



Detección de virus herpes humano 6 (HHV-6) y virus herpes humano- 7 (HHV-7) en mucosa cervical normal y en lesiones cervicales escamosas

Patricia Biganzoli.

Maestría en Microbiología con Orientación en Investigación en Salud Humana -Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2017.

Aprobada: 2017

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Detección de virus herpes humano 6 (HHV-6) y virus herpes humano- 7 (HHV-7) en mucosa cervical normal y en lesiones cervicales escamosas by Patricia Biganzoli is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Médicas

Maestría en Microbiología con Orientación en Investigación en
Salud Humana

**“Detección de Virus herpes humano 6 (HHV-6)
y Virus herpes humano 7 (HHV-7) en mucosa
cervical normal y con lesiones cervicales
escamosas”.**

Maestrando: Patricia Biganzoli

Directora: Prof. Dra. Cecilia Cuffini

Co Director: Prof. Dr. Leonardo Ferreyra

Laboratorio de Herpesvirus Linfotrópicos Humanos

Instituto de Virología “J. M. Vanella”. Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Córdoba.

2017

Agradecimientos

En primer lugar a mi familia, a mi esposo Gabriel, mis hijos Emilio, Camila y Federico, que han sabido acompañarme, comprenderme y sostenerme en este camino.

A la Dra. Cecilia Cuffini y al Dr. Leonardo Ferreyra por el apoyo y la confianza puestos en este trabajo.

A Marina Monetti, Celia Frutos, Ximena Kiquen, Jessica Mosmann por los consejos, enseñanzas y colaboración, que desinteresadamente han sabido brindarme.

Al Dr Jorge Pauán, por haberme iniciado en este camino de búsqueda que ya no podría dejar.

A mis compañeros y amigos de la Cátedra de Bacteriología y Virología Médica donde me formé y crecí no solo en la búsqueda de conocimiento sino como persona.

Por siempre gracias!!!

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1.1 INTRODUCCIÓN	10
1.2 OBJETIVOS	22
Capítulo 2 MATERIAL Y MÉTODOS	23
2.1 RECOLECCIÓN DE CÉLULAS DE LA MUCOSA CERVICAL	24
2.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE HPV	25
2.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE HHV-6 Y HHV-7	26
2.4 MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADN DE HPV EN LAS MUESTRAS DE HISOPADO ENDOCERVICAL	27
2.4.1 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE HPV POR EL ESTUDIO DE POLIMORFISMO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)	
2.5 MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADN VIRAL DE HHV-6 Y HHV-7 EN EXTRACTOS DE ADN OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS DE HISOPADO ENDOCERVICAL	28
2.6 ANALISIS ESTADISTICO	30
Capítulo 3 RESULTADOS	31

3.1 DETECCIÓN DE ADN VIRAL DE HHV-6 Y HHV-7 EN EXTRACTOS DE ADN OBTENIDOS A PARTIR DE CITOLOGÍAS CLASIFICADAS COMO CITOLOGÍA NORMAL, LSIL Y HSIL	32
3.2 DETERMINACIÓN DE RIESGO	33
3.3 DETECCIÓN DE ADN DE HHV-6 Y HHV-7 EN MUESTRAS LSIL Y HSIL	35
3.4 DETECCIÓN DE ADN DE HHV-6 Y HHV-7 EN MUESTRAS LSIL Y HSIL, HPV POSITIVAS Y NEGATIVAS	37
3.5 COINFECCIÓN HHV-6/HPV Y HHV-7/HPV	39
3.6 DETERMINACIÓN DE RELACIÓN DE HHV-6 Y HHV-7 CON GENOTIPOS ONCOGÉNICOS DE HPV	40
3.7 PREVALENCIA DE HHV-6 Y HHV-7 EN LA MUCOSA EN RELACIÓN A LA EDAD	41
Capítulo 4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	42
4.1 DISCUSIÓN	43
4.2 CONCLUSIONES	46
Capítulo 5 BIBLIOGRAFÍA	47

Resumen

Tanto el virus Herpes humano 6 (HHV-6) como el virus Herpes humano 7 (HHV-7) tienen alta prevalencia en la población mundial. Producen infección persistente en células epiteliales de mucosas y glándulas salivales.

Asociados con diferentes procesos oncogénicos pueden infectar productivamente células inmortalizadas por Virus Papiloma Humano (HPV), líneas celulares de carcinoma cervical, transactivar la expresión de genes virales y de ARN viral que codifican para las oncoproteínas E6 y E7 y además, acelerar el crecimiento de tumores en ratones.

Por otra parte, la infección genital por HPV puede inducir lesiones intraepiteliales escamosas de distinto grado de malignidad hasta llegar a causar cáncer cervical. Las lesiones causadas por este virus han sido clasificadas, histopatológicamente, según el criterio de Bethesda, como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL). Sin embargo, el prolongado intervalo de tiempo entre la entrada del virus y la transformación maligna de las mismas hace pensar que este proceso de carcinogénesis depende de la concomitancia de otros factores, como infecciones aún no caracterizadas. La hipótesis de este trabajo sostuvo que tanto el HHV-6 como el HHV-7 infectan las células epiteliales de la mucosa cervical y actúan como cofactores en la transformación maligna que causa la infección por HPV. El objetivo fue determinar la infección por HHV-6 y HHV-7, en la mucosa cervical de mujeres (entre 19-45 años de edad) que estudiadas histológicamente, resultaron sin lesiones visibles o con distinto grado de atipia y la asociación entre estos herpes virus y la infección por HPV.

Se estudiaron muestras cervicales, las cuales fueron agrupadas de la siguiente manera: grupo 1: (n=29), correspondientes a citología normal; grupo 2: (n= 61), correspondientes a muestras LSIL; grupo 3: (n= 35), correspondientes a muestras HSIL. En todas las muestras se realizó biología molecular en busca de ADN de HHV-6, HHV-7 y HPV.

Los resultados fueron: grupo 1(todas HPV negativas): HHV-6: 6,8% (2/29), HHV-7: 79,3% (23/29); grupo 2: LSIL HPV negativas: HHV-6: 93,1%(27/29), HHV-7: 96,5%(28/29); LSIL HPV positivas: HHV-6 0%(0/32), HHV-7 90,6%(29/32); grupo 3: HSIL HPV

negativas: HHV-6: 20%(2/10), HHV-7: 70%(7/10); HSIL HPV positivas: HHV-6: 12%(3/25), HHV-7: 68%(17/25).

Conclusiones: (i) Tanto HHV-6 como HHV-7 infectan las células de la mucosa cervical con mayor prevalencia de HHV-7 (i) La mayor prevalencia de HHV-6 en muestras LSIL HPV negativas, con respecto a aquellas con citología normal, lo haría un posible factor de riesgo para la producción de atipia (i) La ubicuidad de HHV-7 en todas las muestras pone en duda su rol patogénico en la producción de atipia (i) No se observó asociación entre las infecciones de HHV-6, HHV-7 y HPV que avale el riesgo en la progresión de las lesiones a la malignidad (i) La presencia de HHV-6 y HHV-7 pondría, a la mucosa cervical, como probable vía de transmisión de estos virus.

Abstract

Both the Human Herpes Virus 6 (HHV-6) and the Human Herpes Virus 7 (HHV-7) have a high prevalence in the world population. They produce persistent infections in epithelial mucous cells and in salivary glands. When linked to different oncological processes, they can productively infect cells which have been immortalized by the Human Papilloma Virus (HPV), and circular lines of the cervical carcinoma; they can transactivate the viral genes expression/the expression of viral genes and the viral RNA that codify for the oncoproteins E6 and E7; and, furthermore, they can accelerate the growth of tumors in mice.

On the other hand, the genital infection caused by HPV can lead to squamous intraepithelial lesions of different degrees of malignancy even to cause cervical cancer. The lesions caused by this virus have been classified, histopathologically, according to the Bethesda criteria, as low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). However, the extended period between the entering of the virus and the malign transformation of the cells suggests that this process of carcinogenesis depends on the concomitance of other factors such as infections which have not been characterized yet. This research's hypothesis upheld that both the HHV-6 and the HHV-7 infect the epithelial cells of the cervical mucous and they act as co-factors in the malign transformation caused by HPV infection. The aim was to determine, in the healthy cervical mucous, the HHV-6 and HHV-7 infection, and in mucous with different degrees of atypia, the association between the infection caused by these viruses and HPV.

Cervical samples were examined and grouped as follows: group 1: (n=29) corresponding to normal cytology; group 2: (n=61) corresponding to LSIL samples; group 3: (n=35) corresponding to HSIL samples. Molecular biology was carried out in all samples in order to find/in search of HHV-6, HHV-7 and HPV ADN.

The results obtained were: group 1(HPV negative): HHV-6: 6,8% (2/29), HHV-7: 79,3% (23/29); group 2: LSIL HPV negative: HHV-6: 93,1% (27/29), HHV-7: 96,5% (28/29); LSIL HPV positive: HHV-6 0% (0/32), HHV-7 90,6% (29/32); group 3: HSIL HPV

negative: HHV-6: 20% (2/10), HHV-7: 70%(7/10); HSIL HPV positive: HHV-6: 12% (3/25), HHV-7: 68% (17/25).

