (72.73)	45 (42.86)
Female	10 (62.50)	6 (60.00)	6 (40.00)	19 (82.61)	11 (68.75)	2 (66.67)	6 (27.27)	60 (57.14)
Age								
4-11 years	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (6.67)	1 (4.35)	1 (6.25)	0 (0.00)	8 (36.36)	11 (10.48)
12-20 years	1 (6.25)	5 (50.00)	3 (20.00)	1 (4.35)	3 (18.75)	1 (33.33)	6 (27.27)	20 (19.05)
>21 years	15 (93.75)	5 (50.00)	11 (73.33)	21 (91.30)	12 (75.00)	2 (66.67)	8 (36.36)	74 (70.48)
Time to development of warts								
<6 months	0 (0.00)	2 (20.00)	1 (6.67)	5 (21.74)	1 (6.25)	1 (33.33)	7 (31.82)	17 (16.19)
6-12 months	6 (37.50)	2 (20.00)	3 (20.00)	2 (8.70)	8 (50.00)	1 (33.33)	9 (40.91)	31 (29.59)
>12 months	6 (37.50)	5 (50.00)	3 (20.00)	8 (34.78)	2 (12.50)	0 (0.00)	3 (13.64)	27 (25.71)
Unknown	4 (25.00)	1 (10.00)	8 (53.33)	8 (34.78)	5 (31.25)	1 (33.33)	3 (13.64)	30 (28.57)

Values are number of warts (percentage of warts by column variables).

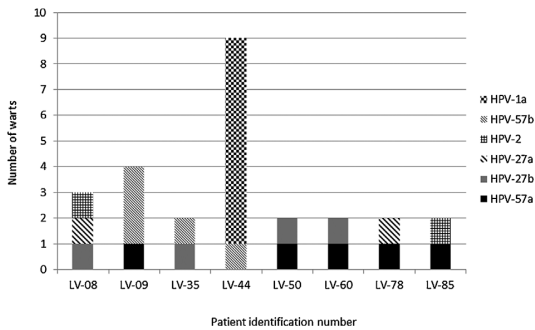


Fig. 1. Patients with multiple warts who presented with different HPV genotypes: Number of warts and their corresponding HPV genotypes.

hyperkeratosis of warts were obtained and DNA was extracted using a standard procedure [Green and Sambrook, 2012]. We were able to obtain PCR amplicons for each of the warts and determine their sequences, by using the method described by Sasagawa and Mitsuishi [2012] to identify the HPV genotypes.

The sample collection method used is a rapid and simple procedure that allows good performance, since all 105 samples were identified. Several other methods have been described in the literature. The study by de Koning et al. [2011], for instance, aimed to validate the use of surface swabs for reliable detection of HPV, and to compare the results with the

TABLE IV. Distribution of HPV Genotypes Depending on the Area of Location

Location	Genera						
	Alfa					Gamma	Mu
	2	27a	27b	57a	57b	65	1a
<b>Both feet</b>							
<b>Heel</b>							
Medial zone	2	0	3	7	1	0	5
Lateral zone	0	0	0	2	6	0	5
Total warts in heel (n = 31)	2	0	3	9	7	0	10
<b>Midfoot</b>							
Medial zone	0	0	0	1	0	0	1
Lateral zone	0	1	1	1	0	0	0
Total warts in midfoot (n = 5)	0	1	1	2	0	0	1
<b>Barefoot</b>							
I ray	8	2	4	2	3	0	1
II ray	0	0	0	0	2	1	1
III ray	0	0	0	0	0	0	1
IV ray	2	0	2	2	0	0	3
V ray	1	1	0	0	1	1	0
Total warts in barefoot (n = 38)	11	3	6	4	6	2	6
<b>Toes</b>							
1st	2	4	2	4	2	1	2
2nd	1	2	1	2	0	0	2
3rd	0	0	0	0	0	0	1
4th	0	0	1	1	0	0	0
5th	0	0	1	1	1	0	0
Total warts in toes (n = 31)	3	6	5	8	3	1	5

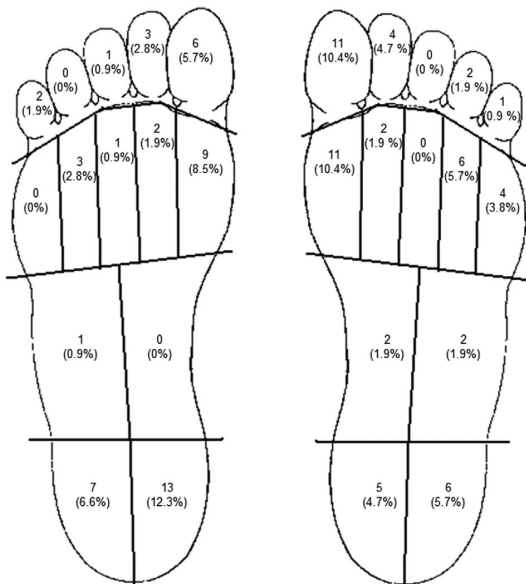


Fig. 2. Location of plantar warts from all patients on the soles of feet. Values are number of warts (percentage of warts).

ones obtained when using swabs and deeper wart portions. They found that the use of swabs was a sensitive method, although it failed to identify two out of 25 samples. In our work, the total number of analyzed samples was much higher and all of them were positively identified. Among studies based on biopsy procedures, Giannaki et al. [2013] collected cutaneous wart biopsies and obtained reliable identification of HPV in 73.5% of cases. In contrast, the study by Sasagawa and Mitsuishi [2012] successfully identified all warts, which were resected using a carbon dioxide laser. Although the sensitivity of their method is very high, the collection procedure based on the extraction of the inner hyperkeratosis of warts is equally sensitive, and in addition it is a simpler and least invasive technique. These results confirm the suitability of the method used in this study.

