

475



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EXPRESIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN  
TEJIDO FIJADO EN FORMOL/EMBEBIDO EN  
PARAFINA DE ESPECÍMENES CON DIAGNÓSTICO  
DE HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL, PAPILOMA Y  
VERRUGA VULGAR.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
CIRUJANA DENTISTA  
P R E S E N T A

CRISTINA VIVIANA RUBALCAVA TORRES

293594

*SoBo* *[Signature]*

DIRECTORA: C. D. M. O. BEATRIZ C. ALDAPE BARRIOS  
ASESORES: M. en C. FRANCISCO JAVIER GARCÍA VÁZQUEZ  
C. D. JOSÉ LUIS TAPIA VÁZQUEZ 



MÉXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

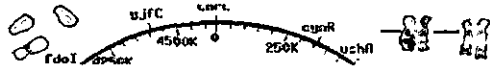
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



*“PORQUE TE HAGO SABER SANCHO, QUE LA BOCA SIN MUELAS ES COMO UN MOLINO SIN PIEDRA, Y EN MUCHO MÁS SE HA DE ESTIMAR UN DIENTE QUE UN DIAMANTE.”*

**MIGUEL DE CERVANTES SAAVEDRA.**



## *Agradecimientos:*

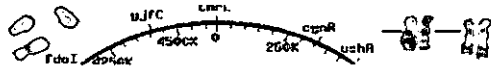
*A Dios, por haberme dado el gran regalo de la vida y poder ver realizados mis sueños.*

*A mis Padres con agradecimiento y admiración por su ejemplo de honestidad, rectitud y respeto a la vida y quienes gracias a su esfuerzo y amor han sido guía de mi trayectoria profesional.*

*A mis Hermanos Leo y Eric, con amor y agradecimiento por apoyar mis ilusiones.*

*A mis queridos Abuelitos, ausentes y presentes; con especial reconocimiento a mi **abuelita Aby**, que con su dedicación y entusiasmo supo dar y mantener en mí el aliento y fortaleza suficientes para alcanzar la meta trazada. Gracias por tus consejos y amor incondicional.*

*A mis Tíos, Tías, Primos y Primas, con todo el cariño y agradecimiento, por la unión que siempre hemos tenido, por sus sabios consejos y absoluto apoyo.*



*A la C. D. M. O. Beatriz C. Aldape Barrios.*

*Jefa del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, de la U. N. A. M.*

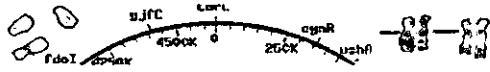
*Con respeto, admiración y agradecimiento, por brindarme esta gran oportunidad para la elaboración y desarrollo de la presente tesis de investigación, así como por compartir conmigo sus amplios conocimientos y su valiosa amistad.*

*Al C. D. José Luis Tapia Vázquez, mi agradecimiento por su atinada orientación para el inicio del desarrollo de esta tesis de investigación.*

*Al C. D. Daniel Quezada Rivera, mi agradecimiento por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis de investigación.*

*Al C. D. Bernardo Cruz Legorreta, mi agradecimiento por su oportuno y desinteresado apoyo para la conclusión de esta tesis de investigación.*

*A todos los integrantes, tanto del Servicio Social como los adscritos al Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la U. N. A. M, con agradecimiento por su apoyo incondicional.*



*Al Dr. Eduardo López Corella.  
Jefe del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría.*

*Con respeto y gratitud por haberme otorgado su confianza y permitirme realizar la presente tesis de investigación en el Departamento a su digno cargo.*

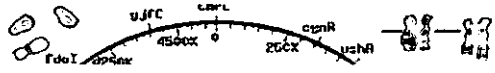
*Al Dr. Daniel Carrasco Daza.  
Jefe del Servicio de Patología Molecular del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría.*

*Con respeto y gratitud por las facilidades prestadas para el manejo del material y equipo del Servicio a su digno cargo.*

*Al Maestro en Ciencias Francisco Javier García Vázquez, Químico adscrito al Departamento de Patología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría.*

*Con respeto y gratitud por su calidad humana y profesional, así como por su atinada dirección en el desarrollo de la presente tesis y por la generosidad con la que brinda sus bien cimentados conocimientos.*

*A todos los Histotecnólogos del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría, con agradecimiento y admiración por su gran colaboración durante el tiempo que duró mi estancia en tan noble Institución.*

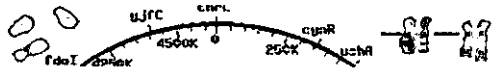


*A todos y cada uno de mis Profesores del Grupo 04 de la Facultad de Odontología de la UNAM y de la Clínica Periférica Las Águilas, con respeto, admiración y gratitud por sus sabias enseñanzas, que para mí han sido una fuente inagotable de experiencia y conocimientos en mi formación profesional.*

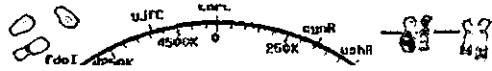
*A mis Amigos, Compañeros y a todas las personas que tocaron mi vida de una manera muy especial en estos años de Licenciatura, con afecto.*

**A TODOS GRACIAS.**



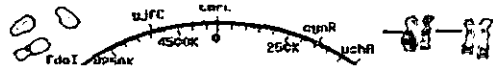


Este trabajo se realizó  
en el Departamento de Patología  
del Instituto Nacional de Pediatría  
bajo la asesoría del  
M. en C. Francisco Javier García Vázquez.



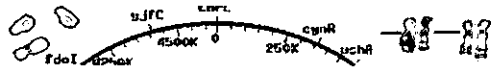
## ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES	4
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VIRUS	4
1.2 PAPOVAVIRUS	7
1.3 PAPILOMAVIRUS	9
1.3.1 CLASIFICACIÓN	10
1.3.2 GENOMA	17
1.3.3 REPLICACIÓN VIRAL	22
1.3.3.1 INFECCIÓN LÍTICA	22
1.3.3.2 INFECCIÓN PERSISTENTE	23
1.4 PATOGÉNESIS	24
1.5 PAPEL ONCOGÉNICO	27
1.6 RESPUESTA INMUNE DE LA CÉLULA HUÉSPED	30
1.7 FACTORES DE RIESGO	31
1.8 MODO DE TRANSMISIÓN	31
1.8.1 ABRASIONES DE LA PIEL	31
1.8.2 CONTACTO SEXUAL	32
1.8.3 PRENATAL	32
1.8.4 AUTOINOCULACIÓN	32
1.9 EPIDEMIOLOGÍA	33
1.10 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	35
1.10.1 PIEL	35
1.10.2 MUCOSA ORAL	40
1.10.3 VÍAS RESPIRATORIAS	47
1.10.4 MUCOSA GENITAL	50
1.11 PATRÓN HISTOLÓGICO DE LAS LESIONES	53



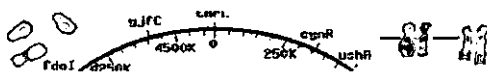
	<b>PÁGINAS</b>
1.12 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	54
1.12.1 CLÍNICO	54
1.12.1.1 COLPOSCOPIA	54
1.12.2 LABORATORIO	54
1.12.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	54
1.12.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	55
1.12.2.3 HIBRIDACIÓN "IN SITU"	57
1.12.2.4 SOUTHERN BLOT	58
1.12.2.5 DOT BLOT	59
1.12.2.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	60
1.13 PREVENCIÓN	65
1.14 TRATAMIENTO	66
1.14.1 CITOTÓXICAS	66
1.14.2 QUIRÚRGICAS	67
1.14.3 INMUNOLÓGICAS	68
1.14.3.1 VACUNA PARA VPH	68

	<b>PÁGINAS</b>
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	69
3. JUSTIFICACIÓN	69
4. OBJETIVOS GENERALES	70
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	71
7. HIPÓTESIS ALTERNA	71
8. VARIABLES DEPENDIENTES	71
9. VARIABLES INDEPENDIENTES	71
10. TIPO DE ESTUDIO O DE INVESTIGACIÓN	71
11. MATERIALES Y MÉTODOS	72
11.1 UNIVERSO DE ESTUDIO	72
11.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	72
11.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	72
11.4 PROCESO DE INMUNOHISTOQUÍMICA	73
11.5 PROCESO DE HIBRIDACIÓN "IN SITU"	76
12. RESULTADOS	78
13. CONCLUSIONES	88
14. DISCUSIÓN	89
15. PERSPECTIVAS A FUTURO	90
16. ABREVIATURAS	91
17. GLOSARIO	92
18. REFERENCIAS	103
19. ANEXOS	109



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINAS
1	PAPILOMAVIRUS Y SUS CARACTERÍSTICAS.	9
2	CLASIFICACIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO.	11
3	CLASIFICACIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE ACUERDO AL EPITELIO DONDE SE DESARROLLA LA INFECCIÓN.	15
4	CLASIFICACIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE ACUERDO AL RIESGO DE INDUCIR LESIONES PREMALIGNAS.	16
5	FUNCIONES GENÉTICAS DE LOS GENES DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO.	19
6	INTERACCIONES ENTRE ONCOPROTEÍNAS DE VIRUS DE ADN TUMORALES Y PROTEÍNAS CELULARES SUPRESORAS DE TUMOR.	29
7	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR EL VIRUS PAPILOMA HUMANO.	64
8	RELACIÓN ENTRE LAS TRES PATOLOGÍAS Y LA EDAD.	82
9	RELACIÓN DE LAS TRES PATOLOGÍAS Y SU LOCALIZACIÓN.	83
10	RELACIÓN ENTRE EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y EL HISTOPATOLÓGICO.	84



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINAS
1	MAPA GENÓMICO DEL VIRUS DEL POLIOMA BK HUMANO. 8
2	MAPA GENÓMICO DEL VPH TIPO 11. 21
3	MAPA GENÓMICO DEL VPH TIPO 16. 21
4	PENETRACIÓN DEL VPH A LA CÉLULA HUÉSPED. 24
5	VERRUGAS COMUNES EN LA MANO. 36
6	VERRUGAS PLANTARES. 37
7	VERRUGAS PLANAS EN EL MENTÓN. 38
8	VERRUGAS PLANAS EN EL HOMBRO. 38
9	PAPILOMA EN ENCÍA INTERDENTARIA. 40
10	PAPILOMA EN ARCO PALATOGLOSO. 40
11	PAPILOMA EN DORSO DE LA LENGUA. 41
12	PAPILOMA EN SUPERFICIE VENTRAL DE LA LENGUA. 41
13	PATRÓN HISTOLÓGICO DE UN PAPILOMA. 42
14	VERRUGA VULGAR EN LA MUCOSA LABIAL INFERIOR. 43
15	VERRUGA VULGAR EN MUCOSA BUCAL. 43
16	PATRÓN HISTOLÓGICO DE UNA VERRUGA VULGAR. 44
17	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL EN LA MUCOSA LABIAL SUPERIOR. 45
18	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL EN LA MUCOSA LABIAL INFERIOR. 45
19	PATRÓN HISTOLÓGICO DE LA HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL. 46
20	PAPILOMA LARÍNGEO JUVENIL. 47

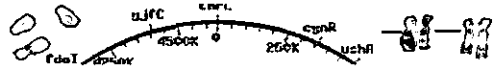
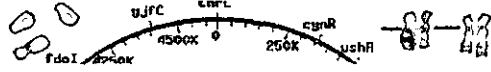


FIGURA	PÁGINAS
21 PATRÓN HISTOLÓGICO DE UN PAPILOMA LARÍNGEO.	48
22 MÚLTIPLES CONDILOMAS EN LA MUCOSA LABIAL INFERIOR.	50
23 CONDILOMA ACUMINADO EN COMISURA LABIAL.	50
24 PATRÓN HISTOLÓGICO DE UN CONDILOMA ACUMINADO.	51
25 CONDILOMA ACUMINADO EXTENSO EN REGIÓN VULVAR.	52
26 CONDILOMA ACUMINADO EN PREPUCIO.	52
27 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	62
28 PROCESO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.	75
29 PROCESO DE HIBRIDACIÓN "IN SITU".	77
30 GRÁFICA DE LOS CASOS ANALIZADOS.	81
31 GRÁFICA DE INCIDENCIA DE LAS TRES PATOLOGÍAS EN CUANTO AL GÉNERO.	81
32 GRÁFICA DE INMUNOEXPRESIÓN POR TIPO DE LESIÓN.	85
33 GRÁFICA DE INMUNOEXPRESIÓN GENERAL.	85
34 HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL.	86
35 CONTROL DE PAPILOMA FARÍNGEO PARA LA TÉCNICA DE IHQ (LSAB+/DAB).	86
36 PAPILOMA BUCAL.	87
37 CONTROL DE PAPILOMA FARÍNGEO PARA TÉCNICA DE HIS.	87



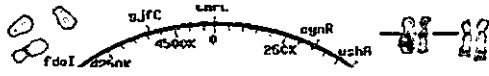
## RESUMEN

Los papilomavirus son un grupo de virus específicos de especie que infectan a una gran variedad de vertebrados, incluyendo al hombre, en los que generalmente producen tumores benignos de piel (papilomas), estos tumores ocasionalmente pueden malignizarse. Las lesiones más frecuentes encontradas en el hombre son las verrugas vulgares y plantares, en los últimos años se ha reportado un aumento en las infecciones del virus papiloma humano (VPH) en el aparato genital.

Recientemente se ha despertado un gran interés sobre estos patógenos debido no solo al gran aumento de la incidencia de los condilomas acuminados o verrugas genitales, sino a la asociación encontrada entre algunos genotipos de VPH con lesiones precancerosas y cánceres genitales así como del aparato respiratorio y gastrointestinal.

En este trabajo se encontró la presencia del virus del papiloma humano en biopsias fijadas en formol/embebido en parafina de especímenes con diagnóstico de papiloma, hiperplasia epitelial focal y verruga vulgar de muestras que fueron obtenidas en el archivo del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, de la Facultad de Odontología UNAM. Se estudiaron 32 biopsias, y a cada bloque se le realizaron las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación "in situ" (HIS) para detectar la presencia de proteínas virales y del genoma viral. Por la técnica de inmunohistoquímica se logró detectar que en un 78% fueron (+) a VPH. Por la técnica de hibridación "in situ" sólo se detectaron 3 casos (+) de 4 casos estudiados por la técnica de inmunohistoquímica.