Conclusions: (i) both HHV-6 and HHV-7 infect the cervical mucous cells with a greater prevalence of HHV-7 (i) The greater prevalence of HHV-6 in LSIL HPV negative samples in relation to the normal cytology would make it a possible risk factor for the production of atypia (i) the omnipresence of HHV-7 in all samples questions its pathological role in the production of atypia (i) It could not be determined the association in the prevalence of HHV-6 and HHV-7 and HPV that supports the risk in the development of the lesions into malignancy (i) the presence of HHV-6 and HHV-7 would place, the cervical mucous, as a possible transmission path for these viruses.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

¿Qué son los virus? ¿Tienen o han tenido un papel relevante en la evolución?
¿Pueden considerarse necesarios y benéficos en su relación con el hospedero o es que su presencia lleva siempre implícito un riesgo?

Estos interrogantes siguen vigentes, aún cuando los virus han acompañado al hombre desde la antigüedad, que junto a él han evolucionado y que las enfermedades producidas por ellos han podido ser descritas con total fidelidad desde la época de los faraones egipcios (1580-1300 a.c).

¿Qué es lo que sabemos de los virus?

Son estructuras biológicas metaestables, es decir, que en contacto con su receptor tienen la posibilidad de variar la cohesión de sus subunidades lo que les permite interactuar con la célula y penetrar en ella a través de los más variados y creativos mecanismos. De este modo, cuando encuentra una célula con receptores adecuados, experimenta cambios en su estructura molecular que le permiten utilizar los mecanismos de tráfico intracelular. Ahora, el llamado virus, si la célula es permisiva, tiene la posibilidad de continuar su replicación y utilizar las diferentes vías metabólicas celulares, las cuales pueden tanto posibilitar como restringir su capacidad reproductiva. Si el virus se multiplica y acumula en la célula, ésta cambia su fenotipo, se produce la lisis celular y la liberación de numerosos viriones que inician la búsqueda de un nuevo hospedero susceptible, el virus se transmite entre hospederos que aún no han tenido contacto con el microorganismo. Es la respuesta inmune la que limitará esta secuencia de pasajes de un hospedero a otro, pudiendo dejar al virión sin hospederos susceptibles. Este modelo de replicación, limitado en el tiempo, caracteriza una infección aguda viral, donde se produce una intensa replicación y una elevada producción de partículas virales con capacidad infectante.

Sin embargo, se pueden establecer entre el virus y el hospedero otras interacciones en las cuales, luego del ingreso de la partícula viral, acontecen situaciones diametralmente

opuestas, esto es, la disminución o desaparición de la síntesis de proteínas virales.

Esta situación muestra al agente como en “espera”. De hecho, en el reino animal, numerosos predadores esperan la presa, así como otros animales hibernan cuando las condiciones no son favorables. Es así que refiere Katze y col. (1), “no debiera sorprendernos que algunos microorganismos *esperan* en el hospedero momentos favorables para su reproducción”. Algunos virus, luego de la infección aguda, también esperan en el hospedero como una parte de su ciclo de multiplicación.

Esta espera es un mecanismo evolutivo utilizado por algunos linajes virales, en particular por los virus ADN, los cuales son virus que poseen un genoma viral grande, que replican en el núcleo de la célula eucariota y que han tenido por lo tanto, a lo largo de la evolución, la posibilidad de adquirir genes del hospedero y a partir de esto mimetizar, bloquear y regular procesos celulares. Son éstos, los que van a incidir directamente en la sobrevivencia del virus y en la posibilidad de aumentar su diseminación célula a célula. Las interacciones que así se generan con el hospedero se prolongan en el tiempo estableciendo una forma persistente de interacción.

Este comportamiento, que permite al genoma viral permanecer en el núcleo de la célula hospedera ya sea integrado al cromosoma o en forma episomal, es uno de los factores que ha permitido relacionar a las infecciones virales con los procesos malignos.

El criterio con más frecuencia usado para determinar causalidad en los procesos oncogénicos, es la demostración de una consistente asociación, tanto epidemiológica como molecular, con la oncogenicidad del agente, que se prueba, tanto en modelos animales como en cultivos celulares (2).

La primera evidencia de la etiología viral en el origen del cáncer fue en 1907, con el trabajo de Ciuffo y col. (3), quienes demostraron que filtrados libres de células y provenientes de verrugas humanas podían ser transmitidas a hospederos susceptibles.

En 1965, Epstein y colaboradores (4) identifican con microscopía electrónica de transmisión una partícula con características semejantes a un herpesvirus que estaba presente en una línea celular establecida a partir del un linfoma Burkitt. Posteriormente este virus, denominado Epstein Barr, fue asociado a carcinoma nasofaríngeo, linfomas pos trasplante y algunos linfomas Hodgkin, representando el primer virus reconocido como agente etiológico de procesos malignos.

En 1974, Zur Hausen, (5,6), propone al Virus Papiloma Humano (HPV) como agente etiológico del cáncer de cuello uterino involucrando, especialmente, a los genotipos 16 y 18 (7). Este virus causa la infección de transmisión sexual más prevalente en todo el mundo, afectando con mayor frecuencia a mujeres jóvenes. La infección primaria generalmente revierte espontáneamente, pero si esta infección se prolonga en el tiempo, la persistencia, especialmente si los genotipos involucrados son aquellos que han sido marcadamente asociados a lesiones malignas, lleva a la integración del genoma viral en el cromosoma de la célula hospedera y la posterior expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (8).

Como consecuencia de la infección por HPV, se desarrollan displasias en las células cervicales, las que se manifiestan por alteraciones en la forma, tamaño y organización del epitelio. Actualmente, estas lesiones han sido agrupadas en base al diagnóstico citohistológico, según el criterio Bethesda 2001 como: células Sin Alteración Neoplásica ni Efectos Citopáticos Compatibles con HPV (Normales), Células Escamosas Atípicas de Importancia Indeterminada (ASCUS), Lesiones Intraepiteliales escamosas de Bajo Grado (LSIL), Lesiones Intraepiteliales escamosas de Alto Grado (HSIL) y Carcinoma de Células Escamosas (SCC) (9).

Alrededor de 5 millones de mujeres en todo el mundo se infectan con HPV cada año, la mayoría de ellas, aproximadamente un 80%, pueden eliminar la infección, pero hay un porcentaje que eventualmente desarrollarán cáncer de cuello estando la mayoría de los casos relacionados con 15 genotipos virales que son los considerados con mayor capacidad transformante y de producción de lesiones HSIL (10-12). La mayoría de los genotipos relacionados con la producción de estas lesiones, que son las que tienen más posibilidades de evolucionar a un cáncer, están filogenéticamente relacionados, así con el HPV 16 se relacionan los genotipos 31, 33, 35, 52 y 58 mientras que con el HPV18 lo hacen los genotipos 39, 45, 59 y 68 (13).

Sin embargo, el amplio intervalo de tiempo que transcurre entre la entrada del virus y la transformación maligna de las lesiones que produce, así como la cantidad de mujeres infectadas con estos tipos de HPV oncogénicos, que pese a esto, no desarrollarán el cáncer cervical, ha dado en suponer a diferentes grupos de investigadores que la infección por HPV es necesaria pero no suficiente.

Se ha tratado de determinar, entonces, distintas circunstancias que pudieran actuar como co- factores o iniciadores de los procesos de transformación oncogénica considerando características propias del hospedero, factores ambientales así como la co infección con otros agentes infecciosos (14).

En este contexto, siempre se consideró al Virus Herpes simplex tipo 2 con capacidad para actuar como iniciador o co-factor en el desarrollo del cáncer de cuello (15, 16) mientras que, los otros herpesvirus, con quienes mantiene altos niveles de homología genética, no han sido todavía suficientemente estudiados en este sentido (17).

Los virus agrupados en la familia *Herpesviridae*, que remontan su origen a 400 millones de años atrás (18) a diferencia de otras especies virales que han evolucionado rápidamente diseminando nuevos genotipos en las poblaciones susceptibles, se han mantenido relativamente estables en sus hospederos naturales (19). Históricamente la familia *Herpesviridae*, ha sido definida basándose en la arquitectura del virión, en el gráfico 1 se encuentra representada la estructura y componentes de la partícula viral. Está constituida por (i) core, que contiene un ADN lineal de doble cadena que rápidamente se circulariza dentro del núcleo cuando es liberado (20, 21,22), (ii) cápside, icosaédrica de 125 nm de diámetro que contiene 161 capsómeros (22), (iii) tegumento, material amorfo, de espesor variable, de estructura proteica, que se ubica entre la nucleocápside y la envoltura y que contiene más de 20 proteínas codificadas por el virus (23) y (iv) envoltura, una estructura trilaminar, que deriva de restos de la membrana celular de la célula hospedadora y que obtiene a medida que se produce el ensamblaje y liberación de los virus. Posteriormente el virus la modifica al insertar sus glicoproteínas (24).

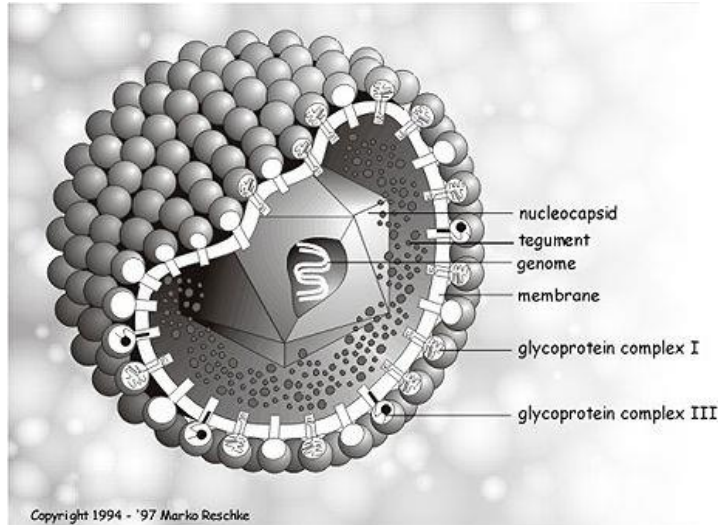


Gráfico 1. Representación esquemática de la estructura de una partícula viral de herpesvirus.