HPV-57 was the most prevalent genotype detected in women and HPV-1a in men, both genotypes belonging to different genera: alpha and mu, respectively. Bruggink et al. [2012], in their study on the prevalence of wart-associated HPV types in a sample of individuals with cutaneous warts showed similar results.

In this study, warts with HPV-2, -27, and -57 mainly occurred in adults older than 21 years, and were absent or minor in childhood, whereas HPV-1-induced



warts were detected in all ages. These findings are not in accordance to those obtained by Bruggink et al. [2012], who found that HPV-2, -27, and -57 types occurred in all ages and HPV-1 warts were mainly detected in childhood. This study included not only plantar warts but also common warts that may account for the differences observed. Moreover, it should be noted that in our study the number of patients younger than 20 years was low (26.4%; 19/72), and the conclusions obtained from these results should be further examined to better determine the age-specific HPV prevalence.

Most of the studies on HPV types of warts that have been published so far are focused not only on plantar warts but also in cutaneous warts, except for the Sasagawa study [Sasagawa and Mitsuishi, 2012]. Our results are similar to those obtained by Sasagawa and Mitsuishi. In our study, all plantar warts were infected with a single HPV type and the most prevalent genotypes were HPV-57 (37.1%) and HPV-27 (23.8%), followed by HPV-1a (20.9%), HPV-2 (15.2%), and HPV-65 (2.8%). Sasagawa and Mitsuishi analyzed 50 plantar warts, identifying HPV-27 as the most prevalent type, and HPV-57 and HPV-2 as relatively common types. However, significant differences between studies are found when comparing the less prevalent HPV types. They rarely found HPV-1a, -4, and -63, whereas in our study HPV-1a was almost as prevalent as HPV-27. Although the median age of the patients involved in both studies was similar, the samples in that study originated from a different source population.

Rübben et al. [1997] describe the most frequent HPV genotypes associated with common warts in palmoplantar location: HPV-2, -27, and -57. These results are in accordance with our data, although they did not detect the HPV-1a genotype in any of the analyzed warts. It is important to highlight that the methodology they used for the identification of HPV genotypes relies on restriction enzyme digestion patterns, and not on sequencing techniques. On the other hand, the study does not differentiate between plantar warts and warts extracted from other anatomical locations.

Other investigations and data available in the literature show that HPV-1 genotype is the virus type with the highest frequency in palmoplantar warts [Burns, 1992; Odom et al., 2004; Weston et al., 2008; Androphy and Lowy, 2009; Handisurya et al., 2009; Conejo-Mir et al., 2010; James et al., 2011], whereas HPV-27 and HPV-57 types are rarely detected [Androphy and Lowy, 2009; Handisurya et al., 2009]. Data extracted from the literature on HPV-2 and HPV-4 frequency are also variable [Burns, 1992; Odom et al., 2004; Weston et al., 2008; Androphy and Lowy, 2009; Handisurya et al., 2009; James et al., 2011], emphasizing the need for greater uniformity in the methodologies used to detect and identify HPV genotypes, as well as to characterize study populations.

Half of patients presenting multiple warts had the same HPV genotype, suggesting auto (self) inoculation from one site to another. Several authors have reported that autoinoculation is one of the causes of newly acquired infections [Androphy, 1989; Burns, 1992; Kirnbauer et al., 1992; Kopera, 2003; Salk and Douglas, 2006; Handisurya et al., 2009; Conejo-Mir et al., 2010]. HPV-2, -27, or -57 genotypes, which are closely related viruses belonging to the alpha genus, were present in all other cases, except for one. The presence of different HPV genotypes from the alpha genus in patients with multiple warts has been previously described by Rübben et al. [1997], although samples in their study were extracted from common warts.

Surprisingly, one of the participants with multiple warts presented two HPV types (HPV-1a and HPV-57b) from two different genera (mu and alpha genus, respectively), indicating that the warts were spread by self-inoculation and by de novo infection. So far, no other studies have reported the presence of different warts from different genera in the same patient.

It is important to highlight differences observed in the time to development of warts based on their HPV genotype. Warts belonging to the mu genus mainly developed in less than 1 year and warts of the alpha genus were primarily detected over a prolonged period of time. Nevertheless, a significant percentage of patients (31.9%) were not able to remember when their warts appeared. Warts can be present but not often recognized clinically, unless they cause harm or are detected by the individual.