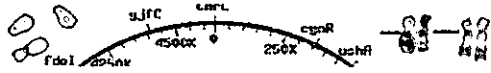
## INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) ha sido detectado en una gran variedad de lesiones cutáneas y mucosas, en la actualidad más de 10 tipos de VPH se han asociado a infecciones bucales tales como papilomas escamosos celulares, condilomas acuminados, hiperplasia epitelial focal y verrugas comunes. El VPH tienen un papel muy importante como factor etiológico de lesiones premalignas y neoplasias epiteliales malignas, no solo de la mucosa anogenital sino también de la mucosa bucal.<sup>5</sup>

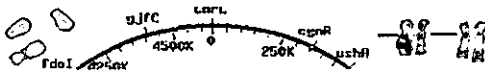
En este trabajo se demostró la expresión de proteínas de la cápside del VPH mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) en biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de papiloma, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal que fueron obtenidas en el archivo del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la Facultad de Odontología de la UNAM durante el año 1999-2000. Para confirmar los resultados obtenidos por la técnica de IHQ se realizó la técnica de hibridación "in situ" (HIS) a 3 casos que resultaron positivos a VPH por IHQ, confirmando los resultados, se utilizó como control positivo en todas las reacciones que se llevaron a cabo, una biopsia de papiloma faríngeo positivo a VPH.

Debido a que para ambas técnicas es un factor importante el proceso de fijación de las piezas quirúrgicas, se realizó la técnica de IHQ para observar la expresión de la proteína vimentina en todos los casos analizados; esta proteína por ser constitutiva del citoesqueleto, de vasos sanguíneos y del tejido conectivo, nos puede dar información cuali y cuantitativamente de la preservación de las muestras, las cuales resultaron de excelente calidad.

Por la técnica de IHQ se detectó que el 78% de los casos fueron positivas al VPH.



En base a lo anterior se puede concluir que efectivamente el virus del papiloma humano tiene un papel importante en la etiología de el papiloma, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal; y aunque los tipos asociados son considerados de nulo o bajo riesgo de malignidad, no hay que olvidar que este virus se puede transmitir por autoinoculación, de ahí que encontremos condilomas en cavidad bucal, siendo que es una lesión que afecta la región genital. Es por ello que se recomienda el empleo de la IHQ e HIS como técnicas de rutina en el Departamento de Patología Clínica y Experimental para garantizar a los pacientes un diagnóstico y tratamiento oportuno, evitando así complicaciones indeseables.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VIRUS.

Los virus son los agentes infecciosos más pequeños (20 a 300nm de diámetro), que contienen como genoma sólo una clase de ácido nucleico (ARN ó ADN). En la actualidad se sabe que los virus son factores etiológicos en el desarrollo de varios tipos de tumores humanos.<sup>1</sup>

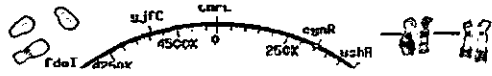
Toda la unidad infecciosa se denomina virión. Los virus son inertes en el medio extracelular; se replican sólo en células vivas y su parasitismo es a nivel genético. El genoma viral se encuentra encerrado en una cubierta proteínica, la cual puede estar rodeada por una membrana que contiene lípidos, así mismo contiene la información necesaria para programar a la célula huésped infectada para que sintetice varias macromoléculas específicas del virus requeridas para la producción de la progenie viral.<sup>1,2</sup>

Durante el ciclo replicativo se producen numerosas copias del genoma viral y de proteínas de la envoltura. Estas últimas se ensamblan para construir la cápside, la cual encapsula y estabiliza el genoma viral contra el medio extracelular y facilita la adhesión y quizá la penetración del virus al ponerse en contacto con las nuevas células sensibles.<sup>1,2</sup>

Lutzner, revisó el papel del virus del papiloma humano (VPH) en la patogénesis de las verrugas planas y papilares, enfatizando la gran variedad de diferencias genómicas de los diversos subtipos de VPH.<sup>3</sup>

Como no ha sido desarrollado un sistema que mediante el cultivo de tejidos permita el aislamiento y propagación de VPH, recientes investigaciones han tenido que recurrir a la clonación del ADN viral dentro de las fases en conjunción con las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.<sup>4,5</sup>





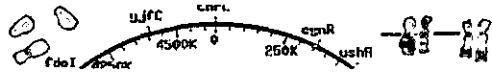
Para 1907, Ciuffo describió la infección natural de las verrugas comunes de la piel por autoinoculación, demostrando que una bacteria estéril extraída de la verruga podría ser la inductora de la lesión.<sup>3,7,8</sup>

En 1932, Shope aisló el virus del papiloma de conejo, mismo que produce papilomas y tumores en la piel del conejo. Este virus fue el primer modelo para estudiar el posible papel oncogénico de los virus en los mamíferos.<sup>3,7,8</sup>

En 1949, Strauss revela el carácter viral de la enfermedad.<sup>8</sup>

Para 1960, estudios ultraestructurales del ácido desoxirribonucleico confirmaron la presencia de un virus en las verrugas plantares. Las partículas encontradas eran de forma esférica, de aproximadamente 55nm, de un peso de  $5 \times 10^6$  Daltons con una cubierta nuclear de ADN, que contenía 8000 pares de bases.<sup>3</sup>

La posibilidad de que la infección por VPH esté relacionada en la etiología del cáncer bucal, fue descrita por Syrjänen et. al en 1983, pues de los 40 casos que él estaba estudiando con diagnóstico de carcinoma, 16 que corresponden a un 40%, se les demostró la presencia de VPH mediante inmunohistoquímica.<sup>3</sup>



## 1.2 PAPOVAVIRUS

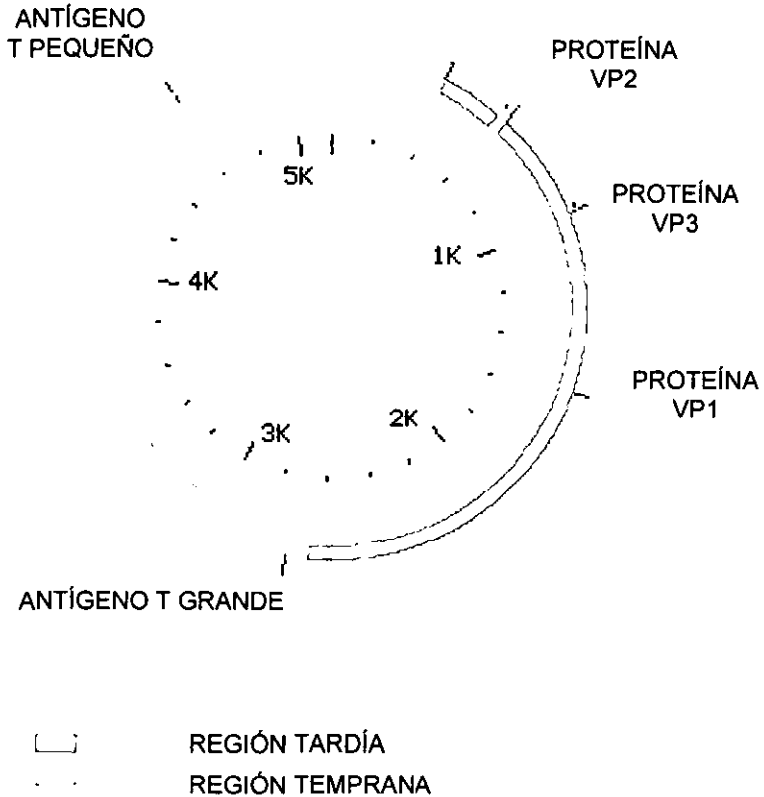
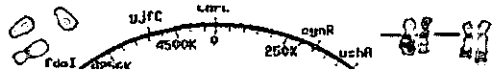
La familia Papoviridae comprende un grupo de virus de ADN que produce infecciones líticas y tumores benignos o cancerosos.<sup>1,9</sup>

El nombre de papovavirus se formó por el acrónimo de los miembros más famosos del grupo: los virus papiloma (virus de seres humanos y animales), los virus polioma (de ratones y BK humano Fig. 1) y los virus vacuolantes (virus SV40 de los simios).<sup>6,10</sup>

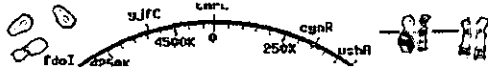
Desde el punto de vista estructural son viriones icosaédricos, no envueltos, con 72 capsómeros y que contienen un ADN circular de doble cadena o bicatenario.<sup>6</sup>

Algunas de las características importantes de los papovavirus son:

- Virión: Icosaédrico, 45 a 55 nm de diámetro.
- Composición: ADN (10%) , proteínas (90%).
- Genoma: ADN circular de doble cadena, con peso molecular de 5 a 8 Kpb. A veces puede adoptar otras dos configuraciones: lineal y superenrollado.
- Proteínas: 3 proteínas estructurales; las histonas celulares condensan al ADN del virión.
- Cubierta: ninguna.
- Replicación: en el núcleo
- Características destacadas: Estimulan la síntesis de ADN celular. Los papilomavirus son causa importante de enfermedad humana. Los poliovirus son modelos importantes de los virus tumorales. Las oncoproteínas virales interactúan con proteínas supresoras de células tumorales.<sup>9,11,12</sup>



**Fig. 1 MAPA GENÓMICO DEL VIRUS DEL POLIOMA BK HUMANO.** El genoma circular de doble cadena de ADN contiene 5008pb. Se observa la región temprana (banda color lila) que codifica a las oncoproteínas virales que son el antígeno T pequeño -sT- (traducción) y el antígeno T grande -LT- (replicación y transformación) . También la región tardía que codifica para las proteínas de la cápside VP1, VP2, VP3 (banda color rojo).



### 1.3 PAPILOMAVIRUS

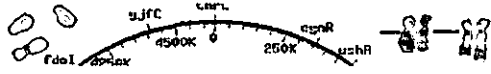
El virus del papiloma humano (VPH) pertenece al grupo de virus oncogénico con genoma de ADN que se replica usualmente en las células huésped natural, integrando una porción del genoma viral al cromosoma celular (Tabla 1).<sup>6,12</sup>

**Tabla 1. PAPILOMAVIRUS Y SUS CARACTERÍSTICAS**

CARACTERÍSTICAS	GÉNERO
<b>VIRION</b>	
Estructura de la cápside	Icosaédrico sin cubierta
Tamaño (diámetro)	55nm
<b>GENOMA</b>	
Tipo y estructura del ácido nucléico	ADN circular de doble cadena.
Tamaño : PM ; número de pares de bases.	$5 \times 10^6$ ; $8 \times 10^3$
Información que se interpreta	En una cadena.
<b>POTENCIAL ONCÓGENO</b>	
Tumores en huéspedes naturales	Sí
Resultado de infección natural	Tumor benigno (verruga) Carcinoma Cervico Uterino
Tejido blanco	Superficies epiteliales
Transformación de células in vitro	Rara vez
Genoma en células transformadas	No integrado en verrugas ; integrado en carcinomas.
<b>MIEMBROS INDIVIDUALES</b>	
Virus que infectan al hombre	Virus del papiloma humano >70
Enfermedades humanas de mayor importancia	Verrugas cutáneas y genitales , papilomas laríngeos, carcinoma cervical.
Virus aislados importantes de animales huéspedes	Papilomavirus de vaca y conejo.

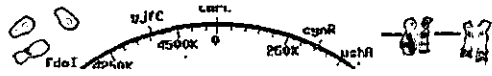
(Jawetz ,E 1996; Miller, C 1996; White, D 1994).





### 1.3.1 CLASIFICACIÓN

La clasificación del VPH se basa en el rango de los huéspedes que infectan y en el grado de homología de sus moléculas de ADN (porcentaje de hibridación cruzada), son virus específicos de especie que comparten un antígeno común de género. Se subdividen en tipos y subtipos según el grado de homología de su genoma (Tabla 2), ya que no se diferencian serológicamente, se clasifican como tipos distintos aquellos en los que el grado de homología es inferior al 50% y se definen como subtipos cuando el grado de homología es superior al 50%; así del VPH-6 se han descrito 6 subtipos. Actualmente con las técnicas de Biología Molecular se han podido identificar alrededor de 80 tipos diferentes de VPH, de los cuales 20 infectan superficies mucosas y el resto infectan el epitelio cutáneo (Tabla 3); así mismo se han clasificado de acuerdo al grado de malignidad.<sup>10,14,15,16,17,18,19,68</sup> (Tabla 4)

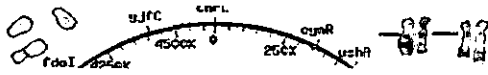


**Tabla 2. CLASIFICACIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO**

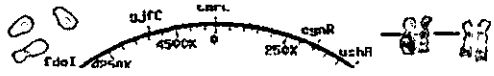
TIPO DE PAPILOMAVIRUS	LOCALIZACIÓN
1	Verrugas plantares
2	Verrugas comunes
3	Verrugas planas
4	Verrugas comunes
5	Lesiones benignas y malignas de Epidermodisplasia Verruciforme (EV)
6	Verrugas genitales, Papilomatosis laringeas
7	Verrugas de "carnicero" ,papilomatosis oral en pacientes con VIH.
8	Lesiones benignas y malignas de EV
9	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
10	Verrugas planas
11	Papilomas laringeos, Verrugas genitales
12	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
13	Hiperplasia Epitelial Focal
14	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
15	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
16	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
17	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
18	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
19	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme



20	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
21	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
22	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
23	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
24	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
25	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
26	Verrugas comunes en inmunosuprimidos
27	Verrugas comunes
28	Verrugas planas
29	Verrugas comunes
30	Carcinoma laríngeo
31	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
32	Hiperplasia Epitelial Focal y papilomas
33	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
34	Neoplasia intraepitelial anogenital
35	Neoplasia anogenital y cáncer
36	Queratosis actínica, lesiones EV
37	Queratoacantoma
38	Melanoma
39	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
40	Neoplasia intraepitelial anogenital