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tan es así, que la mayoría de las especies animales son portadores de al menos uno, habiéndose identificado hasta el momento 200 tipos diferentes. Dentro de la familia *Herpesviridae* 9 han sido reconocidos como patógenos humanos: *Herpes simplex 1* (HSV-1), *Herpes simplex 2* (HSV-2), *virus Varicela-zoster* (VZV), *virus de Epstein-Barr* (EBV), *Citomegalovirus humano* (HCMV), *Herpesvirus humano-6A, 6B y 7* (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) y *Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi* (HHV-8).

De la misma manera que comparten la estructura que los caracteriza y agrupa, comparten propiedades biológicas tales como: (i) poseer una gran cantidad de enzimas involucradas en el metabolismo y síntesis del ADN viral, así como en el procesamiento de las proteínas, (ii) la transcripción de los genes, la síntesis del ácido nucleico, así como el ensamblaje de la cápside ocurre en el núcleo, mientras que una parte del tegumento y de la envoltura la adquieren en el citoplasma, (iii) la producción de la progenie viral se acompaña, generalmente, con la destrucción de la célula infectada y finalmente (iv) establecen un estado de latencia como mecanismo para persistir durante toda la vida del hospedero.

Originalmente fueron clasificados en una única familia pero actualmente y con la posibilidad que tenemos de conocer las secuencias nucleotídicas, ha permitido establecer un nuevo orden: los *Herpesvirales* (25, 26), que incorpora tres familias virales: *Herpesviridae* (que infectan mamíferos, aves y reptiles), *Alloherpesviridae* (que infectan peces y anfibios) y *Malacoviridae* (cuyos hospedero son los bivalvos).

- *Herpesvirales*
 - *Herpesviridae*
 - *Alloherpesviridae*
 - *Malacoviridae*

La familia *Herpesviridae*, a su vez, se divide en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*.

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* tiene un rango de hospederos variable, su ciclo de replicación es relativamente corto, se diseminan rápidamente en el cultivo, generan una efectiva destrucción de la célula hospedadora y establecen infecciones latentes principalmente, aunque no en forma exclusiva, en ganglios sensitivos.

La subfamilia *Betaherpesvirinae* tienen un rango restringido de hospederos, el ciclo reproductivo es largo, la infección progresa lentamente en los cultivos y las células infectadas frecuentemente sufren agrandamiento. Establecen infecciones latentes en glándulas salivales, riñón y linfocitos.

Finalmente la subfamilia *Gammaherpesvirinae* que “in vitro” replican en células linfoblastoides y algunos causan infecciones líticas en células epiteloides o fibroblásticas, suelen tener como blanco el tejido linfoide, en particular los linfocitos T o B (27). A continuación se muestran los géneros que tiene incidencia en la patología humana.

Herpesviridae

Alphaherpesvirinae

- *Simplexvirus 1 (HSV-1)*
- *Simplexvirus 2 (HSV-2)*
- *Varicellovirus (VZV)*

Bethaherpesvirinae

- *Citomegalovirus (HCMV)*
- *Roseolovirus*

Herpesvirus humano -6 (HHV-6)

Herpesvirus humano-7 (HHV-7)

Gammaherpesvirinae

- *Lymphocryptovirus*

Epstein-Barr virus
(EBV)

- *Rhadinovirus*

Herpesvirus
asociado al Sarcoma de
Kaposi (KSVH)

Todos los miembros de esta familia establecen con su hospedero susceptible un modelo de infección persistente, de tal manera que el virus permanece en el interior de la célula en un estado de inactividad aparente, donde sólo va a expresar una pequeña cantidad

de genes virales que codifican para algunas proteínas que son las que permiten la permanencia, esta situación se denomina infección no productiva.

A este estado de inactividad puede luego seguir un estado de reactivación, en el que se generan nuevas partículas virales completas e infectantes, denominado infección productiva.

Esta reactivación, que caracteriza el modelo latente, puede o no terminar en enfermedad ya que se combinan el daño celular y tisular producido directamente por la destrucción causada por el virus y la respuesta inmune del hospedero desencadenada por la replicación lítica (28).

Dentro de la subfamilia *Bethaherpesvirinae*, para este trabajo se destaca el género Roseolovirus, conformado por Virus herpes humano- 6 (HHV-6) y Virus herpes humano -7 (HHV-7).

El HHV-6, fue aislado por primera vez en 1986 a partir de cultivos de células mononucleares de sangre periférica de seis pacientes que padecían diferentes desórdenes linfoproliferativos, los que incluían linfoma de células B, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, linfoma y leucemia linfocítica aguda. Estos cultivos manifestaban un efecto citopático caracterizado por agrandamiento celular y/o células binucleadas con la presencia de inclusiones intranucleares y/o intracitoplasmáticas. Mediante microscopía electrónica se caracterizó la presencia de partículas virales cuyo nombre inicial fue Virus Linfotrópico B Humano (HBLV) incluyéndolo, en la por entonces, familia *Herpesviridae* por sus características morfológicas (29, 30).

Resultados obtenidos posteriormente por diferentes laboratorios, indicaron que este nuevo virus descrito se multiplicaba en linfocitos T CD4⁺ (31, 32).

Como resultado de estas observaciones se propuso el cambio de designación a *Virus herpes humano 6* (HHV-6), un nombre independiente del tropismo celular y en acuerdo con las disposiciones del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) (33, 34).

Luego, a partir de diferentes estudios se reconocieron dos variantes, A (HHV-6A) y B (HHV-6B), basándose en las diferencias que involucran propiedades del crecimiento “in vitro”, en la longitud de los fragmentos de restricción que se obtuvieron de los estudios de polimorfismo, en la respuesta dada a anticuerpos monoclonales y en el tropismo celular (35).

En febrero de 2012, el ICTV, dispuso la creación de las especies *Herpesvirus humano 6A* y *Herpesvirus humano 6B* en el género *Roseolovirus* removiendo la designación de *Herpesvirus humano 6* del género y designando al HHV-6A como especie tipo del género (36-39).

El HHV-7, fue aislado por primera vez en 1990 a partir de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica de individuos sanos, en el curso de una investigación para Virus de la inmunodeficiencia humana. Se observó que estos linfocitos, no infectados, manifestaban espontáneamente efecto citopático. Mediante el uso de enzimas de restricción y pruebas de hibridación se determinó que era diferente de HHV-6 y de otros herpesvirus. Siguiendo la taxonomía de la familia se le adjudicó el nombre de *Herpesvirus humano 7* (40).

Las especies HHV-6A, HHV-6B y HHV-7, están íntimamente relacionados desde lo epidemiológico y molecular, ya que tienen alta prevalencia en la población sana (más del 90%), establecen un modelo de infección persistente manifestando latencia en macrófagos y linfocitos T, son frecuentemente eliminados a través de la saliva de los individuos infectados (41), la primoinfección se produce en la primera infancia (antes de los 2 años) y su potencial patogénico puede variar entre frecuentes infecciones asintomáticas y raras situaciones de enfermedad severa (42, 43).

El tropismo celular de HHV-6 son las células linfoideas, las células endoteliales, el hígado, células epiteliales, el sistema nervioso central y las glándulas salivales. El tropismo celular de HHV-7 “*in vivo*” son los linfocitos T CD4⁺ y las células epiteliales de las glándulas salivales (44-46).

La historia natural de la infección por HHV-6 y HHV-7 comienza con una infección primaria, que ocurre en la primera infancia, se caracteriza por ser productiva, un modelo agudo de replicación viral. En ésta, el virus que ha ingresado a través de la saliva en el momento del contacto, comienza a replicar en el tracto respiratorio superior y las células linfocitarias presentes en las amígdalas y en el epitelio olfatorio de la cavidad nasal.

Desde este sitio se produce una fase virémica que lo disemina a numerosos órganos como el sistema nervioso central, riñones, pulmones, nódulos linfáticos, médula ósea y los diferentes clones celulares del sistema inmune: linfocitos T, monocitos y células citotóxicas naturales (NK) (42).

La primoinfección puede ser asintomática, sin embargo, una proporción

importante de infectados, que puede rondar entre el 40 al 48%, desarrolla un cuadro exantemático conocido como Exantema súbito o Roseola infantil (47, 48), caracterizado por un período de incubación de 10 días seguido por un síndrome febril (39-40°C) que persiste 3-7 días luego de lo cual aparece un exantema eritemato-macular (similar a Rubeola) o papular (similar a Sarampión) que involucre en 48hs.

Puede también presentarse en forma menos característica con fiebre y convulsiones o trastornos gastrointestinales inespecíficos como diarrea y vómitos. La asociación con cuadros graves como meningoencefalitis, encefalitis o síndromes hematológicos es muy poco frecuente como manifestación de primoinfección (49-51). También están implicados en el síndrome mononucleósico, así como en complicaciones neurológicas y encefalitis tanto en inmunocompetentes como en inmunocomprometidos, ya que el sistema nervioso central es uno de los sitios blanco de estos virus (48,52, 53).

Luego de la primoinfección comienza la persistencia del virus, que le permite mantenerse en forma indefinida dentro de las células de su hospedero y a partir de ellas, en algún momento, poder reactivarse.