Considering the location of plantar warts, the most affected areas were the medial (inside) zone of the heel, the first metatarsal head and the great toe. The observed distribution of warts reflects the usual gait pattern. Plantar warts frequently appear beneath pressure points, which are vulnerable sites on the skin of feet [Perry and Burnfield, 2010]. The most prevalent genotypes found in these locations were HPV-2, -27, and -57 (HPV-57 in the heel, HPV-2 in barefoot warts, and HPV-27 and HPV-57 in toes). These types were also predominantly found in plantar warts in the study by Rübben et al. [1997].

In conclusion, this study provides new insight on plantar warts and their associated HPV genotypes, and evidences the usefulness of the PCR method used. The data presented also suggest that obtaining laminar sections of inner hyperkeratosis of plantar warts is an accurate and reliable collection procedure for further detection of HPV genotypes.

## REFERENCES

- Al Bdour S, Akkash L, Shehabi AA. 2013. Detection and typing of common human papillomaviruses among Jordanian patients. *J Med Virol* 85:1058-1062.
- Androphy EJ, Lowy DR. 2009. Verrugas. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ. (dir).

- Dermatología en medicina general (de) Fitzpatrick. 7a edición. Madrid: Médica Panamericana, cop, pp 1914–1923.
- Androphy EJ. 1989. Human papillomavirus: Current concepts. *Arch Dermatol* 125:683–685.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Zur Hde H, de Villiers EM. 2010. Classification of papillomaviruses (HPVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70–79.
- Bruggink SC, de Koning M, Gussekloo J, Egberts PF, Schegget J, Feltkamp M, Bavinck JN, Quint W, Assendelft W, Eekhof J. 2012. Cutaneous wart-associated HPV types: Prevalence and relation with patient characteristics. *J Clin Virol* 55:250–255.
- Burns D. 1992. Warts and all the history and folklore of warts. A review. *J Royal Soc Med* 85:37–40.
- Cardoso JC, Calonje E. 2011. Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: A review. *Acta Dermatoven APA* 20:145–154.
- Conejo-Mir JR, Moreno JC, Camacho F. 2010. Infección por virus del papiloma humano. *Manual de Dermatología*. Madrid: Grupo Aula Médica, pp 787–796.
- de Koning MNC, Khoe LV, Eekhof JAH, Kamp M, Gussekloo J, ter Schegget J, Bouwes Bavinck JN, Quint WGV. 2011. Lesional HPV types of cutaneous warts can be reliably identified by surface swabs. *J Clin Virol* 52:84–87.
- Giannaki M, Kakourou T, Theodoridou M, Syriopoulou V, Kabouris M, Louizou E, Chrousos G. 2013. Human papillomavirus (HPV) genotyping of cutaneous warts in greek children. *Pediatric Dermatol* 30:730–735.
- Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 58–63.
- Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R. 2009. Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *JDDG* 7:453–466.
- James WD, Berger TG, Elston DM. 2011. *Andrew's diseases of the skin*. Clinical dermatology. 11th edition. London: Elsevier Saunders, pp 397–401.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci* 89:12180–12184.
- Kirnbauer R, Klenz P, Okun MM. 2004. Virus del papiloma humano. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RR, editors. *Dermatología*. vol I. Madrid: Elsevier, cop, pp 1217–1225.
- Kopera D. 2003. Verrucae vulgares: Flashlamp-pumped pulsed dye laser treatment in 134 patients. *Int J Dermatol* 42:905–908.
- McCarthy DJ. 1986. Therapeutic considerations in the treatment of pedal verrucae. *Clin Podiatr Med Surg* 3:433–448.
- Odom RB, James WD, Berger TG. 2004. *Andrew's dermatología clínica*. vol 1. Madrid: Marbán SL, pp 509–514.
- Perry J, Burnfield JM. 2010. *Gait analysis: Normal and pathological function*. 2nd edition. Thorofare: Slack, cop p, pp 19–47.
- Rübben A, Kalka K, Spelten B, Grußendorf-Conen EI. 1997. Clinical features and ge distribution of patients with HPV 2/27/57-induced common warts. *Arch Dermatol Res* 289:337–340.
- Salk R, Douglas TS. 2006. Intralesional bleomycin sulfate injection for the treatment of verruca plantaris. *J Am Podiatr Med Assoc* 96:220–225.
- Sasagawa T, Mitsuishi T. 2012. Novel polymerase chain reaction method for detecting cutaneous human papillomavirus DNA. *J Med Virol* 84:138–144.
- Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. 1949. "Crystalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Exp Biol Med* 72:46–50.
- Viennet C, Gheit T, Muret P, Aubin F, Cabou J, Marchal A, Tommasino M, Humbert P. 2012. Assessment of the efficacy of a new formulation for plantar wart mummification: New experimental design and human papillomavirus identification. *Clin Exp Dermatol* 38:85–88.
- Weston WL, Lane AT, Morelli JG. 2008. *Dermatología pediátrica*. Texto y atlas en color. Barcelona: Elsevier Masson España p, pp 138–141.
- Yelverton CB. 2007. Verrugas. In: Arndt KA, Hsu JH, editors. *Manual de tratamiento de las enfermedades dermatológicas*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins p, pp 233–241.