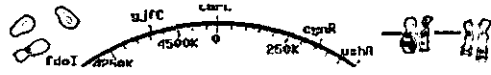


41	Carcinoma escamoso celular cutáneo
42	Neoplasia intraepitelial anogenital
43	Neoplasia intraepitelial anogenital
44	Neoplasia intraepitelial anogenital
45	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
46	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
47	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
48	Carcinoma escamoso celular cutáneo
49	Verrugas planas en inmunosuprimidos
50	Lesiones de Epidermodisplasia Verruciforme
51	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
52	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
53	Neoplasia intraepitelial anogenital
54	Neoplasia intraepitelial anogenital
55	Neoplasia intraepitelial anogenital
56	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
57	Papilomas orales y papiloma sinusal invertido en maxilar
58	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
59	Neoplasia intraepitelial anogenital
60	Quiste epidermoide
61	Neoplasia intraepitelial anogenital



62	Neoplasia intraepitelial anogenital
63	Verrugas en piel
64	Neoplasia intraepitelial anogenital
65	Verruga pigmentada
66	Carcinoma cervical
67	Neoplasia intraepitelial anogenital
68	Neoplasia intraepitelial anogenital
69	Neoplasia intraepitelial anogenital y cáncer
70	Papiloma vulvar
71	Neoplasia intraepitelial anogenital
72	Papiloma oral (paciente con HIV)
73	Papiloma oral (paciente con HIV)
74	Neoplasia intraepitelial anogenital
75	Verruga común
76	Verruga común
77	Carcinoma de células escamosas
80	Piel normal
82	Neoplasia intraepitelial vaginal

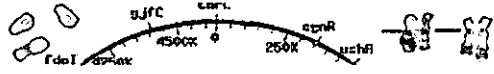
(De Villers, E 1994; White, D 1996; Zur Hausen, H 1996)



**Tabla 3. CLASIFICACIÓN DEL VPH DE ACUERDO AL EPITELIO DONDE SE DESARROLLA LA INFECCIÓN**

<p>Epitelio cutáneo</p>	<p>VPH: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,17,19,20, 21,22,23,24,25,26,27,28,29,36,37,38, 41,46,47,48, 49 57, 63, 65, 75, 76 y 77.</p>
<p>Epitelio de la región ano-genital</p>	<p>VPH: 5, 6,11,16,18,30,31,33,35,39,42,43,44, 45,51,52,53,54,55,56,57,58,66 y 70.</p>
<p>Mucosa bucal</p>	<p>VPH: 1,2,3,4,6,7,10,11,13,16, 30,31,32,33,35,45,52,55 y 57.</p>

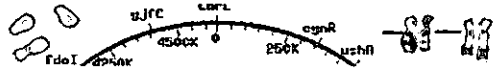
(Bernad, H 1994; Lawton, G. M 1992; Tjoung-Won, P 1995)



**Tabla 4. CLASIFICACIÓN DEL VPH DE ACUERDO AL RIESGO DE INDUCIR LESIONES PREMALIGNAS**

VPH de alto riesgo	16,18,31,33,35,39,45,51,52,55,56 y 58.
VPH de bajo riesgo	6, 11 y 42.
VPH sin riesgo	30,40,43,44,53,54 y 57.

( Jawetz, E 1996; Mc Cance, D 1994; Miller, C 1996)



### 1.3.2 GENOMA DEL VPH.

El genoma consiste en 7200 - 8000 pares de bases, contiene hasta 10 marcos de lectura abierta (ORF), localizada en la misma cadena de ADN. Las localizaciones y longitudes exactas de varios marcos de lectura abierta son diferentes para cada uno de los tipos genómicos (Fig. 2 y 3). Generalmente solo una de las hebras es transcripcionalmente activa y su transcripción ocurre en una sola dirección.<sup>14,16,18,29,21,22,23.</sup>

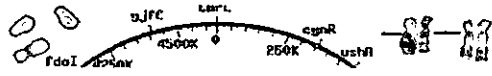
El genoma del VPH puede dividirse en 3 regiones:

La Región Larga de Control (LCR) que ocupa aproximadamente el 10% del genoma, y se localiza entre L1 y E6, se denomina también como zona no codificadora o región reguladora superior (URR).

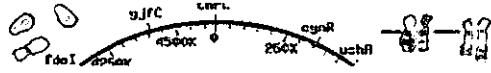
La región temprana (E), cuyos genes tienen una función regulatoria relacionada con la persistencia del genoma, replicación del ADN y la activación del ciclo lítico, codifican polipéptidos funcionales responsables de la transformación celular y de la presencia de ADN como episoma en las células que infectan, codifica para las proteínas E1, E2, E3, E4, E5, E6, y E7, éstas dos últimas se expresan en todos los VPH involucrados en cáncer cervical.

Y la región tardía (L), que son L1 y L2 que codifican para las proteínas de la cápside.<sup>14,16,18, 20,21,22,23,24</sup> (Tabla 5)



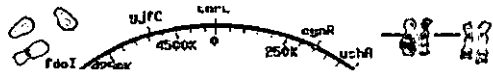


La regulación de la expresión del genoma viral es compleja y controlada tanto por factores de transcripción del virus como de la célula, esta regulación ocurre principalmente en la región LCR, la cual varía substancialmente en la composición de nucleótidos entre los diferentes tipos de VPH, en esta región hay elementos que actúan en *cis* que regulan la transcripción de los genes E6/E7, los cuales son genes transformantes para la inmortalización y el mantenimiento del fenotipo de transformación de las células cancerosas de cérvix VPH positivas. Se han identificado un gran número de factores de transcripción celulares, entre ellos están: NF-1, AP1, KRF-1, Oct-1, SP-1, YY-1 y el receptor de glucocorticoides que participan en la regulación del genoma viral. Además de la regulación celular, la regulación intragenómica de la actividad de los genes E6/E7 a través de la proteína viral E2 juega un papel importante en la activación o represión de estos oncogenes.<sup>14,16,18,20,21,22,23,25.</sup>



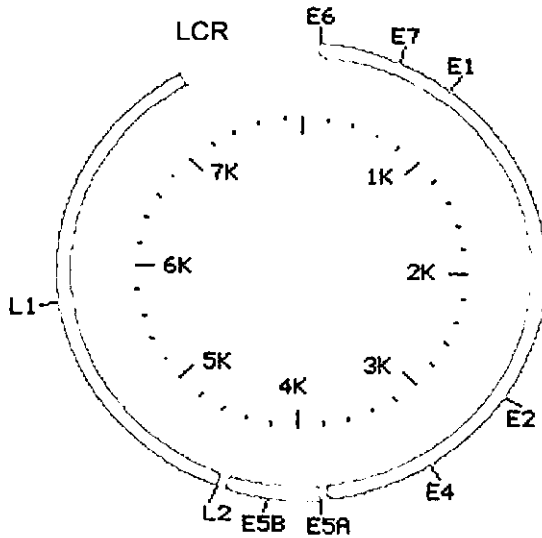
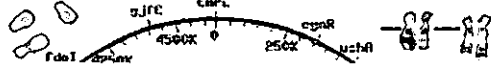
**Tabla 5. FUNCIONES GENÉTICAS DE LOS GENES DEL VPH**

GEN / REGIÓN	PORCIÓN	FUNCIÓN
URR o LCR		Origen de replicación de ADN. Promotores de síntesis de ARN. Potenciador de transcripción.
E1 ORF	Porción 5 Porción 3	Represión de la replicación. Replicación de ADN extracromosómico.
E2 ORF	Toda la longitud Porción 3	Transactivación de la transcripción (VPH de los tipos 6, 11 y 16). Represión de la transcripción; se une con la región larga de control.
E3 ORF		Hasta el momento no se conoce ningún producto o función.
E4 ORF		Fosfoproteína citoplasmática en las verrugas (VPH-1).
E5 ORF		Transformación celular (VPH-6).

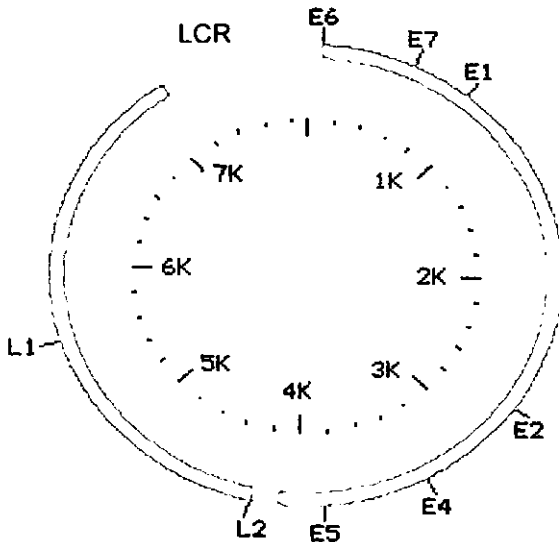


E6 ORF		<p>Transformación celular                  Altera las propiedades de crecimiento celular.                  Forma complejos con p53 (VPH de los tipos 16 y 18).                  Transformación en cooperación con E7 (VPH de los tipos 16 y 18).                  Está conformada por 158 aminoácidos de longitud.</p>
E7 ORF		<p>Regulación de la extensión o número de copias del ADN episómico en la replicación.                  Transactivación de la transcripción (VPH-16).                  Complejos con pRB 105, pRB 110 (VPH-16).                  Dominio para la casein-kinasa II.                  Está conformada por 98 aminoácidos de longitud.</p>
L1 ORF		<p>Proteína mayor de la cápside 76 KD.</p>
L2 ORF		<p>Proteína menor de la cápside 54 KD.</p>

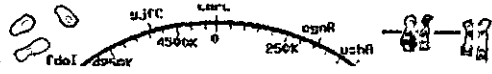
(Aznar, J 1990, Joklik, W 1996, Tjountzou, P 1995)



**Fig. 2 MAPA GENÓMICO DEL VPH 11.** Contiene de 7200-8000pb. Se observan los marcos de lectura abierta de los genes tempranos (E1,2,4,5,6 y 7) y tardíos (L1 y L2); así mismo la región larga de control (LCR) localizada entre L1 y E6.



**Fig. 3 MAPA GENÓMICO DEL VPH 16.** Contiene de 7200-8000pb. Se observan los marcos de lectura abierta de los genes tempranos (E1,2,4,5,6 y 7) y tardíos (L1 y L2); así mismo la región larga de control (LCR) localizada entre L1 y E6.

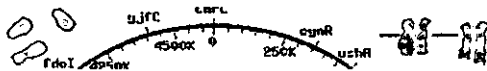


### 1.3.3 REPLICACIÓN VIRAL

El VPH produce dos tipos de infecciones, una infección lítica que lleva a la formación de viriones y una infección persistente que puede llevar a la transformación oncogénica de la célula huésped. Las fases de la infección celular se inician al unirse el virus a los receptores celulares de la membrana plasmática, para penetrar el citoplasma mediante pinocitosis o fusión con dicha membrana. Luego se libera el virus en el citoplasma y pierde su cubierta; después de lo cual se produce la síntesis o replicación de VPH en el núcleo de la célula epitelial por estimulación de la síntesis de ADN celular. Los ácidos ribonucleicos mensajeros tempranos (mARN) -o previos a la síntesis de ADN- son transcritos a partir de aproximadamente la mitad del genoma. Estos mARN salen del núcleo y son traducidos en las proteínas virales tempranas en el citoplasma.<sup>6,9,12.</sup>

#### 1.3.3.1 INFECCIÓN LÍTICA.

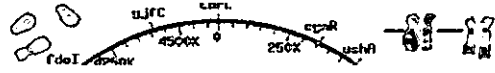
Si la infección sigue un curso lítico, el ADN comienza a replicarse usando una de las proteínas tempranas. La replicación comienza en una región definida del genoma y procede de forma bidireccional hasta aproximadamente 180° alrededor del genoma, cuando las dos moléculas hijas completas se separan. La replicación del ADN se acompaña de la transcripción de los mARN tardíos que codifican las principales proteínas virales. Estas proteínas son retrotransportadas hacia el núcleo, donde se ensamblan con el ADN neoreplicado para formar los viriones hijos. Los papilomavirus establecen una infección lítica o productiva sólo en las células queratinizadas del epitelio superficial, es decir, en esta capa ocurre la producción de las proteínas de la cápside viral y el ensamblaje de los viriones infecciosos.<sup>6,12.</sup>



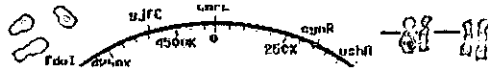
### 1.3.3.2 INFECCIÓN PERSISTENTE.