El HHV-6 permanece en estado episomal y es el gen U94 quien juega un importante rol en el establecimiento y mantenimiento de la latencia (54, 55). La reactivación ocurre a través de la transcripción de genes IE (immediate-early gene) en las regiones EI1 y EI2 seguidos de los efectos de la transactivación de las células y/o de los factores virales cuya naturaleza todavía son desconocidas. Este proceso de reactivación resulta en la inducción del ciclo de replicación y la posible aparición de efecto citopático significando una alteración no solo en la estructura de la célula sino también en sus funciones (56).

Aunque la oncogenicidad de estos virus no está firmemente establecida, sí se les reconoce que poseen atributos mediante los cuales pueden promover el proceso de carcinogénesis (57).

La proteína a partir de ORF-1 de HHV-6 se une e inactiva p53, esto altera la acción que el p53 tiene sobre la regulación de genes celulares importantes en el control del crecimiento celular (58), mientras el gen U95 se une y desregula miembros del complejo proteico NF-K beta (factor nuclear kappa beta) el cual tiene una amplia gama de funciones que pueden ser relevantes en el desarrollo de cáncer, incluyendo la regulación de las secuencias inflamatorias y apoptóticas celulares (59).

De igual manera se le reconoce su capacidad inmunomodulatoria a través del control en la producción de citoquinas especialmente aquellas proinflamatorias como IL-6, IL-8 (60).

El hecho comprobado que el HHV-6 tenga la capacidad de integrarse en la región subtelomérica del cromosoma del hospedero permite también hipotetizar que esta integración contribuye con la elongación telomérica del cromosoma lo que puede permitir que la célula evite el mecanismo de apoptosis. Ésta interrupción subtelomérica que causa puede significar cierta inestabilidad cromosómica que indirectamente puede llevar a desencadenar un proceso de carcinogénesis (57).

Diferentes trabajos realizados “*in vitro*” han podido demostrar la capacidad de HHV-6 de aumentar la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales se sabe tienen un papel preponderante en el desarrollo del cáncer de cuello uterino (61, 62). De todas formas hasta el momento no se han publicado resultados que logren co-relacionar lesiones uterinas con la presencia de HHV-6 en ellas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes queda planteado el propósito de este trabajo que estudió la presencia de ADN viral de HHV-6 y HHV-7 en extractos de ADN obtenidos a partir de muestras citológicas normales y con alteraciones de la mucosa de cuello uterino.

La hipótesis que se plantea es que tanto HHV-6 como HHV-7 infectan las células epiteliales y de este modo actúan como co-factores en la transformación maligna de las células infectadas por HPV.

Esta asociación identifica a un grupo de pacientes con un riesgo adicional.

1.2 OBJETIVOS

Objetivos Generales

Realizar un aporte al conocimiento sobre la presencia de virus HHV-6 y HHV-7 en mucosa cervical de mujeres sin lesiones escamosas.

Determinar la asociación de los virus HHV-6 y HHV-7 con lesiones cervicales escamosas.

Objetivos específicos

Estudiar la presencia de HHV-6 y HHV-7 en mucosa cervical de mujeres con citología normal y con lesiones cervicales de bajo y de alto grado que han sido diagnosticadas como HPV positivas (+) y negativas (-).

Relacionar la presencia de HHV-6 y HHV-7 con los tipos oncogénicos de HPV identificados en las distintas lesiones tanto de alto como bajo grado.

Determinar la prevalencia de HHV-6 y HHV-7 en mucosa cervical, teniendo en cuenta la edad de las mujeres estudiadas.

Capítulo 2

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

La población estudiada estuvo constituida por 125 mujeres, no embarazadas, inmunocompetentes, con un rango de edad entre 18 y 50 años y una media de edad de 38 años.

Al inicio del estudio, las participantes respondieron un cuestionario cerrado, con el objetivo de recabar datos personales (nombre, edad), así como la frecuencia de los controles ginecológicos y los resultados de los mismos. Firmaron el consentimiento informado; que fue aprobado por el CIEIS Oulton- Romagosa, se sometieron a un examen pélvico para la recolección de células cervicales las que se utilizaron en las pruebas citológicas y un hisopado endocervical que fue obtenido para la detección de HPV, de HHV-6 y de HHV-7.

2.1 RECOLECCIÓN DE CÉLULAS DE LA MUCOSA CERVICAL

Las muestras fueron colectadas con hisopo y/o cepillo y colocadas en un tubo Eppendorf, el cual contenía 500 µl de solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

Se utilizó un vortex para desprender las células que fueron obtenidas en los hisopos y/o cepillos. Una vez retirados los mismos, se centrifugó durante 5 minutos a 1.500 rpm, se tomó 200 µl y se descartó el sobrenadante restante. Posteriormente se colocaron los 200 µl en el mismo tubo que contenía el “pellet”.

Según el resultado del estudio citológico, aplicando los criterios Bethesda 2001 (11), las muestras fueron agrupadas en distintas categorías:

Grupo 1: n=29, citología con resultado normal (PAP N), colposcopia normal.

Grupo 2: n=61, citología correspondiente a lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado de malignidad (LSIL).

Grupo 3: n=35, citología correspondiente a lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado de malignidad (HSIL).

2.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN de HPV

Se realizó la extracción utilizando el equipo comercial AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit de Axygen, con las condiciones que el fabricante describe en su protocolo:

- 1- Se tomaron 200 µl de la muestra a la que se colocó 200µl de buffer de lisis (VL) y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente.
- 2- Luego se colocó 75µl de buffer para precipitación de proteínas (VN), se homogeneizó utilizando vortex y se centrifugó 5 minutos a 11.000 rpm.
- 3- El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo al que se le agregó 250 µl de isopropanol + ácido acético 1%.
- 4- Esto fue pasado a un tubo conteniendo una columna y se centrifugó 1 minuto a 8.000 rpm.
- 5- Se descartó el filtrado y se volvió a poner la columna en el mismo tubo, al que se le agregó 500 µl de buffer de lavado 1 (W1A) dejando un minuto a temperatura ambiente, luego se centrifugó 1 minuto a 11.000 rpm.
- 6- El filtrado fue descartado y se agregó a la columna 800 µl de buffer de lavado 2 (W2), se centrifugó 1 minuto a 11.000 rpm.
- 7- Se descartó este filtrado y se colocó la columna nuevamente en el mismo tubo, luego se centrifugó 1 minuto a 11.000 rpm para remover los residuos de los buffer.
- 8- Se pasó la columna a un tubo eppendorf limpio y se agregó 100 µl de buffer de elución libre de nucleasas (TE). Luego se centrifugó 1 minuto a 11.000 rpm.
- 9- Los extractos se conservaron a -20°C hasta ser estudiados por los métodos de biología molecular.

2.3 METODO DE EXTRACCIÓN ADN de HHV-6 Y HHV-7

A todas las muestras incluidas en este estudio se les realizo la extracción de ADN viral utilizando el equipo comercial AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit de Bioneer, según especificaciones del fabricante descriptas en el protocolo.

1. Colocar en tubo eppendorf de 1.5 ml 20 µl de Proteinasa K, y agregar 200 µl de muestra más 200 µl de binding buffer. Vortear.
2. Incubar a 60°C por 10 minutos en baño húmedo.
3. Agregar 100µl de isopropanol que debe mezclarse por pipeteo.
4. Transferir el lisado a una columna provista por el kit.
5. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
6. Transferir la columna a un nuevo tubo de 2 ml provisto por el kit.
7. Agregar 500 µl de buffer de lavado 1 (W1) y se centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto.
8. Se tira el filtrado y se agregan 500 µl de buffer de lavado 2 (W2) y se centrifuga nuevamente a 8000 rpm por 1 minuto.
9. Se centrifuga la columna a 12000 rpm por 1 minuto más.
10. Se transfiere la columna a un tubo eppendorf de 1,5 ml al que se agrega 200 µl de buffer de elusión (EL).
11. Se incuba por 1 minuto a temperatura ambiente
12. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
13. El producto se conserva en freezer -20° hasta ser estudiados por los métodos de biología molecular.

2.4 MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADN DE HPV EN LAS MUESTRAS DE HISOPADO ENDOCERVICAL

El ADN de HPV fue amplificado por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), amplificando un segmento de aproximadamente 450 pb, correspondiente a la región L1 del genoma viral altamente conservada, utilizando los llamados cebadores degenerados: MY09 (5'CGTCCMARRGGAWACTGATC-3) y

MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3) (Manos y col, 1992), (Integrated DNA Technology – USA). Se determinó el genotipo viral por análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) (63).

La mezcla madre se compuso de un buffer 5X GoTaq (Promega) con una concentración final de 1X; 2,5 mM de Mg Cl₂; 240µM de cada mezcla de dNTPs; 1µM de cada cebados y 0,04U/µl de Taq polimerasa (Promega), obteniéndose un volumen final de 50µl.

La amplificación se inició con una incubación de 3 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, se finalizará con una incubación de 5 minutos a 72°C.

Después del ciclado la reacción fue corrida electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X y se observó la aparición de bandas del tamaño del fragmento amplificado al exponerlo a luz UV en el transiluminador.

2.4.1 DETECCIÓN DEL GENOTIPO DE VPH POR EL ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Se adicionó a 12,5µl del producto de la PCR, 12µl de buffer y 2 µl de cada una de las siguientes enzimas: BamHI, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI, DdeI y Sau3AI/MboI. Para realizar la digestión enzimática, se incubó de 2 a 4 horas a 37°C. Los productos fueron corridos, de 1 a 2 horas, en un gel de agarosa al 3% en un buffer TBE 1X. Se sembró un control sin digerir del producto de 450pb (63).

2.5 MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADN VIRAL DE HHV-6 Y HHV-7 EN EXTRACTOS DE ADN OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS DE HISOPADO ENDOCERVICAL

A continuación se determinó la presencia del ADN viral de HHV-6 y HHV-7 por Nested PCR (PCR anidada) a partir de los productos de ADN obtenidos de las muestras.

Se utilizaron cebadores específicos para HHV-6 y HHV-7 que detectaron (i) el gen de la proteína mayor de la cápside de HHV-6 (64), (ii) U10, gen α de HHV-7 (65).

Para la amplificación del ADN genómico de HHV-6, en una primera reacción de PCR se usaron los siguientes cebadores:

EX1 5'-GCGTTTTTCAGTGTGTAGTTCGGCAG-3'

EX2 5'-TGGCCGCATTCGTACAGATACACGGAGG-3'

Para la amplificación de ADN genómico de HHV-7, en una primera reacción de PCR se usaron los siguientes cebadores:

HV7 5'-TATCCCAGCTGTTTTTCATATATAGTAAC-3'

HV8 5'-GCCTTGCGGTAGCACTAGATTTTTTG-3'

Para cada reacción se realizó una mezcla cuyo volumen final fue de 50 μ l y que contenía un buffer de PCR 10X; 400 mM dNTP; 0,2 mM de primers o cebadores; 0,6 μ l de MgCl₂ (50mM) y 1U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y 2 μ l de ADN obtenido de cada muestra.

Para HHV-6 la amplificación se hizo en un total de 40 ciclos, incluida la desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 50°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 1 minuto.

Para HHV-7 la amplificación consto de 40 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación 55°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 1 minuto. La cantidad de ciclos así como las temperaturas y tiempos fueron modificados del protocolo original.

Para la segunda amplificación se utilizó para HHV-6 los cebadores:

IN3 5'-GCTAGAACGTATTTGCTGCAGAACG-3'

IN4 5'-ATCCGAAACAACACTGTCTGACTGGCA-3'.

Para HHV-7 los cebadores usados fueron:

HV7N1 5'-ACCAATTCAGTTTTTCATCCAG-3'

HV8N2 5'-TTGAAGAGGAGAATTCTGTAC-3'.

Para cada reacción se realizó una mezcla cuyo volumen final fue de 50µl y que contenía un buffer de PCR 10X; 200mM dNTP; 0,2 mM de primers o cebadores; 0,6µl de MgCl₂ (50mM) y 1U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 1µl del producto.

Para HHV-6 la amplificación se hizo en un total de 40 ciclos que incluyeron la desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 50°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 2 minutos.

Para HHV-7 la amplificación constó de 40 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 1 minuto. La cantidad de ciclos así como las temperaturas y tiempos fueron modificados del protocolo original.

En cada reacción se procesaron en paralelo como controles positivos, ADN genómico obtenido de sobrenadante de cultivo celular Molt-3 para HHV-6B Z29 y Supt1 para HHV-7 SB, como controles negativos, agua tridestilada y un marcador de peso molecular de Invitrogen, que permitió reconocer las bandas esperadas. Después del ciclado la reacción fue corrida electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y los productos específicos fueron visualizados en un transiluminador de luz UV.

Para HHV-6 las bandas esperadas son de 521 pares de bases y 267 pares de bases para la primera y segunda reacción respectivamente.

Para HHV-7 las bandas esperadas son de 186 pares de bases y 110 pares de bases para la primera y segunda reacción respectivamente.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Es un muestreo no probabilístico. Las variables categorizadas fueron analizadas usando tablas de contingencia. Se analizó la relación entre las variables utilizando Chi cuadrado, coeficiente de contingencia, Phi y U de Cramer, así como Odds ratio.

Fue realizado utilizando el programa estadístico SPSS Statistics Base 17.0

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1 Detección de ADN viral de HHV-6 y HHV-7 en extractos de ADN obtenidos a partir de citologías clasificadas como Citología normal y con lesión (LSIL y HSIL)

En la tabla 1 se observa la detección de ADN de HHV-6 en los extractos de ADN obtenidos a partir de las muestras de cepillado cervical con distintos resultados histológicos (con citología normal y con lesión).

En la tabla 2 se observa la detección de ADN de HHV-7 en los extractos de ADN obtenidos a partir de las muestras de cepillado cervical con distintos resultados histológicos (con citología normal y con lesión).

Grupo A: corresponde a muestras con citología normal, células que no presentan atipia.

Grupo B: corresponde a muestras que tienen células con distinto tipo de atipia, identificadas como muestras LSIL y muestras HSIL, las que serán nombradas, arbitrariamente, como citología con lesión. Los resultados se expresan en porcentajes y valores absolutos.

Tabla 1. Detección de ADN de HHV-6 a partir de muestras de cepillado cervical con citología normal y con lesión

Citología	N	HHV-6	Negativos
<i>Grupo A</i>	29	2 6,9%	27 93,1%
Grupo B	96	32 33,3%	64 66,7%

En el grupo A se detectó ADN de HHV-6 en 2 de 29 muestras procesadas, lo que corresponde al 6,9% de las muestras, mientras que en el grupo B, se detectó ADN viral en 32 de las 96 muestras, es decir, en el 33,3% de las muestras.

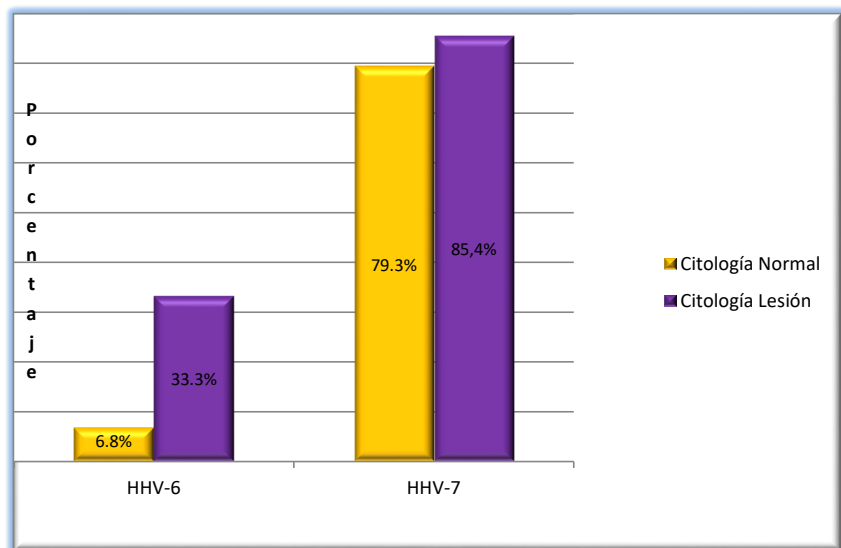
Tabla 2. Detección de ADN de HHV-7 a partir de muestras de cepillado cervical con citología normal y con lesión

Citología	N	HHV-7	Negativos
Grupo A	29	23 79,3%	6 20,7%
Grupo B	96	81 84,4%	15 15,6%

En contraste, en el grupo A se detectó el ADN de HHV-7 en 23 de 29 muestras, lo que corresponde al 79,3% de las muestras y en el grupo B en 81 muestras de las 96 correspondiendo al 84,4% de las mismas.

Estos resultados se expresan en el gráfico 2.

Gráfico 2. Detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 en muestras con citología normal y con lesión



Se detectó mayor prevalencia de ADN de HHV-7 tanto en las muestras con citología normal (grupo A) como en aquellas que presentaban algún tipo de atipia (grupo B) sobre la presencia del ADN de HHV-6.

3.2 Determinación de riesgo

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en relación a la detección de ADN de HHV-6 en los grupos estudiados, con mayor prevalencia en las muestras que mostraban atipia sobre las normales, se realizó el cálculo de la probabilidad de asociación entre la presencia de HHV-6 y la detección de lesiones en la mucosa cervical. El valor obtenido del ODDS ratio fue de 6.75 que se interpreta como una asociación positiva, es decir, que la presencia del virus se asocia a un mayor riesgo en la ocurrencia del evento.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para HHV6 (positivo / negativo)	6.750	1.510	30.182
Para la cohorte Citología = Lesión	1.338	1.143	1.567
Para la cohorte Citología = Normal	.198	.050	.789
N de casos válidos	125		

SPSS Statistics Base 17.0

El valor de ODDS ratio para el HHV-7 dio un valor menor a 1, lo que se interpreta como una asociación negativa, es decir, la presencia del virus no se asocia con una mayor ocurrencia del evento.

3.3 Detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 en muestras LSIL y HSIL

Las muestras que presentaron atipia fueron caracterizadas, según el criterio de Bethesda, en lesiones intraepiteliales escamosas con bajo grado de malignidad (LSIL) y lesiones intraepiteliales escamosas con alto grado de malignidad (HSIL).

En las tablas 3 y 4, se observa la detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 en estos grupos.

Tabla 3. Determinación ADN de HHV-6 en muestras LSIL y HSIL

Citología	N	HHV-6	Negativos
LSIL	61	27 44,3%	34 55,7%
HSIL	35	5 14,3%	30 85,7%

LSIL: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado
HSIL: lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado

Tabla 4. Determinación ADN de HHV-7 en muestras LSIL y HSIL

Citología	N	HHV-7	Negativos
LSIL	61	57 93,4%	4 6,6%
HSIL	35	24 68,5%	11 31,%

Se detectó una mayor prevalencia del ADN de HHV-7 tanto en las muestras con atipia celular de bajo grado como en las de alto grado con respecto a HHV6.