Estos virus pueden permanecer en estados de latencia en las capas epitelales más profundas de la piel, esta persistencia en las capas basales puede llevar a la transformación oncogénica de sus células huésped, esta transformación ocurre cuando estos virus infectan células incapaces de mantener el ciclo lítico, es decir, las células que se encuentran en estadios de diferenciación y que por lo tanto impiden el ciclo replicativo completo, el mantenimiento del estadio transformado requiere de la expresión continua de los genes virales tempranos.<sup>8,8,12,26.</sup>

Las transcripciones del ADN y el ARN virales para la expresión genética temprana se llevan a cabo en la capa basal. Las células infectadas por VPH son transformadas y producen tumores. El genoma viral se encuentra en forma de múltiples copias de un episoma circular en el interior del núcleo de las células transformadas, pero no de forma integrada en el interior del genoma celular, el sitio en que se rompe el ADN del VPH durante la integración es la región de los genes E1/E2, debido a la ausencia del represor E2 por la ruptura de dicho gen se expresan los oncogenes E6 y E7. Tanto el genoma vírico integrado como la forma extracromosómica transportan sus propios genes transformados. Las células del huésped suelen producir una proteína que inhibe la expresión de los genes transformadores de los papilomavirus, pero ésta puede ser inactivada por productos del virus y por otros virus infectivos, permitiendo así la transformación maligna (Fig. 4).<sup>4,8,8,12,18,23,24,26,27.</sup>



**Fig. 4 PENETRACIÓN DEL VPH A LA CÉLULA HUÉSPED.** El proceso que permite que los tipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH) (1) causen cambios malignos comienza cuando las partículas virales migran hacia las células del huésped (2). El ADN viral entra al núcleo de la célula (3,4) y se integra al ADN (5). Cuando ocurre la integración, parte de los genes E2 y E4 del ADN del VPH son eliminados(6). La eliminación da como resultado la sobreexpresión de los genes E6 y E7 (7), que están involucrados directamente en la transformación de las células epiteliales (8). Los genes sobreexpresados se unen a la proteína p53 y a la proteína del retinoblastoma, proteínas que son supresoras tumorales (9), lo que causa la degradación de las proteínas (10). El control del ciclo celular normal se altera y se liberan los factores de transcripción genética, que en condiciones normales no están disponibles (11). Los factores de transcripción se unen al ADN de la célula del huésped (12) y se estimula la síntesis celular (13). Por tanto, la síntesis está aumentada, lo que da origen a la neoplasia (14).<sup>4,6,8,12,18,21,23,24,26,27,56</sup>

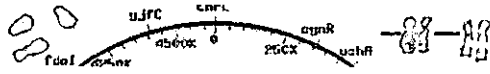


## 1.4 PATOGÉNESIS

Los papilomavirus tienen la característica de ser epiteliotrópicos, por ello producen tumores en el epitelio escamoso de individuos susceptibles. Las lesiones proliferativas benignas del epitelio cutáneo se reconocen como verrugas y las lesiones del epitelio metaplásico y del no queratinizado como condilomas o papilomas.<sup>7,14,20,28,29.</sup>

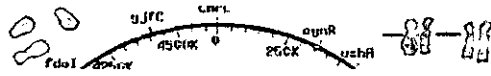
El conocimiento de la patogénesis de estas infecciones se ve limitado por la ausencia de un sistema de cultivo celular que permita la propagación *in vitro* del VPH. El VPH infecta las células de la capa basal del epitelio y la replicación viral sucede en células basales proliferativas, pero las proteínas de la cápside estructural viral (función de genes tempranos) no son detectados morfológicamente. La infección productiva por VPH sólo sucede en células epiteliales escamosas totalmente diferenciadas, incluso en los cultivos celulares de los queratinocitos no se ha logrado la expresión completa del VPH. Las funciones productivas, como la síntesis de ADN vegetativo vírico y la expresión de los genes tardíos, sólo se manifiestan en las células epiteliales escamosas diferenciadas del estrato espinoso y de la capa granulosa epidérmica de la verruga y no en la capa basal ni en los fibroblastos dérmicos. La síntesis de la cápside y el ensamblaje de la partícula vírica sólo se produce, por tanto, en las células diferenciadas de la porción superior del estrato espinoso y la capa granulosa.





Durante la emigración de las células epidérmicas a través del estrato granuloso a la capa granular se produce la diferenciación celular y la expresión de los genes tardíos (L1 y L2) que dan lugar al ensamblado y maduración de la partícula vírica en el núcleo de las células granulares, por lo que el control de la expresión de los genes tardíos está íntimamente unido al grado de diferenciación de las células epiteliales escamosas. La liberación del virus con la subsiguiente infección de las células basales adyacentes se produciría durante la descamación celular y en el proceso normal de degradación y degeneración de restos celulares. Tras la infección, el genoma de los VPH permanece estable en las células basales, bien de forma latente sin alteración morfológica de la célula, o bien expresando genes tempranos que se asocian con la acantosis. La presencia del genoma viral y su expresión en la capa basal y capas superiores de la epidermis son los responsables de la proliferación de células epiteliales características de las verrugas o papilomas. La localización anatómica preferente de la infección es el epitelio escamoso cutáneo o mucoso. Las lesiones cutáneas son habitualmente benignas, excepto en los pacientes en terapia inmunosupresora o con epidermodisplasia verruciforme.<sup>7,9,12,14,20,28.</sup>

Las proliferaciones mucosas, como las del cérvix uterino, muestran diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical. La malignización de las verrugas y condilomas se relaciona con ciertos tipos de VPH, estado físico del ADN (integrado en el cromosoma celular), depresión de la inmunidad celular de los antígenos asociados a VPH, y la interacción de cofactores físicos, químicos u otros agentes infecciosos de transmisión sexual. Los pacientes con trastornos de la inmunidad celular, genéticos o adquiridos, presentan un aumento de frecuencia de las lesiones asociadas a VPH, incluyendo cáncer.<sup>7,9,12,14,20,,22,28.</sup>

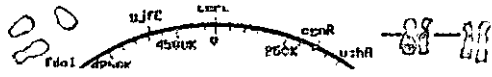


## 1.5 PAPEL ONCOGÉNICO

La primera evidencia del potencial oncogénico del VPH se obtuvo del estudio de la epidermodisplasia verruciforme, enfermedad multifactorial, en la que intervienen factores genéticos, inmunológicos y extrínsecos, en cuyas lesiones se han detectado 15 tipos diferentes de VPH. Un 30% de estos pacientes desarrollan carcinomas de células escamosas en piel que se asocian con VPH-5 y en menor frecuencia con VPH-8.<sup>4,14,18,23,24,25.</sup>

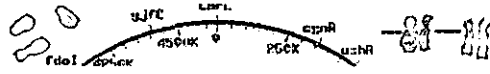
Así mismo, en los últimos años se ha acumulado una gran evidencia de la implicación de un número variable de genotipos de VPH como posibles agentes causales de lesiones proliferativas escamosas en cérvix uterino, vulva, ano, pene, laringe, lengua, lesiones displásicas y malignas de la conjuntiva (VPH-16).<sup>18,23,25,30,31.</sup>

La etiología multifactorial del carcinoma de cérvix implica agentes de transmisión sexual como el VPH genital y diversos cofactores, como número de parejas sexuales, edad del primer coito, uso prolongado de anticonceptivos orales, tabaco y dieta. Los virus oncogénicos humanos mejor conocidos son los papilomavirus (causantes de verrugas, carcinoma cervical y otros carcinomas); los herpesvirus (p. ej. el virus de Epstein Barr asociado con el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo); y el virus de la hepatitis B (asociado con el carcinoma hepatocelular primario). En el laboratorio los virus oncogénicos se estudian de forma rápida y sencilla por su capacidad para causar la transformación de células animales cultivadas. Las células transformadas pueden ser reconocidas con facilidad por su morfología alterada y sus requerimientos nutricionales para el crecimiento. A menudo estas células son inmortalizadas, es decir, no experimentan el envejecimiento y la muerte característicos de las células diploides normales en los cultivos. En muchos casos las células transformadas son malignas, es decir, que causan tumores cuando se les inyecta en los animales.<sup>6,22,23,25,32.</sup>



Quizás el resultado más importante del estudio de las células transformadas haya sido que en general no contienen virus infecciosos. Puede detectarse la presencia de ADN, ARN y ciertos antígenos virales en estas células, lo que sugiere que el genoma viral puede haberse integrado a los cromosomas del huésped de una manera que recuerda la lisogenia en las bacterias. La integración y la unión covalente de las secuencias virales en los cromosomas del huésped se han demostrado con el virus de Epstein-Barr, el virus de la hepatitis B y los papovavirus. El VPH puede integrarse pero también persiste en el núcleo en un estado libre similar a los plásmidos y se replican en sincronía con los cromosomas. <sup>4,6,22,23,25,32,33.</sup>

El estudio de los virus oncogénicos ha sido muy productivo y ha llevado a la identificación de los genes que inician el proceso canceroso, los oncogenes. Se conocen aproximadamente 30 de estos genes. Los oncogenes codificados por los retrovirus tienen homología de secuencia con los genes celulares normales denominados protooncogenes, cuyos productos están involucrados en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, como los factores de crecimiento celular específicos o sus receptores. Los oncogenes de la familia *src* codifican las protein-cinasas de tirosina que regulan procesos celulares claves, los de la familia *ras* codifican las proteínas fijadoras de GTP involucradas en la transducción de la señales y otros denominados *jun*, *fos*, y *myc* son activadores de la transcripción por medio de la unión con las denominadas secuencias aumentadoras ubicadas corriente arriba en ciertos genes. Hasta donde se sabe los oncogenes codificados por los virus de ADN no están relacionados con las proteínas reguladoras normales de las células huéspedes. Estimulan el crecimiento de las células por medio de la activación de la maquinaria para la replicación del ADN. <sup>1,4,6,8,22,23,24,25,30,32,33,56.</sup>



De los ocho o nueve genes codificados por el VPH, dos son expresados tempranamente durante el ciclo de replicación viral, E6 y E7, ambos son necesarios para la transformación. El patrón de integración con frecuencia resulta en la interrupción de la secuencia correspondiente al gene E2 del VPH. La proteína codificada por este gen está involucrada en la regulación de la expresión de otros genes del VPH. La ausencia de la proteína E2 facilita la sobreexpresión de los genes virales E6 y E7, éstas son capaces de formar complejos con las proteínas celulares normales conocidas como pRB110 y la proteína p53, por medio de la formación de éstos complejos las oncoproteínas virales pueden evitar que éstas proteínas realicen sus funciones normales en la regulación del ciclo celular (Tabla 6 y Fig. 4 ).<sup>1,4,6,8,22,23,24,25,27,30,32,33,34,56.</sup>

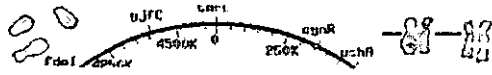
**Tabla 6. INTERACCIONES ENTRE ONCOPROTEÍNAS DE VIRUS DE ADN TUMORALES Y PROTEÍNAS CELULARES SUPRESORAS DE TUMOR.**

VIRUS	ONCOPROTEÍNAS VIRALES	FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON PROTEÍNA CELULAR	
		pRB	p53
Papovavirus SV40	Antígeno T Grande	Antígeno T Grande	Antígeno T Grande
Papilomavirus Humano	E6, E7	E7	E6
Adenovirus	E1A, E1B	E1A	E1B

pRB = fosfoproteína de 110 000 KD, producto del gen retinoblastoma.

p53 = Fosfoproteína de 53,000 KD producto del gen p53.

(Jawetz, E 1996; Wilson, J 1998)

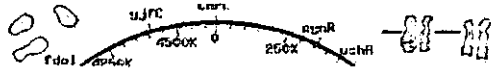


## 1.6 RESPUESTA INMUNE DE LA CÉLULA HUÉSPED

A pesar de que los estudios inmunológicos se han realizado con antígenos obtenidos de verrugas, su validez es limitada, se sabe que los mecanismos inmunes tanto humorales como celulares intervienen en la aparición y regresión de las verrugas. Debido a la pequeña cantidad de partículas virales presentes en las células queratinizadas y por tanto protegidas del sistema inmunológico del huésped, aquéllas sólo inducen una respuesta humoral leve y transitoria, principalmente de la fracción IgM. Los defectos en la inmunidad humoral por sí solos no desempeñan un papel importante en la historia natural de la infección por VPH, aunque la presencia de anticuerpos circulantes se asocia con inmunidad frente a las infecciones cutáneas y además la conversión de IgM a IgG específicas frecuentemente coincide con la regresión de las verrugas plantares.<sup>8,10,19.</sup>

El VPH induce una inmunidad celular mediada por células aunque de corta duración e insuficiente para prevenir la reinfección, si bien puede interferir con la infección viral persistente. Los pacientes con alteraciones en la inmunidad celular genéticas o adquiridas presentan un aumento de frecuencia de las lesiones asociadas a VPH, incluyendo cáncer, y cuando la inmunidad se recupera se ha observado regresión de las verrugas. En las infecciones de las mucosas la respuesta inmune mediada por células, especialmente los mediadores celulares y los macrófagos, desempeñan un papel importante de la respuesta del huésped.<sup>8,10,19.</sup>

Es probable que la inmunidad mediada por células (inmunidad celular) sea la que tenga un papel más importante en el control de las infecciones por VPH. Lo anterior se deduce de la alta incidencia de papilomas, verrugas y tumores epiteliales observados en pacientes que sufren de inmunodeficiencias congénitas o adquiridas. Así, una prioridad de la investigación sobre los VPH consiste en lograr un método para estimular la inmunidad celular específica contra el VPH.<sup>8,10,19.</sup>



## 1.7 FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo para adquirir una infección por VPH se debe principalmente a: traumatismos o laceraciones locales, promiscuidad sexual, tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, coitos a edades tempranas, disminución de la inmunidad celular de variadas etiologías (stress, SIDA, pacientes con transplantes, enfermedades crónicas); así como actividades que facilitan su adquisición (piscinas, baños de vapor, jacuzzi).<sup>7,9,56.</sup>

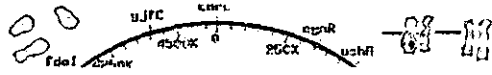
## 1.8 MODO DE TRANSMISIÓN

El hombre es el único reservorio de VPH, y éstos se transmiten principalmente por:

- Abrasiones de la piel
- Contacto sexual
- Prenatal
- Autoinoculación<sup>6,7.</sup>

### 1.8.1 ABRASIONES DE LA PIEL.

- La piel normal es relativamente resistente al ingreso y la infección ocurre más rápida y fácilmente cuando el virus entra en contacto con las mucosas o con piel traumatizada, (ocasionada por ejemplo al realizar alguna actividad como afeitarse, o intentar desprender con las uñas alguna verruga existente). Por ello los sitios más frecuentes de lesiones son las superficies cutáneas que habitualmente se lesionan como los dedos de las manos, las plantas de los pies, las rodillas, los codos, el pene, la vulva y el cuello uterino.<sup>6,7,56.</sup>



- Las verrugas en las plantas de los pies pueden ser resultado de las abrasiones producidas por la superficie de contacto en las piscinas.<sup>6,7.</sup>
- Las frecuentes verrugas en las manos y los dedos de las manos de los carniceros se deben a la inoculación de los virus en cortes que se producen en estos sitios.<sup>6,7,68.</sup>

### 1.8.2 CONTACTO SEXUAL.

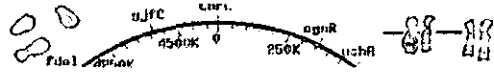
En la actualidad las verrugas constituyen la infección de transmisión sexual más común. El contacto oro-genital puede permitir infecciones de sitios orales a genitales o viceversa, la transmisión salival probablemente coadyuva de forma adicional a las infecciones en esta región.<sup>7,11,14,20,29,35,56.,68.</sup>