El ADN de HHV-6, si bien se detecta en ambos grupos, hay mayor prevalencia en las muestras que presentan atipia celular de bajo grado con respecto a las de alto grado.

3.4 Detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 en muestras LSIL y HSIL, HPV positivas y negativas

A todas las muestras que se clasificaron como LSIL y HSIL según el criterio de Bethesda, se les realizó una Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN de Virus Papiloma humano (HPV).

En las tablas 5 y 6 se muestran la detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 en las muestras LSIL y HSIL, HPV negativas y positivas a fin de determinar co-infección entre los diferentes virus.

Tabla 5. Detección de ADN de HHV-6 en muestras con atipia celular HPV positivas y negativas

Citología	N	HHV-6	Negativos
LSIL HPV(-)	29	27 ^a 93,1%	2 6,9%
LSIL HPV(+)	32	0 ^b 0%	32 100%
HSIL HPV(-)	10	2 20%	8 80%
HSIL HPV (+)	25	3 12%	22 88%

En las muestras LSIL HPV negativas se detectó ADN de HHV-6 en 27 de las 29 muestras estudiadas (93,1%), mientras que no se detecta ADN viral en aquellas HPV positivo.

Se establece diferencia estadísticamente significativa en el grupo LSIL entre aquellas HPV negativo y HPV positivo ($a > b = p < 0,001$ χ^2 de Pearson).

En el grupo HSIL se detectó ADN de HHV-6 tanto en las muestras HPV negativas como positivas, (20% y 12% respectivamente).). El gráfico 3 permite visualizar con claridad las diferencias estadísticas encontradas y que se expresan previamente en la tabla 5.

Gráfico3. Detección de ADN de HHV-6 en muestras LSIL y HSIL HPV negativas y positivas

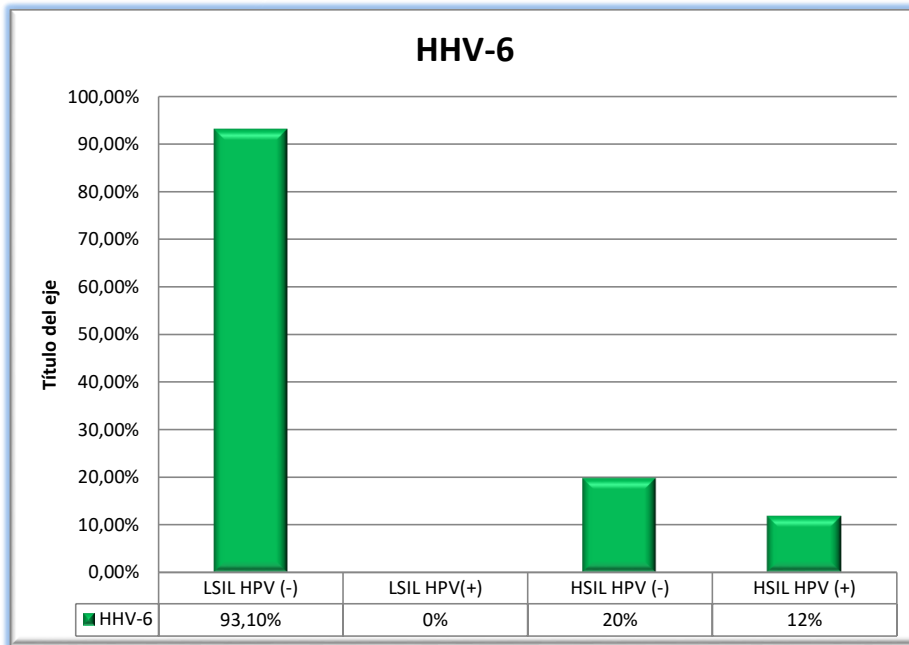


Tabla6. Detección de ADN de HHV-7 en muestras con atipia celular HPV positivas y negativas

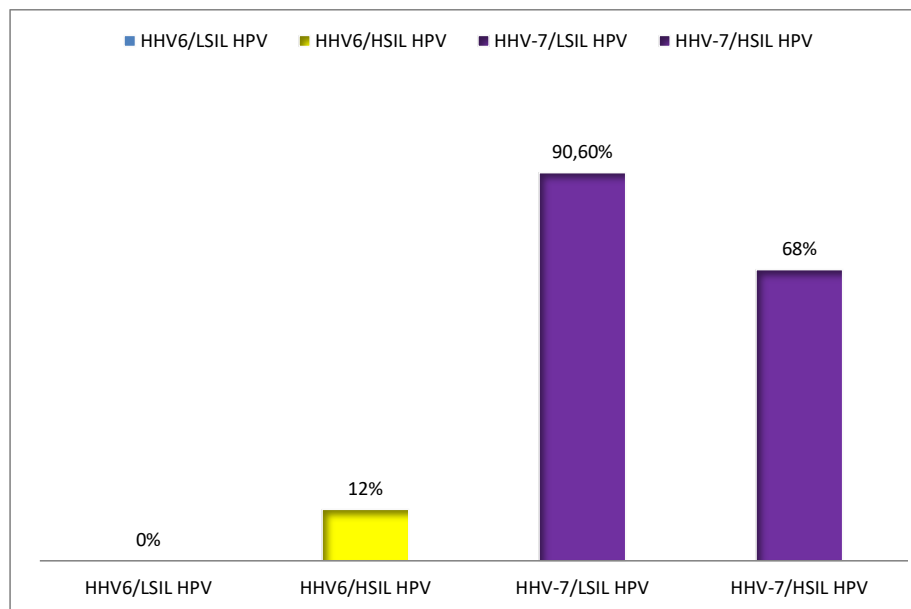
Citología	N	HHV-7	Negativos
LSIL HPV(-)	29	28	1
		96,5%	3,4%
LSIL HPV(+)	32	29	3
		90,6%	9,4%
HSIL HPV(-)	10	7	3
		70%	30%
HSIL HPV(+)	25	17	8
		68%	32%

Con respecto a HHV-7, se detectó ADN viral tanto en las muestras LSIL como HSIL tanto HPV positivas como negativas. No se establece una diferencia estadística en estos resultados.

3.5 Coinfección HHV-6/HPV y HHV-7/HPV

Del total de muestras analizadas (125), 68 fueron HPV negativas (54,4%) y 57 HPV positivas (45,6%). De estas positivas, HHV-6 co-infecta en el 5,2% de las muestras mientras que HHV-7 lo hace en el 80,7% de las mismas sin que haya diferencia en el tipo de atipia que presentan las células (LSIL o HSIL). HHV-6, en cambio, co-infecta en aquellas donde hay mayor atipia celular (HSIL). Los resultados obtenidos se muestran a continuación en el gráfico 4.

Gráfico 4. Co- infección HHV-6/ HPV y HHV-7/HPV



3.6 Determinación de relación de HHV-6 y HHV-7 con genotipos oncogénicos de HPV

Se buscó determinar la existencia de relación entre HHV6 y HHV-7 con los genotipos oncogénicos y no oncogénicos de HPV considerando, genotipos oncogénicos, los números 16,18,31,33,35,45,52,58,59 y no oncogénicos los otros tipos identificados.

Del total de muestras que resultaron HPV positivas, se hizo la genotipificación en 49 de las 57 muestras. HHV-6 co-infectó con HPV en 3 muestras (5,2%) y en 2 de ellas lo hizo con genotipos oncogénicos (16 y 18).

HHV-7 co-infectó con HPV en 46 muestras (80,7%) y en 26 de ellas con genotipos oncogénicos (45,6%).

Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Co-infección HHV-6 y HHV-7 con genotipos oncogénicos de HPV

	Co- infecciones totales	Con serotipos oncogénicos	Con serotipos No oncogénicos
HHV-6	3 (5,2%)	2 (3,5%) ^a	1 (1,7%)
HHV-7	46 (80,7%)	26 (45,6%) ^b	20 (35,08%)

No se estableció una diferencia estadística significativa que determinara relación entre las variables detección de ADN viral (HHV-6 y HHV-7) y el genotipo de HPV. (^a p 0,2; ^b p 0,09).

3.7 Prevalencia de HHV-6 y HHV-7 en la mucosa en relación a la edad

Para determinar la relación entre la presencia de ADN de HHV-6 y HHV-7 y la edad de las mujeres en quienes se habían hecho la recolección de muestras, se conformaron 5 grupos con un rango de edad de 5 años; a saber, de 19-24 años, de 25-30 años, de 31-36 años, de 37 a 42 años y el último grupo de 43-49 años. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Relación entre detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 y la edad de las mujeres

Rango de edad	N	HHV-6 ^a	HHV-7 ^b
19-24 años	25	6	21
25-30 años	34	10	27
31-36 años	30	10	25
37-42 años	17	6	15
43-49 años	19	2	17

Al analizar estos datos se determinó que no hubo asociación estadísticamente significativa entre las variables, ADN viral (HHV-6 y HHV-7) y la edad de las mujeres contempladas en este estudio. (^a $p > 0,7$; ^b $p > 0,7$).

Capítulo 4

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

Las mucosas son una importante puerta de entrada, no sólo para las sustancias indispensables para la vida y salud del hospedero como lo son los alimentos, el agua, el aire, sino de numerosos patógenos incluyendo a los virus. Para protegerse el hospedador ha desarrollado a lo largo de la evolución, diferentes mecanismos inmunes contra la colonización e infección de agentes infecciosos. Cuando un virus entra en contacto con la superficie de una mucosa, la interacción que se establece entre la acción invasiva del virus y las estrategias defensivas del hospedero determinan el inicio de un proceso infeccioso y la severidad del mismo así como el modelo patogénico que caracteriza a las diferentes infecciones virales como agudas o persistentes.

Sin embargo, desde hace unos años y fruto de las posibilidades que ha dado el uso de las técnicas de biología molecular, es otro el panorama que se plantea con respecto a las infecciones virales en las mucosas donde los virus están frecuentemente presentes aún en situaciones donde no se puede establecer, claramente, que el individuo esté enfermo. En este contexto de infecciones virales, con frecuencia menos virulentas, y de las variaciones en la respuesta inmune del hospedero, nos obliga determinar el real impacto fisiológico de la infección viral.

De esta manera el modelo antes sostenido de “un patógeno-una enfermedad” se contrapone actualmente con el modelo de viroma humano, al que se puede definir como el conjunto de todos los virus que son encontrados en el hombre incluyendo aquellos virus que causan infecciones agudas o persistentes, así como aquellos que se encuentran integrados en el genoma como los retrovirus endógenos (66). El viroma se transforma en un importante componente del medio ambiente que puede interactuar con los rasgos genéticos del hospedero para contribuir con la patogénesis de enfermedades complejas.

Es en este contexto que se analizan los virus que son de interés en este trabajo, ya que tanto el HHV-6, el HHV-7 como el HPV, se comportan como virus persistentes con capacidad de integrarse al cromosoma de la célula hospedera. Esta situación ha sido reconocida particularmente para HHV-6 en trabajos como el de Arbuckle JH y col. 2010, Kaufer B y col. 2014 (67,68). Esto le permite producir un modelo latente con reactivaciones que no

necesariamente se manifiestan clínicamente pudiendo pasar, estas reactivaciones, inadvertidas para el hospedero.

Uno de los objetivos de este trabajo fue realizar un aporte al conocimiento en la detección de ADN de HHV-6 y de HHV-7 en mucosa cervical de mujeres sanas. Se pudo demostrar la presencia del ADN tanto de HHV-6 como de HHV-7 en las muestras de cepillado cervical donde se detectó una mayor prevalencia de HHV-7 (79%) con respecto a la de HHV-6 (6,8%). Esta diferencia en la prevalencia entre ambos virus también fue encontrada en otros trabajos en los cuales se pudo establecer la mayor presencia de ADN de HHV-7 tanto en saliva como en plasma de individuos sanos (69). Con respecto a los valores hallados para HHV-6 en la mucosa cervical, coincide con trabajos previos como el de Okuno y col. 1995, el de Amiriam y col. 2013(70, 57), quienes en muestras cervicales de mujeres no embarazadas, encontraron porcentajes por debajo del 15%, similar a lo encontrado en este trabajo. Se puede afirmar, entonces, que tanto HHV-6 como HHV-7 son capaces de infectar las células de la mucosa cervical, comportándose éstas como sitio permisivo para la persistencia viral.

A partir de estos hallazgos en la citología normal y siguiendo con los objetivos propuestos, se realizó la detección del ADN de ambos virus en muestras cervicales que presentaban atipia celular. Estos resultados mostraron la presencia del ADN tanto de HHV-6 y HHV-7 en las muestras citológicas con atipia.

Analizados estadísticamente los hallazgos y comparando ambos grupos (citología normal /citología con atipia) se ve que mientras el HHV-7 mantiene una alta prevalencia en los dos grupos considerados (79,3% y 84,3% respectivamente), el HHV-6 presenta diferencias estadísticamente significativas en las muestras con atipia con respecto a aquellas con citología normal (33,3% contra 6,8% respectivamente).

Cuando realizamos el análisis de riesgo (ODDS ratio) sobre éstos resultados, se obtiene un valor que le otorga a la presencia de HHV-6 una asociación positiva. Esto se interpreta como que la presencia del virus es un factor que se asocia a una mayor probabilidad de que el evento, es decir, la lesión, se produzca. Diferente es lo que ocurre con HHV-7 que se encuentra tanto en la citología normal como en la citología con lesión sin establecer diferencias significativas y por lo tanto la asociación entre la presencia del virus y la posibilidad de producir una lesión es negativa, poniendo en duda la posibilidad de que su

presencia pueda significar un riesgo para la salud de la paciente. La presencia del HHV-7 en estas células, podría ser considerada como la de un microorganismo que forma parte de la microbiota normal del hospedero, como parte del viroma que interacciona en este microambiente constituyendo una infección persistente, proceso dinámico de equilibrio entre el virus y su hospedero.

La hipótesis de este trabajo planteó analizar la asociación de HHV-6 y de HHV-7 con la infección por el HPV y la participación de ellos como co-factores en la transformación maligna de aquellas células del epitelio cervical que fueron clasificadas, según el criterio Bethesda, en LSIL y HSIL según el grado de atipia que presentaron.

Un nuevo análisis permitió observar como en aquellas muestras cervicales LSIL HPV positivas no se detectó el ADN de HHV-6 mientras que en aquellas muestras LSIL HPV negativas se encontró una alta prevalencia del ADN viral (93,1%).

Teniendo en cuenta estos resultados se podría asociar la lesión LSIL ya no al HPV sino al HHV-6 como posible productor de la atipia presente, ya que quedó establecida una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la presencia del ADN de HHV-6 en la citología normal. Además se puede desprender de esta observación que poca importancia tendría este virus como co-factor en la prosecución de la infección causada por HPV, ya que no se pudo establecer una co-infección de ambos virus en estas muestras, resultado que se ve también expresado en el trabajo de Romano y col 1996 (71).

De igual modo, si se analizan las muestras HSIL vemos que la prevalencia de ADN viral de HHV-6 es mayor en aquellas muestras HPV negativas (20%), pudiendo considerar la presencia viral como un factor desencadenante de la atipia, no necesariamente asociada a una co-infección con HPV como ha sido planteado por otros trabajos realizados por diferentes grupos de investigadores (Yadav M y col. 1996, Broccolo F y col. 2008) (72, 73).

Si se considera el comportamiento de HHV-7, se ve que la presencia del ADN viral en todas las muestras que presentaban atipia, tanto aquellas que estaban infectadas como no infectadas por HPV, varía entre el 96% y 68% respectivamente. Esto obliga a re direccionar nuestra mirada sobre este virus, considerando su participación dentro de la microbiota genital más como un colonizante que como un patógeno verdadero, con posibilidades de actuar como co factor en la evolución maligna de aquellas lesiones infectadas por HPV.

CONCLUSIONES

A partir del análisis realizado se pueden enumerar algunas conclusiones:

- 1- Que tanto HHV-6 como HHV-7 son capaces de infectar las células epiteliales de la mucosa de cuello uterino tanto de aquellas mujeres sin lesiones como también las que presentan atipias de diferentes grados.
- 2- Que HHV-6 puede considerarse un factor de riesgo en la producción de lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL)
- 3- Que la ubicuidad del HHV-7, presente tanto en las células normales como en aquellas con atipia de diferente grado, pone en duda su rol patogénico.
- 4- Que este mismo comportamiento ubicuo instala al HHV-7 como un componente del viroma humano, en equilibrio con el hospedero.
- 5- Que en las muestras procesadas no se pudo percibir una prevalencia en la co-infección de HHV-6 y HPV que sugiera interacción entre los virus que signifiquen riesgo en la progresión de la lesión hacia la malignidad.
- 6- Que la co-infección detectada entre HHV-7 y HPV en las muestras con diferente tipo de atipia no alcanza para relacionarlos como co-factores para la progresión de la lesión.
- 7- Que la presencia del ADN de HHV-6 y HHV-7 en las muestras cervicales tanto en aquellas con citología normal como con atipia, pone a la mucosa cervical como vía probable de transmisión de ambos virus.

En definitiva, estos resultados resaltan la importancia de seguir investigando la actividad viral en estos epitelios para desentrañar el verdadero significado de estos virus y su impacto en la fisiología y salud del hospedero, poniendo en consideración la vía sexual como vía efectiva de transmisión de la infección.