### 1.8.3 PRENATAL.

Se cree que la transmisión de la madre al hijo se produce durante el parto por el contacto directo del neonato con los virus en el área cervical o vaginal, usualmente se ubican en la laringe (cuerdas vocales) del bebé o en áreas genitales.<sup>6,7,10,35,68.</sup>

### 1.8.4 AUTOINOCULACIÓN.

Ocasionalmente las infecciones por VPH anogenitales también son transmitidas digitalmente de un sitio epitelial a otro. Pueden ser transmitidos por fomites, por instrumentos médicos y plumas láser contaminadas con el virus.<sup>6,7,20,35,56,68.</sup>

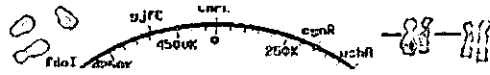


## 1.9 EPIDEMIOLOGÍA

Exceptuando el VPH del tipo 13 y 32, que infectan exclusivamente la cavidad oral, el tracto genital sirve de reservorio a todos los VPH que infectan las mucosas. Los datos de incidencia y prevalencia de las infecciones genitales son numerosos y difíciles de interpretar, ya que dependen de los métodos de diagnóstico empleados: casos clínicos, citología, detección de antígenos y técnicas de hibridación, así como de la poblaciones objeto de estudio. Pero aún así se considera la enfermedad de transmisión sexual (ETS) de gran incidencia mundial, la primera en el mundo entero, sobretudo en poblaciones sexualmente activas, preferentemente jóvenes, lo cual no excluye a edades extremas. Tan solo en Estados Unidos de América se estima que 20 millones de personas son infectados con VPH, y más de 5.5 millones de nuevas infecciones ocurren cada año. La infección cervical con tipos oncogénicos de VPH está asociado con más del 80% de los casos de cáncer invasivo cervical. Se estima que alrededor de 13,700 casos fueron diagnosticados con cáncer cervical invasivo en Los Estados Unidos de América en 1998, así mismo se estima que 4,800 mujeres americanas pueden morir por cáncer cervical. Mundialmente, el cáncer cervical es la segunda enfermedad más común entre las mujeres, pues más de 425,000 nuevos casos y 195,000 muertes ocurrieron en el año de 1997. <sup>4,7,12,14,24,26,36,56,68.</sup>

Actualmente en México y en el mundo entero la incidencia va de un 30 a un 90% en mujeres y hombres en edad sexualmente activa. En México se tienen estadísticas de que una mujer muere cada dos horas a causa de carcinoma cervical. <sup>4,7,12,14,24,26,36,56</sup>

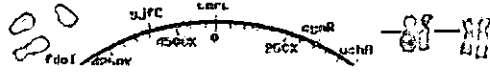




El papiloma y la verruga vulgar se presentan en el 2.5% de todas las patologías en boca. El papiloma puede ocurrir a cualquier edad, pero su incidencia es más alta en pacientes de la tercera y quinta década de la vida.<sup>2,29.</sup>

La denominación de verruga vulgar o hiperplasia epitelial papilar focal se emplea cuando se presenta sobre la piel, se encuentra comúnmente en las manos y dedos de los niños. Ocasionalmente se han reportado casos de verruga vulgar en la cavidad bucal especialmente en los labios, el paladar duro y la encías.<sup>2,29.</sup>

La hiperplasia epitelial focal se presenta principalmente en pacientes jóvenes de poblaciones específicas aisladas (indios nativos de América del Norte, Centroamérica y Brasil, pueblos nativos nórdicos y otros grupos de Europa y África) aunque también pueden presentarse en personas de edad avanzada.<sup>2,29.</sup> Estudios recientes llevados a cabo en Guatemala, por el Dr. Román Carlos (Facultad de Medicina de la Universidad Francisco Marroquí, de Guatemala), determinan que esta enfermedad afecta a la población pediátrica adolescente y prácticamente de forma exclusiva a los niños que viven en situaciones de pobreza extrema en el 80% de la población; de hecho en la literatura médica está bien documentado el hecho de que la desnutrición desencadena inmunosupresión celular en la persona y probablemente es un factor influyente.<sup>2,29,37.</sup>

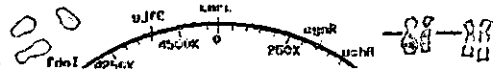


## 1.10 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por el VPH son muy variables y dependen del genotipo infectante, de la localización anatómica de la infección, y de factores dependientes del huésped, produciéndose lesiones hiperplásicas en piel y mucosas. La localización anatómica preferente de la infección es el epitelio escamoso cutáneo o mucoso. Las lesiones cutáneas son habitualmente benignas, con tendencia a la regresión espontánea, excepto en los pacientes en terapia inmunosupresora o con epidermodisplasia verruciforme. Las lesiones desde el punto de vista anatómico se expresan en 4 localizaciones: piel, mucosa oral; vías respiratorias y mucosa genital.<sup>10,14,20,38.</sup>

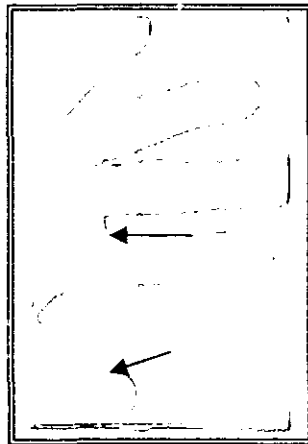
### 1.10.1 PIEL.

Las verrugas tienen un aspecto diferente en diversos sitios, son causadas por el VPH del tipo 1 al 4. El VPH del tipo 1 al 3 habitualmente se aísla de las verrugas de los pacientes de 5 a 15 años de edad, mientras que las verrugas causadas por el VPH-4 ocurren de forma predominante en los pacientes de 20 a 25 años.<sup>6,9,11,12.</sup>



**VERRUGAS COMUNES DE LAS MANOS.**

Son lesiones sobreelevadas firmes y carnosas con un límite evidente. Su tamaño varía de 1 a 10 mm de diámetro o más. La proliferación de papilomas dérmicos diferentes dentro de una lesión da como resultado un aspecto rugoso, como de coliflor. Se localizan principalmente en la zona periungular, en los dedos, y en el dorso de las manos. Son frecuentes en los sitios de piel lesionada y en los niños que tienen el hábito de morderse las uñas. La infección por el VPH-7 se asocia con el desarrollo de verrugas comunes en las manos de las personas que manipulan la carne. El curso natural de estas lesiones es la regresión espontánea.<sup>8,9,11,12,20,39.</sup>(Fig. 5)



**Fig. 5 VERRUGAS COMUNES EN LA MANO.** Las flechas indica el aspecto clínico y localización de estas lesiones.

### VERRUGAS PLANTARES.

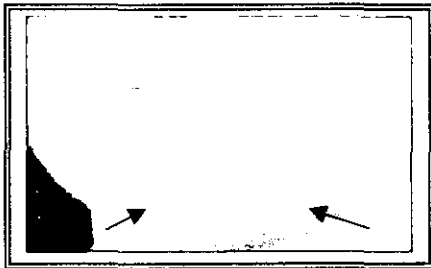
Tienden a estar situadas más profundamente y a ser más queratósicas que las que aparecen en las manos. Se encuentran sobretodo en el talón y planta del pie. Se cree que tanto las verrugas de las manos y de los pies tienen períodos de incubación prolongados, de entre 6 y 18 meses, el tipo VPH-1 es el principal agente etiológico. <sup>6,9,11,12.</sup> (Fig. 6)



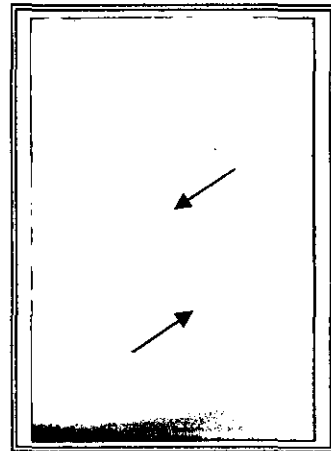
**Fig. 6 VERRUGAS PLANTARES.** Las flechas nos indican el aspecto queratósico de estas lesiones.

### VERRUGAS PLANAS.

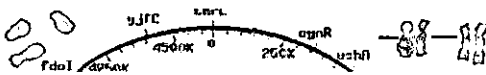
Son pequeñas, muy planas, lisas y más numerosas; las encontramos especialmente en la cara, rodillas, brazos de personas jóvenes. Se relacionan con los tipos 3 y 10 de VPH. <sup>6,9,11,12.</sup>(Fig. 7 y 8)



**Fig. 7 VERRUGAS PLANAS EN EL MENTÓN.** Las flechas indican el aspecto característico de múltiples verrugas planas.

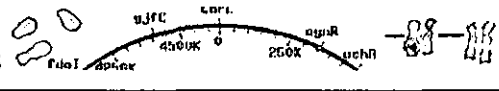


**Fig. 8 VERRUGAS PLANAS EN EL HOMBRO.** Las flechas indican otra localización clínica de este tipo de lesiones.



**EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME:**

Término que significa “cambios verrugosos del aspecto de la epidermis”. Es una enfermedad familiar que está ligada con un gen autosómico recesivo, se asocia con la depresión de la inmunidad mediada por células, lo cual puede contribuir a la persistencia de por vida de las lesiones verrugosas diseminadas. Se observa la conversión maligna de algunas de las lesiones verrugosas en particular de las asociadas con el VPH-5, en aproximadamente el 25% de los pacientes afectados. Las verrugas que se malignizan, suelen aparecer en las áreas expuestas a la luz del sol. Los tipos asociados del VPH son 5,8,9,12,14,15,17,19 a 25.<sup>6,9,11,12,40.</sup>

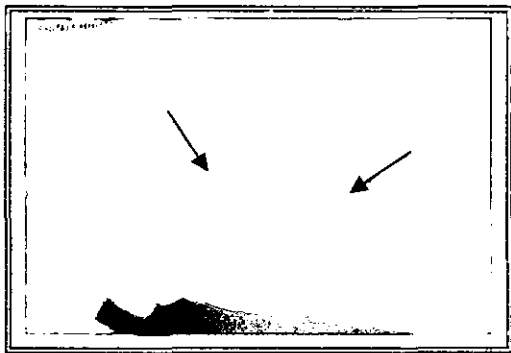


### 1.10.2 MUCOSA ORAL

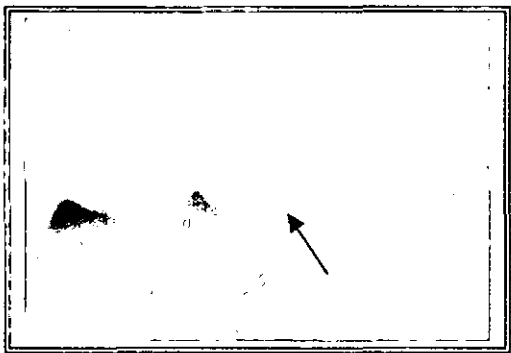
#### PAPILOMA PLANO

El papiloma plano es una de las neoplasias benignas más frecuentes del epitelio, se asocia al Síndrome de Goltz-Gorlin (hipoplasia dérmica focal), y también se encuentra asociado a los subtipos 6 y 11 del VPH.<sup>2,29,41,42,43.</sup>

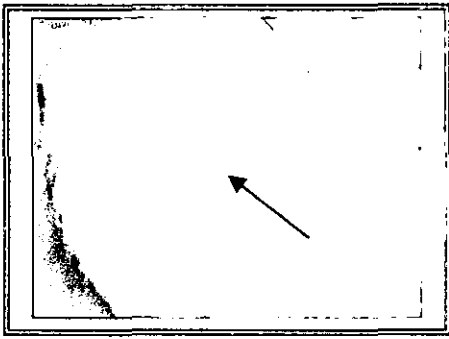
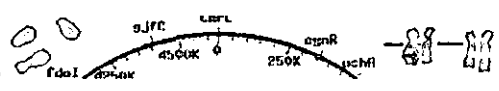
Clínicamente son solitarias y pequeñas de menos de 1 cm, aunque a veces pueden ser múltiples en pacientes jóvenes, puede ser sésil o pediculado, blanco (queratinizado) o rosado (no queratinizado). Las zonas anatómicas dentro de la cavidad bucal que son más susceptibles, son el paladar blando, los pilares del istmo de las fauces y áreas de la úvula con una incidencia del 33%, así como la encía, mucosa oral, superficie dorsal y ventral de la lengua.<sup>2,29,41,42,43.</sup> (Fig. 9,10,11 y 12).



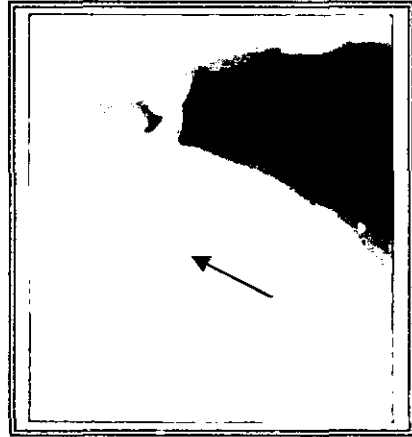
**Fig. 9 PAPILOMA EN ENCÍA INTERDENTARIA.** Las flechas muestran el aspecto clínico de la lesión: de color rosa y de base sésil.



**Fig. 10 PAPILOMA EN ARCO PALATOGLOSO.** La flecha indica una de las localizaciones más frecuentes de los papilomas bucales.



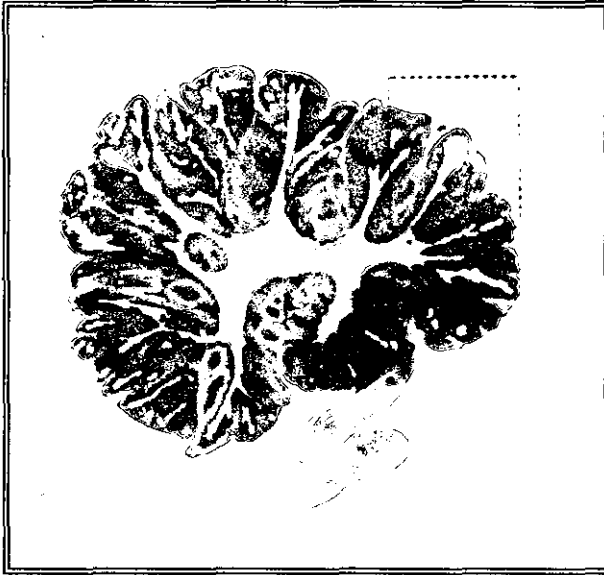
**Fig. 11 PAPILOMA EN EL DORSO DE LA LENGUA.** La flecha muestra otra de las localizaciones comunes de este tipo de lesión.



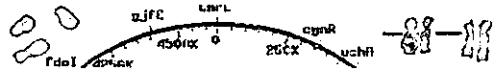
**Fig. 12 PAPILOMA EN LA SUPERFICIE VENTRAL DE LA LENGUA.** La flecha indica un papiloma solitario, blanco y de base sésil.

Histopatológicamente se caracteriza por una capa papilar gruesa de epitelio plano queratinizado o no queratinizado y un núcleo central de tejido conjuntivo fibrovascular. Las proyecciones papilares pueden ser largas, o cortas, redondeadas y romas. El epitelio presenta generalmente un patrón de maduración normal, aunque a veces se ha observado un grado leve de hiperplasia basal. En el epitelio, los coilocitos, (que son células del estrato espinoso superior que presentan núcleos aumentados de tamaño y citoplasma vacuolado claro), pueden ser evidentes o no.<sup>2,29,41,42,43</sup>(Fig. 13)





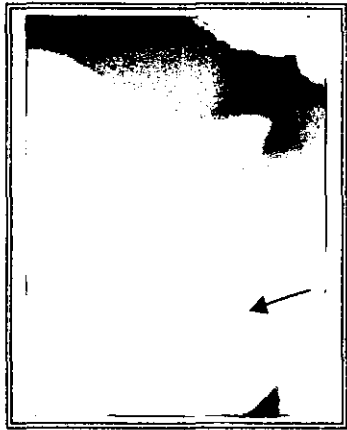
**Fig.13 PATRÓN HISTOLÓGICO DE UN PAPILOMA.** El recuadro punteado ilustra el aspecto microscópico de las proyecciones papilares formadas por el epitelio con paraqueratina engrosada y capas de células espinosas, y un núcleo central de tejido fibroso con estructuras vasculares aumentadas de tamaño.



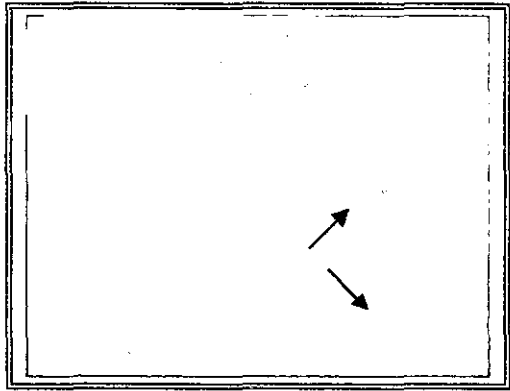
**VERRUGA VULGAR**

El estudio ultraestructural e inmunohistoquímico ha permitido su asociación a los subtipos 2,6 y 11 del VPH.<sup>2,20,39,43,45.</sup>

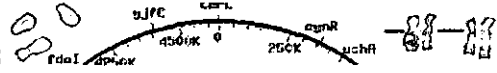
Clínicamente son pápulas o nódulo exofíticos, queratinizados y sésiles con superficies verrucosas (coliflor). Miden de 2 a 5 mm de diámetro, aunque pueden ser mayores; las bucales suelen ser blancas y las cutáneas de color marrón grisáceo, esta diferencia es debido al entorno húmedo de la boca en comparación con el entorno seco de la superficie cutánea.<sup>2,20,29,39,43,45,46.</sup> (Fig. 14 y 15)



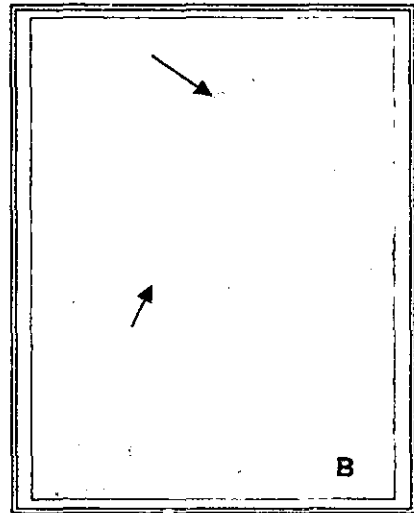
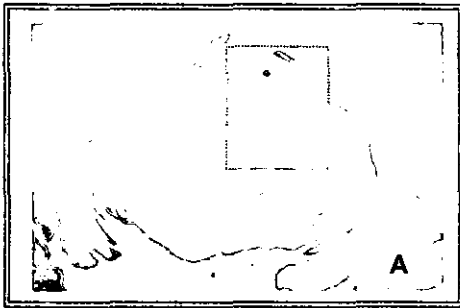
**Fig.14 VERRUGA VULGAR EN LA MUCOSA LABIAL INFERIOR.** La flecha indica el aspecto clínico de la lesión: blanca, solitaria, exofítica con un tallo y una superficie.



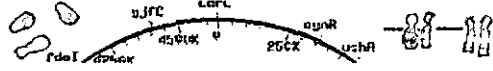
**Fig. 15 VERRUGA VULGAR EN MUCOSA BUCAL.** Las flechas indican el aspecto clínico de dos verrugas bucales: blancas y exofíticas.



Histopatológicamente están constituidas por proliferaciones epiteliales papilares que contienen múltiples proyecciones digitiformes que presentan hiperqueratosis y una amplia capa de células granulosas. Presentan un número variable de células epiteliales superficiales con núcleos retraídos y aclaramiento perinuclear (colocitosis), lo que indica infección por VPH. El tejido conjuntivo presenta espacios vasculares dilatados y cantidades variables de células de la inflamación crónica.<sup>2,29,39,43,46</sup> (Fig. 16)



**FIG. 16 PATRÓN HISTOLÓGICO DE UNA VERRUGA VULGAR.** A) El recuadro punteado indica una amplia producción de queratina, acantosis y crestas epiteliales orientadas radialmente. B) En esta imagen las flechas indican una gran cantidad de células epiteliales vacuoladas y cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos.

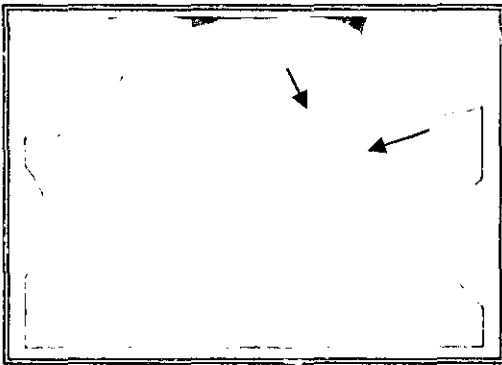


### HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL

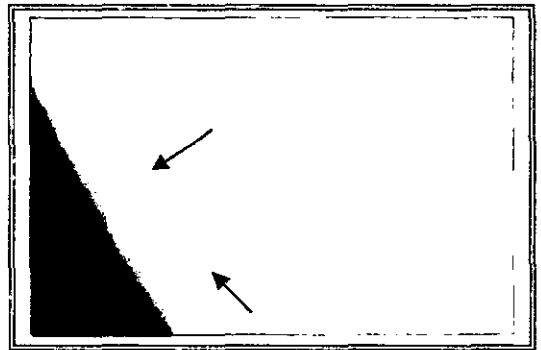
En 1961, John W. Heck fue el primero en describir esta lesión en la mucosa oral de una niña india de Navajo de 11 años. Hasta 1965 el término de hiperplasia epitelial focal fue introducido dentro de la literatura odontológica.<sup>3,47,48,49.</sup>

Existen, probablemente factores de fricción y de trauma involucrados en la patogénesis de la entidad, así como las deficiencias vitamínicas que se proponen como causa de este trastorno al igual que la presencia de los subtipos 13 y 32 del VPH.<sup>2,29,43,50,51.</sup>

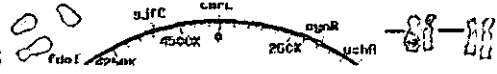
Clinicamente se presenta como una enfermedad papulonodular, en la mayoría de los casos son múltiples, sésiles y pueden ser de color rosa o blanco; afectan la mucosa bucal, labial, y los rebordes laterales de la lengua; en la mucosa bucal sigue un patrón a través de la línea de oclusión. Es significativo que los rebordes laterales de la lengua se vean más afectados que otras áreas, al igual que los labios, particularmente el inferior.<sup>2,10,29,39,43,50,51.</sup> (Fig. 17 y 18)



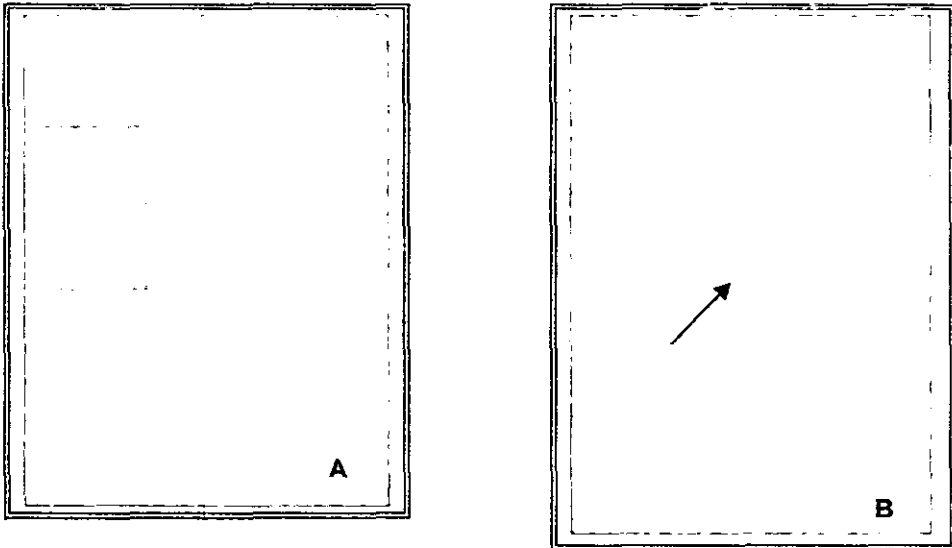
**Fig. 17 HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL EN MUCOSA LABIAL SUPERIOR.** Las flechas indican el aspecto clínico de múltiples lesiones: de color rosa y base sésil.



**Fig. 18 HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL EN LA MUCOSA LABIAL INFERIOR.** Las flechas indican la localización más común de este tipo de lesiones.



Histopatológicamente su superficie se caracteriza por capas engrosadas de paraqueratina y acantosis extensa. Las células epiteliales del estrato espinoso superior presentan núcleos aumentados de tamaño y citoplasma vacuolado claro (coilocitos) que indican infección por el VPH; también se ha notado que algunas de estas células sufren degeneración nuclear, y parece que estuvieran presentando mitosis, por lo que se les denomina células mitosoides. El tejido conjuntivo suele estar bien vascularizado, y presenta un infiltrado variable de linfocitos.<sup>2,10,29,39,43,50,51</sup> (Fig. 19)



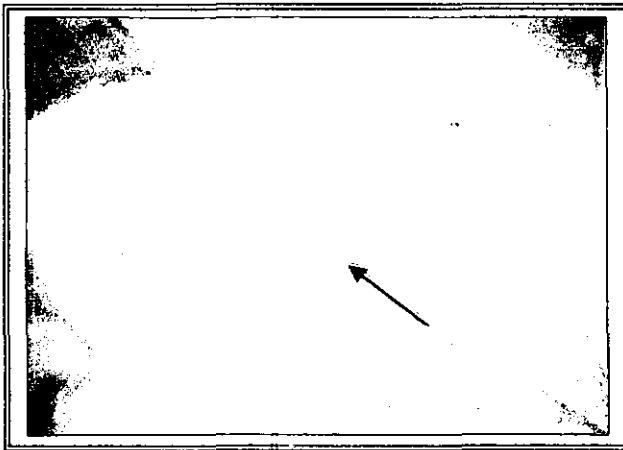
**Fig. 19 PATRÓN HISTOLÓGICO DE LA HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL.**  
 A) El recuadro punteado ilustra algunas de las características histológicas, tales como paraqueratosis, acantosis y la degeneración nuclear tipo mitosis. B) La flecha señala la característica más común de este tipo de lesiones, es decir, células mitosoides.

### 1.10.3 VIAS RESPIRATORIAS

El papiloma es el tumor más frecuente de la laringe. Hay dos tipos importantes de papiloma, la forma juvenil y la forma adulta.<sup>52,53.</sup>

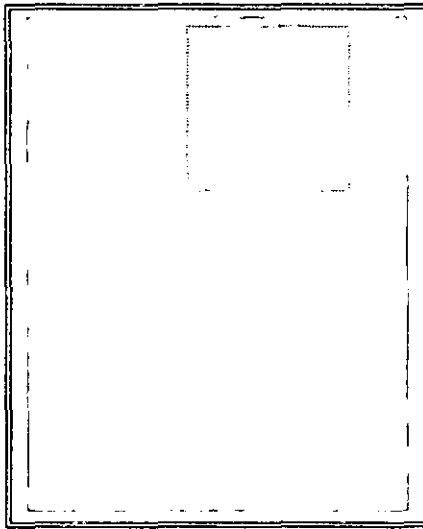
El papiloma juvenil ocurre en los primeros años de la vida, menos de 5 años de edad, y generalmente desaparece durante la pubertad. Ambos sexos son igualmente afectados. La lesión es frecuentemente múltiple y está ampliamente distribuida sobre toda la superficie mucosa de la laringe, se transmite de un área mucosa a otra y de una persona a otra, esto sugiere la incidencia del papiloma juvenil en hijos de madres con condiloma acuminado.<sup>52,53.</sup>

Clínicamente son suaves, lobuladas y de color rosa pálido, miden aproximadamente de 2 a 5 mm de diámetro, son móviles.<sup>52,53.</sup> (Fig. 20)

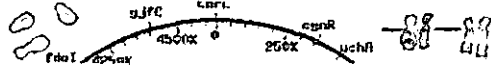


**Fig. 20 PAPILOMA LARÍNGEO JUVENIL.** La flecha indica un papiloma laríngeo encontrado en una niña de 3 años de edad, el aspecto es lobulado y color rosa pálido.