Capítulo 5

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Katze M. Playing the waiting game. *Curr Opin Virol.* ; 3: 377-379, 2013.
- 2-Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Camaine B, Khalil K, Raab-Trub N. *Cancer Biol.*; 14 (6): 453-71, 2004.
- 3- Ciuffo G. Innesso positivo con filtrato di verruca volgare. *Giom Ital Mal Venereol.* 48: 12-17, 1907.
- 4- Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*; 12 (10): 761-770, 1965.
- 5- Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*; 36: 794, 1976.
- 6- Zur Hausen H, Meihof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleid acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*; 13:650-656, 1974.
- 7- Boshart M, Gissman L, Ikemberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*; 3:1151-1157, 1984.
- 8- Zur Hauser H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*; 2: 342-350, 2002.
- 9- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*; 287(16):2114-9, 2002.
- 10- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*; 370: 890-907, 2007.
- 11- Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol* 2005; 6:204,2005.
- 12- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*; 24 (3):1-10, 2006.
- 13- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franseschi S. Human Papillomavirus type in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. 2003

Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Código de campo cambiado
Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- 14- de Freitas AC, Almeida Diniz Gurgel AP, Simas Chagas B. Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecologic Oncologic*; 126:304-311,2012
- 15- zur Hausen H. Human genital cancer: synergism between two virus infection or synergism between a virus infection and initiating events?. *Lancet*; 2: 1370-2, 1982
- 16- Han CP, Tsao YP, Sun CA, Chen SL. Human papillomavirus, cytomegalovirus and herpes simplex virus infections for cervical cancer in Taiwan. *Cancer Lett*; 120:217-221, 1997.
- 17- Chan PKS, Chan MYM, Li WWH, Chan DPC, Chen AF. Association of human B-herpesvirus with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *J Clin Pathol*; 54: 48-53, 2001
- 18- McGeoch DJ, Gatherer D. Integrating reptilian herpesvirus into the family herpesviridae. *J Virol*; 79: 725-731. 2005.
- 19- Hayward GS. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Semin Cancer Biol*; 9: 187-199, 1999.
- 20- Falke D, Siegert R, Vogell W. [Electron microscopic findings on the problem of double membrane formation in herpes simplex virus]. *Arch Gesamte Virusforsch*; 9: 484-496,1959.
- 21- Furlong D, Swift H, Roizman B. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol*; 10: 1071-1074, 1972.
- 22- Liu F, Zhou ZH. Comparative virion structures of human herpesvirus. In Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al, eds. *Human Herpesvirus: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 27-43, 2007.
- 23- Mettenleiter TC. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol*; 113: 163-169, 2005.
- 24- Liu ST, Sharon-Friling R, Ivanova P, et al .Synaptic vesicle-like lipidome of human cytomegalovirus viri6n reveals a role for SNARE machinery in viri6n egress. *Proc Natl Acad Sci USA*;108, 12869-12874,2011.
- 25- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol*; 154:171-177, 2009.

- 26- Pellet PE, Davison AJ, Eberle R, et al. Order: Herpesvirales. In King AMQ, Adams MJ, Cartens EB, et al, eds. *Virus Taxonomy: Ninth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*. Oxford: Elsevier; 99-107, 2012
- 27- Davison DJ. Herpesvirus systematic. *Vet Microbiol*; 143(1-2):52-69,2010
28. Nevels M, Nitzsche A, Paulus C. How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Red Med Virol*; 21: 158-80, 2011.
- 29- Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markhan PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*; 234: 596-611, 1986.
- 30- Josephs SF, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Schachter F, Wong-Staal F, Gallo RC. Genomic analysis of human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*; 234: 601-603, 1986.
- 31- Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human Herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev*; 10: 521-567, 1997.
- 32- Ablashi DV, Salahuddin SZ, Josephs SF, Imam F, Lusso P, Gallo RC. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature (Lond.)*; 329: 207, 1987.
- 33- Lusso P, Markham PD, Tschachler E, Di MarzoVeronese F, Salhuddin SZ. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (Human Herpesvirus 6). *JExpMed*; 167:1659-1670, 1988.
- 34- Lusso P, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Gallo RC. Diverse tropism for HBLV (human herpesvirus 6). *Lancet*; 743, 1987.
- 35- Romagnoli PA, Nates SV, Paván JV, Serra H. Seroprevalence of human herpesvirus 6 in Andino-Puneños (Argentina). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 94:1-4 2000.
- 36- Ablashi AD, Balachandran N, Josephs SF et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*; 184:545–552, 1991, 1993.
- 37- Aubin JT, Collandre H, Candotti D et al. Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* ; 29: 367–372, 1991.
- 38- Chandran B, Tirawatnpong S, Pfeiffer B, Ablashi DV. Antigenic relationships among human herpesvirus-6 isolates. *J Med Virol*; 37: 247–254, 1992.

- 39- Adams AJ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 157:1411–1422, 2012.
- 40- Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH. Isolation of a new herpesvirus from human CD4 T cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*; 87:748-752, 1990.
- 41- Clark DA Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol*; 10:155-173, 2000.
- 42- Caselli E, Di Luca D. Molecular biology and clinical associations of Roseolovirus human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiological*; 30:173-187, 2007.
- 43- Menegazzi P, Galvan M, Rotola A et al. Temporal mapping of transcripts in human herpesvirus -7. *J General Virol*; 80: 2705-2712, 1999.
- 44- Campadelli-Fiume G. Virus receptor arrays, CD46 and human herpesvirus 6. *Trends in Microbiology*; 8 (10):436, 2000.
- 45- Mori Y. Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol*; 11(7): 1001-1006, 2009.
- 46- Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati M, Berger EA, Lusso P. CD46 Is a Cellular Receptor for Human Herpesvirus 6. *Cell*; 99: 817–827, 1999.
- 47- Wyatt LS, Frenkel N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol*; 66: 3206-3209, 1992.
- 48- Yamamishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y. Identification of human herpesvirus -6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*: 1065-10679, 1998.
- 49 - Suga S, Suzuki K, Ihira M et al. Clinical characteristic of febrile convulsions during primary HHV-6 infection. *Arch Dis Child*; 82: 62-66, 2000.
- 50- Suga S, Yoshikawa T, Asano Y et al. Clinical and virological analysis of 21 infants with exanthema subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. *Ann Neurol*; 33:597-603, 1993.
- 51 -Yoshikawa T, Ohashi M, Miyake M et al. Exanthem subitum associated encephalitis nationwide survey in Japan. *Pediatr Neurol*; 41:353-358, 2009.
- 52 -Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Matsubara T, Furukawa S, Asano Y. Invasion by human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 of the central nervous system in patients with neurological signs and symptoms. *Arch Dis Child*; 83: 170–171, 2000.

- 53 -Miyoshi I, Tanaka- Taya K, Hara J, et al. Human Herpesvirus-6 (HHV-6) and Human Herpesvirus 7 (HHV-7): inverse relationship between human herpesvirus 6 and 7 detection after allogenic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 27:1065-1070, 2001.
- 54 Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, Di Luca D. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; Vol. 95: 13911–13916, 1998.
- 55- Kondo K, Shimada K, Sashihara J, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Identification of Human Herpesvirus 6 Latency-Associated Transcripts. *American Society for Microbiology* 0022-538X/02/\$04.00_0 DOI: 10.1128/JVI.76.8.4145–4151, 2002
- 56- Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clinical Microbiology Reviews*; 28 (2):313-334, 2015
- 57- Amirian ES, Scheurer ME. Chromosomally-integrated human herpesvirus 6 in familial glioma etiology. *Med. Hypotheses*; 79:193–196, 2012.
- 58- Doniger J, Muralidhar S, Rosenthal LJ. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin. Microbiol. Rev*;12:367–382, 1999.
- 59- Kofman A, Marcinkiewicz L, Dupart E, Lyshchev A, Martynov B, Ryndin A, Kotelevskaya E, Brown J, Schiff D, Abounader R. The roles of viruses in brain tumor initiation and comodulation. *J. Neurooncol*;105: 451–466, 2011
- 60- Chi J, Gu B, Zhang C, Peng G, Zhou F, Chen Y, Zhang G, Guo Y, Guo D, Qin J, Wang J, Li L, Wang F, Liu G, Xie F, Feng D, Zhou H, Huang X, Lu S, Liu Y, Hu W, Yao H. Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma, *J Infect Dis*; 206(9):1394-8, 2012.
- 61- Chen M, Popescu N, Woodworth C, Beneman Z, Corbellino M, Lusso P, Ablashi DV, Di Paolo JA. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol*; 68:1173-1178, 1994
- 62- Di Paolo JA, Popescu NC, Woodworth CD, Zimonjie DB. Papillomaviruses and potential copathogens. *Toxicol Lett*; 88:1-7, 1996.

- 63- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*; 170 (5):1077-85, 1994.
- 64- Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, et al. Detection of Human Herpesvirus 6 in Plasma of Children with Primary Infection and Immunosuppressed Patients by Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis*; 171:273-80, 1995.
- 65- Berneman Z, Ablashi DV, Li GE, et al. Human herpes virus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89:10552-10556, 1992.
- 66- Wylie K, Weinstock G, Storch A. Emerging view of the human virome. *Transl Res*; 160(4):283-290, 2012.
- 67- Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayr A, Ablashi D, Lund TC, Tolar J, De Meirleir K, Montoya JG. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 107:5563-5568, 2010.
- 68- Kaufer B, Flamand L. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Current Opinion in Virology*; 9:111-118, 2014.
- 69- Biganoli P, Ferreyra L, Sicilia P, Carabajal C, Frattari S, Littvik A, Nates S, Pavan J. IgG Subclasses and DNA Detection of HHV-6 and HHV-7 in Healthy Individuals. *J Med Virol*; 82: 1679 – 1683, 2010.
- 70- Okuno T, Oishi H, Hayashi K, Nonogaki M, Tanaka K, Yamanishi K. Human herpesviruses 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J. Clin. Microbiol*; 33:1968–1970, 1995.
- 71- Romano N, Romano FM, Viviano E, Vitale F, Villafrate MR, Perna AM, Bonura F, Guttadauro R. Rare Association of Human Herpesvirus 6 DNA with Human Papillomavirus DNA in Cervical Smears of Women with Normal and Abnormal Cytologies. *J of Clin Microbiol*; 34(6): 1589–1591, 1996.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

72- Yadav M, Arivananthan M, Kumar S. HHV-6 antigen and viral DNA detected in cervical cells from archived tissue using histochemical staining and hybridization. *Clin Diagn Virol*; 7:23–23, 1996.

73- Broccolo F, Cassina G, Chiari S, Garcia-Parra R, Villa A, Leone BE, Brenna A, Locatelli G, Mangioni C, Cocuzza CE. Frequency and Clinical Significance of Human *B*-Herpesviruses in Cervical samples from Italian women. *Journal of Medical Virology*; 80:147–153, 2008.