Histopatológicamente hay ausencia o poca producción de queratina, ausencia de invasión al estroma y un pequeño grado de atipia celular. Tienen a recurrir rápidamente.<sup>52,53</sup> (Fig. 21)



**Fig. 21 PATRÓN HISTOLÓGICO DE UN PAPILOMA LARÍNGEO.** El recuadro punteado ilustra las características histológicas de esta lesión que son múltiples y frondosas proyecciones papilares del epitelio escamoso que contiene núcleos fibrovasculares y no se observa queratinización de la superficie.



El papiloma del adulto es la lesión neoplásica benigna más frecuente, pues se presenta en un 90%, y existe una mayor predilección por el género masculino. Aparece una lesión verrucosa solitaria opaca y bien definida, preferentemente sobre las cuerdas vocales, aunque también se puede encontrar sobre el piso de el ventrículo y el espacio supraglótico. Además de su asociación etiológica con el VPH, ciertos agentes químicos como el tabaco y el estrés son considerados como probables factores etiológicos. En contraste con el papiloma juvenil siempre hay producción intensa de queratina y la recurrencia de esta lesión es menos frecuente.<sup>52,53.</sup>

Pueden llevar a la alteración progresiva de la función laríngea a menos que sean tratadas. La ronquera es la molestia habitual, aparecen dificultad respiratoria y neumonías bacterianas secundarias en los niños e implican la presencia de lesiones obstructivas en el árbol bronquial. Los tipos asociados son VPH 6 y 11, lo cual sugiere que el desarrollo de estos papilomas ocurre después de la transmisión del virus, durante el parto, de las madres con condilomas acuminados a sus hijos.<sup>11,34,46.</sup>

La transmisión orogenital también es posible de acuerdo a la mayor incidencia de estos tipos de verrugas en los hombres homosexuales.<sup>6,9,11,12,34,46,51.</sup>

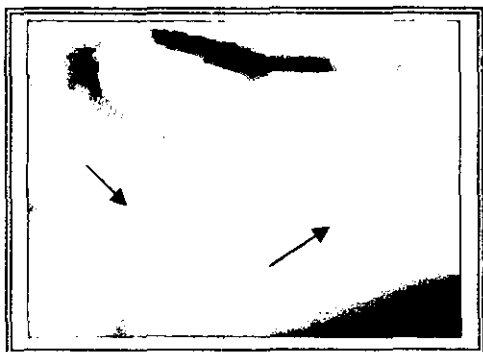


### 1.10.4 MUCOSA GENITAL

#### CONDILOMA ACUMINADO

Denominado también como verruga genital o venérea, se presenta con mayor frecuencia en los órganos genitales; sin embargo, las lesiones orales son frecuentes. Las lesiones son causadas por el VPH 6 y 11. Aunque muchas lesiones orales se adquieren a través del contacto sexual orogenital, algunos casos se transmiten por contacto no sexual o por autoinoculación a partir de las lesiones genitales. Las lesiones orales en niños pequeños pueden ser especialmente problemáticas, porque puede tratarse de un caso de abuso sexual.

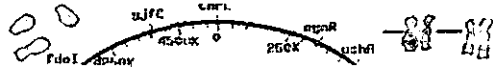
Clínicamente son pápulas o placas sésiles solitarias o múltiples, de color rosa, con una superficie en empedrado o como lesiones papilares pediculadas. Las lesiones orales se presentan predominantemente sobre la mucosa no queratinizada de los labios, el piso de boca, las superficies lateral y ventral de la lengua, la mucosa vestibular y el paladar blando. Se presentan incluso lesiones gingivales; sin embargo, son raras.<sup>10,20,29</sup> (Fig. 22 y 23)



**Fig. 22 MÚLTIPLES CONDILOMAS EN LA MUCOSA LABIAL INFERIOR**  
Las flechas indican múltiples condilomas de base sésil y con superficie en empedrado.



**Fig. 23 CONDILOMA EN LA EN COMISURA LABIAL.** Las flechas indican lesiones papilares presentes en la comisura labial izquierda.

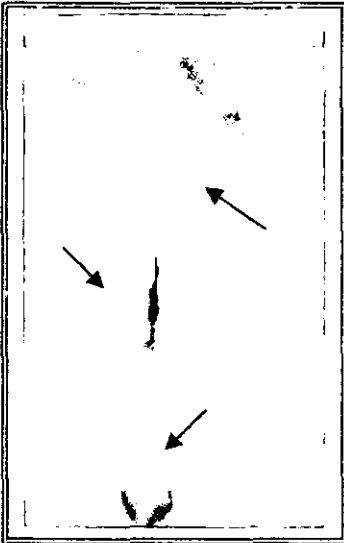


Histopatológicamente se caracterizan por una proliferación epitelial que presenta superficies anchas, romas y redondeadas. El epitelio puede ser no queratinizado o paraqueratinizado. También presentan un grado intenso de acantosis y / o hiperplasia pseudoepiteliomatosa con un grado entre moderado e intenso de hiperplasia basal. El estrato espinoso del epitelio es generalmente hipercelular con un grado variable de pleomorfismo nuclear, así como la presencia de un número variable de células espinosas superficiales que muestran núcleos retraídos con zonas claras perinucleares (coilocitos) que indican infección por VPH. El tejido conjuntivo suele estar edematoso, mostrando espacios vasculares prominentes y un grado variable de inflamación crónica.<sup>6,8,46,54</sup> (Fig. 24)



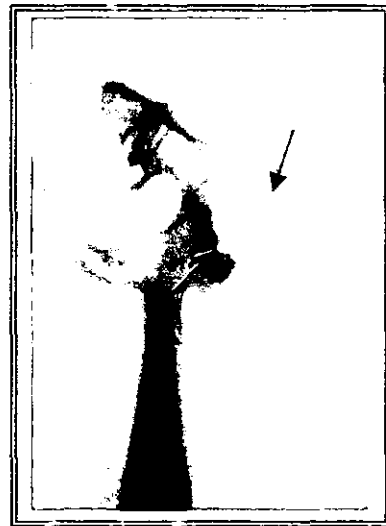
**Fig. 24 PATRÓN HISTOLÓGICO DE UN CONDILOMA ACUMINADO.**  
 A) El recuadro ilustra algunas de las características histológicas de esta lesión, como abundante hiperplasia epitelial con acantosis. B) Las flechas indican parte del estrato de células espinosas, las células se observan claras con núcleos retraídos y zonas perinucleares claras (coilocitos).

Las verrugas anogenitales pueden ser planas o estar sobreelevadas; por lo general las que se presentan en la mucosa genital se caracterizan por ser lesiones exofíticas en cresta de gallo, miden de 1 a 3 mm de diámetro y cada papula termina en digitaciones papiliformes rosadas, que se tiñen de blanco con la prueba del ácido acético del 3 al 5%. En las zonas no mucosas (piel libre del pene, escroto, piel de pubis, zona inguino-escrotal) los condilomas son más queratósicos y por ende más duros y usualmente hiperpigmentados, por lo que se les denomina condilomas espiculados. Las verrugas del cuello uterino en general son planas y suelen ser pasadas por alto durante los exámenes casuales con espéculo. Las verrugas cervicales tienen un período de incubación de sólo 2 a 6 meses después del contacto sexual. Constituyen una preocupación especial porque más del 80% de todos los carcinomas cervicales, locales o invasores contienen ADN de papilomavirus 16 y 18.<sup>6,9,46,54</sup> (Fig. 25)



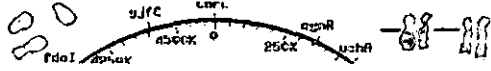
**Fig. 25 CONDILOMA ACUMINADO EXTENSO EN REGIÓN VULVAR.**

Las flechas indican condilomas gigantes en la región vulvar, así como en el ano.



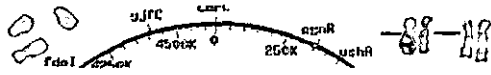
**FIG. 26 CONDILOMA ACUMINADO EN PREPUCIO.**

Las flechas indican múltiples condilomas en el pene.



## 1.11 PATRÓN HISTOLÓGICO DE LAS LESIONES

El patrón histológico está perfectamente definido en las lesiones típicas; en cambio no lo está para las infecciones subclínicas y latentes. Los cambios histopatológicos de las lesiones asociadas con el VPH son consecuencia del efecto citopático de los virus sobre el epitelio escamoso en los estadios de diferenciación. En las lesiones benignas o hiperplásicas, se considera patognomónico en las células superficiales y de la capa granular la presencia de vacuolización degenerativa citoplasmática (coilocitosis) y la proliferación de células afiladas (acantosis), que se suelen acompañar de alteraciones nucleares degenerativas (arrugamiento, picnosis y binucleación e hiperqueratosis). En las lesiones exofíticas, la acantosis e hiperqueratosis determinan la expansión de la superficie en proyecciones papilares, de aquí la denominación de "papilomas". En las lesiones planas y la displasia cervical no suelen existir superficies papilares. En las lesiones precancerosas y malignas las alteraciones displásicas aparecen en las células basales y parabasales, que proliferan y muestran grados variables de atipia nuclear, no siendo frecuente la aparición de coilocitos en las fases avanzadas de la lesión.<sup>9,14,20,45.</sup>



## 1.12 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La ausencia de líneas celulares que permitan el crecimiento del VPH y la presencia de un antígeno común determinan que los métodos tradicionales de diagnóstico virológico, como son el aislamiento y la detección de anticuerpos, no sean útiles en el diagnóstico de estas infecciones.<sup>14,56.</sup>

### 1.12.1 CLÍNICO

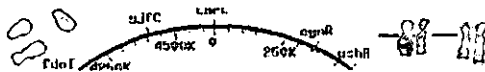
#### 1.12.1.1 COLPOSCOPIA

Combinada con la aplicación de ácido acético del 3 al 5% permite el diagnóstico de las infecciones subclínicas, y ofrece como ventajas la observación de una mayor superficie del epitelio y la obtención dirigida de la biopsia. Aunque las lesiones cervicales puestas de manifiesto con ácido acético contienen ADN del VPH, otras lesiones extracervicales pueden no contenerlo; además, por la apariencia de la lesión no se puede identificar el tipo de VPH.<sup>7,12,14,56,57.</sup>

### 1.12.2 LABORATORIO

#### 1.12.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

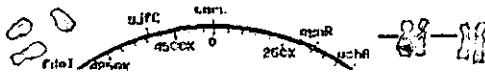
Es un método específico, con una sensibilidad del 10 al 50% para la detección del VPH en condilomas acuminados, planos y displasias, y poco útil para el diagnóstico rutinario. No permite detectar las infecciones latentes ni aquellas en las que el genoma viral se encuentra integrado en el cromosoma celular, ni provee de información en relación al tipo infectante. Sólo se encuentran viriones en el núcleo de los coilocitos y en células disqueratóticas. Se le considera un método laborioso que requiere demasiado tiempo para su realización.<sup>10,14,20.</sup>



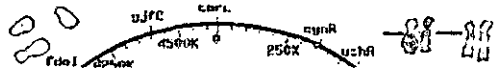
## 1.12 .2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico se basaba en técnicas citológicas e histológicas combinadas con métodos inmunohistoquímicos que utilizan anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos frente al antígeno común unido a distintos marcadores. Se dispone comercialmente de antisueros obtenidos a partir de viriones de papilomavirus de bovino y de verrugas plantares cuyos anticuerpos reaccionan con todos los tipos de VPH. El marcaje de estos anticuerpos con peroxidasa y /o estreptavidina-biotina permite la detección de antígenos del VPH en muestras clínicas, pero presentan inconvenientes:

1. El diagnóstico histológico está perfectamente definido en las lesiones típicas que se caracterizan por la presencia de coilocitos, disqueratosis, hiperplasia de células basales y discreta atipia nuclear. El patrón histológico, en cambio, no está definido para las infecciones subclínicas y latentes.
2. Son anticuerpos dirigidos frente al antígeno común de los VPH, no permitiendo la identificación de tipo. En las neoplasias cervicales poco avanzadas pueden estar presentes más de un tipo de VPH, y cada uno puede asociarse con diferentes enfermedades.



3. Poseen una sensibilidad que varía entre el 30 y el 50% (Tabla 7) en condilomas acuminados y neoplasias intraepiteliales cervicales, siendo aún más baja en el caso de la neoplasia intraepitelial de grado III. El examen citológico rutinario de cérvix no es el método más adecuado para el diagnóstico, ya que en el 10 al 15% de mujeres con citología y colposcopia normales se detectan secuencias de ADN de VPH.
4. El porcentaje de muestras positivas disminuye al aumentar la gravedad de la enfermedad de displasia moderada a carcinoma in situ y carcinoma invasivo.
5. Se pueden obtener resultados falsos negativos de lesiones con infecciones no permisivas en donde las proteínas estructurales del virus no sean expresadas, aunque el ADN viral persista.
6. Los anticuerpos sólo tiñen las células que expresan las proteínas tardías (L1 y L2), sin que se detecten la infecciones latentes.<sup>5,10,14,20,45,58.</sup>

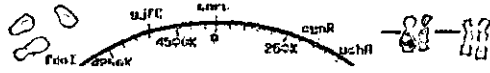


### 1.12.2.3 HIBRIDACIÓN "IN SITU"

El rápido desarrollo de las técnicas de Biología Molecular han revolucionado la investigación de los papilomavirus así como también el diagnóstico de las infecciones por VPH. Consecuentemente, una gran variedad de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos se encuentran a nuestro alcance para la identificación y tipificación de las infecciones por VPH. Estas técnicas requieren de aislar el ADN de los especímenes tales como: Southern blot, dot blot, reverse blot y sándwich hibridization, las cuales pueden ser realizadas tanto para tejidos fijados en formol/embebidos en parafina, como para raspados y citologías exfoliativas. Son técnicas altamente sensibles y específicas, permiten detectar la mayoría de las infecciones y son junto con la PCR los métodos de identificar los distintos tipos de VPH (Tabla 7). Todas las metodologías que emplean el proceso de hibridación de ácidos nucleicos comprenden básicamente el uso de un fragmento de ADN de una sola cadena marcado específicamente in vitro (la sonda), la cual reacciona y se une con su cadena de ADN complementaria. Los híbridos son visualizados utilizando métodos de detección que reconocen específicamente la marca de dicha "sonda" de ADN. Con ella es posible detectar secuencias de ácidos nucleicos en el interior de las células, en compartimientos subcelulares tales como mitocondria, cloroplasto, núcleo y nucleolo.<sup>5,10,14,31,45,46,54,60.</sup>

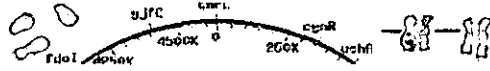






### 1.12.2.5 DOT BLOT

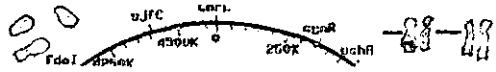
El método dot blot es menos sensible (1 copia/ célula), pero es rápido, relativamente asequible y aplicable a un gran número de muestras; se emplea para el despistaje de biopsias y células de descamación. Su lectura no es muy clara y tiene tendencia a producir falsos positivos (Tabla 7). El método de dot-blot es el técnica más simple que los otros métodos. Involucra la carga directamente de un espécimen de ADN de alícuota en nitrocelulosa hibridizando con la sonda para VPH. Hay dos equipos comerciales para el método de dot-blot; un sistema de hibridación utiliza ADN-ADN y el otro un ARN-ARN. De hecho, la segunda técnica se realiza igual que la hibridación de ADN-ADN pero obtenemos un resultado más claro, ya que es posible usar ARNasa que es una enzima que degrada las bandas simples de ARN para digerir los sitios no específicos. El ARN, sin embargo, es más sensible a la degradación in vitro. De nuevo, esta técnica es mucho menos sensible que PCR y está limitado por el número de genomas incluidos en el equipo comercial.<sup>12,14,35.</sup>



### 1.12.2.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

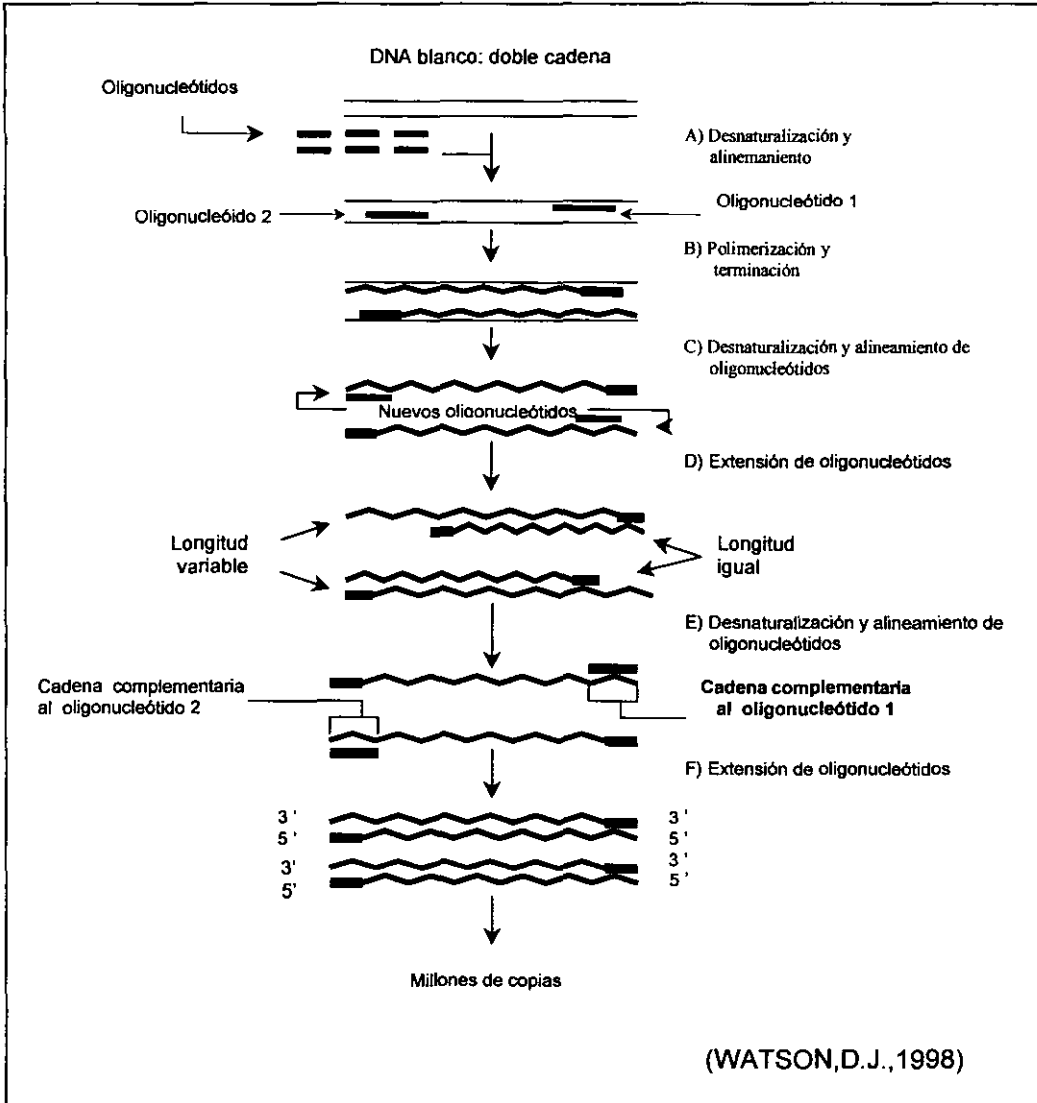
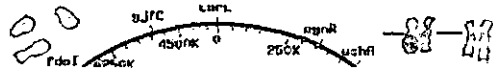
La técnica más recientemente descrita es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que como la hibridación "in situ", puede realizarse en cortes de tejidos y permite estudios retrospectivos. Su extremada sensibilidad permite detectar hasta 1 copia /  $10^5$  células (Tabla 7), y su aplicación para la detección de secuencias de ADN de VPH-16 en raspados cervicales ha demostrado la presencia de VPH-16 en el 84% de mujeres sanas. La reacción en cadena de la polimerasa es una síntesis enzimática para amplificar secuencias de ADN específicas; simula la replicación natural del ADN; es un proceso químico "in vitro". Se pueden producir alrededor de 100 billones de copias de una molécula de ADN en unas cuantas horas. Consta de varios ciclos en los cuales tres pasos son repetidos en el mismo orden para cada ciclo. Los pasos son desnaturalización, reconocimiento de los "primers" y extensión de los "primers" o cebadores.<sup>9,12,14,31,35.</sup>

El principio de la PCR es sencillo, consiste en copiar hasta mil millones de veces, en un tubo de polipropileno de 200 $\mu$ l, un fragmento de genoma que se desea estudiar. Los fragmentos de ADN contienen dos hebras enlazadas en doble hélice, cada hebra está constituida por nucleótidos (A, T, C, G, ). Las secuencias de ambas hebras son complementarias pues frente a una A en una hebra se encuentra siempre una T en otra hebra; frente a una C una G, están emparejadas por enlaces energéticamente débiles. Cuando se rompen los enlaces, las dos hebras son capaces de reasociarse reproduciendo el emparejamiento inicial. Esta propiedad de emparejamiento específico es aprovechada por la PCR.

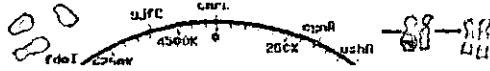


Esta técnica se basa en la acción de una enzima, el ADN polimerasa, capaz de copiar tomando como modelo una de las hebras, una nueva hebra formada por nucleótidos complementarios. La estrategia consiste en hacer funcionar la polimerasa a partir de un pequeño fragmento de ADN complementario del extremo de la región a ampliar, que quede fijado y sirva de cebador. Cada ciclo de amplificación pasa por tres etapas:

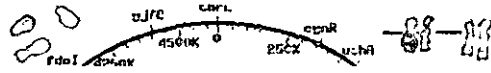
1. Separación de las hebras.- La doble hélice de la hebra se calienta a  $94^{\circ}\text{C}$ , lo que permite romper los enlaces entre las dos hebras.
2. Emparejamiento de los cebadores.- La temperatura se disminuye a los  $50^{\circ}\text{C}$  en presencia de los cebadores, entonces éstos se emparejan específicamente en los extremos de la región a ampliar, cada uno con su hebra.
3. Extensión.- La temperatura se eleva a  $72^{\circ}\text{C}$ ; la polimerasa alarga las nuevas hebras de ADN a partir de los cebadores, uniéndolo nucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).<sup>9,12,14,31,35,61</sup> (Fig. 27)



**Fig. 27 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.** A) La doble hélice de ADN se calienta a 94 °C, lo que permite romper los enlaces entre las dos hebras. B) La temperatura se disminuye hasta 50°C en presencia de los cebadores. C) Los cuales se emparejan específicamente en los extremos de la región a ampliar, cada uno en su hebra. D) La temperatura se eleva a 72°C, la polimerasa copia las nuevas hebras de ADN a partir de los cebadores uniendo nucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). E) Estas operaciones constituyen un ciclo de ampliación, se dispone entonces de dos nuevas copias del fragmento. F) Estas nuevas hebras servirán a su vez de matrices para la polimerasa y de este modo se obtienen 2<sup>n</sup> fragmentos después de n ciclos.



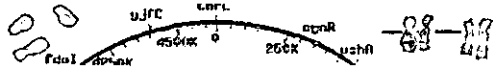
Estas operaciones constituyen un ciclo de ampliación; se dispone entonces de dos nuevas copias del fragmento. En el ciclo de ampliación siguiente, que pasa por las mismas tres etapas, las nuevas hebras servirán, de matrices para la polimerasa. De este modo, se obtienen  $2^n$  fragmentos después de  $n$  ciclos. Para que se lleve a cabo la PCR se requiere de una enzima resistente al calor, la Taq polimerasa, (aislada a partir de bacterias que viven en manantiales calientes), y contar con un regulador de temperatura programable para cada una de las tres etapas del procedimiento. Se efectúan de 30 a 40 ciclos. La principal ventaja de la PCR sobre otras técnicas es su excepcional sensibilidad. No es rigurosamente necesario purificar las muestras antes de ser sujetas a la PCR y los especímenes pueden ser viejos o degradados, mientras la secuencia no se encuentre rota en la región de interés. Así mismo los especímenes pueden estar preservados en formalina o pueden ser seccionados de parafina lo que da oportunidad a material histopatológico para investigación posterior. La PCR puede ser utilizada para aislar y analizar fragmentos de ADN, analizar interacciones entre proteínas y ADN, manipulación de terapia genética y conocer secuencias de ARN y ADN. Se ha podido identificar VPH en la piel y lesiones de mucosa, lesiones orales y en genitales. También se ha utilizado para confirmar la presencia de otros agentes infecciosos en tejidos humanos como VIH, Hepatitis B, Citomegalovirus, Epstein-Barr, Herpes simple en los leucocitos de la circulación. Por lo que en un futuro se espera emplearlo como un marcador molecular específico para ciertos tumores malignos y también como un monitor para la presencia de células neoplásicas durante la terapia anticáncer. La PCR relacionado con VPH será de gran importancia para determinar la presencia del virus en lesiones orales premalignas como en regiones adyacentes de la mucosa normal y éstas puedan ser relacionadas con infecciones latentes o progresión a malignidad. La única desventaja que presenta esta técnica es que se pueden obtener resultados falsos positivos debido a la contaminación o por el uso inadecuado de los "primers", por ello se recomienda que sea realizado por expertos y que sea interpretada con mucha precaución.<sup>61,63,64,65,66,67.</sup>



**Tabla 7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR EL VPH**

Métodos	Sensibilidad	Identificación del grupo	Infección latente	Complejidad técnica.
Inmunohistoquímica.	20-50% 100 copias por célula.	NO	NO	NO
Microscopía electrónica	10-50%	NO	NO	Sí
Métodos de hibridación				
Southern blot	0,1 copias/células	Sí	Sí	Sí
Dot blot	1 copia/célula	Sí	Sí	No
Hibridación "in situ"	5-800 copias /célula	Sí	Sí	No
Reacción en cadena de la polimerasa	1 copia /10 <sup>5</sup> célula	Sí	Sí	Sí

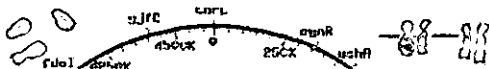
(Aznar, J 1990; Chang, F 1991; Mc Cance, D 1994; Miller, C 1996)



### 1.13 PREVENCIÓN

No existe ninguna forma de prevenir las infecciones por los virus de las verrugas excepto evitar el contacto con las superficies infectadas de otras personas. El uso de preservativos puede prevenir la transmisión de los virus hacia el cuerpo del pene o a partir de él. Las verrugas laríngeas en los neonatos pueden evitarse si las mujeres infectadas son tratadas de forma agresiva antes del parto. Algunos médicos han sugerido el parto por cesárea en el caso de las mujeres embarazadas con verrugas genitales, pero en la mayor parte de los casos los riesgos de la cirugía ciertamente superan los beneficios. Considerando la fuerte asociación entre las verrugas genitales y el cáncer cervical, una medida muy importante consiste en practicar el examen regular del cuello uterino, el papanicolaou y la inspección visual del cérvix (la coloscopia). La "pincelación" del cuello uterino y otras lesiones mucosas sospechosas con ácido acético al 3% los blanquea, lo que facilita su visualización. Luego puede efectuarse la biopsia de las lesiones sospechosas para detectar los cambios precancerosos a tiempo para poder efectuar el tratamiento efectivo. <sup>6,7,14,26.</sup>





## 1.14 TRATAMIENTO

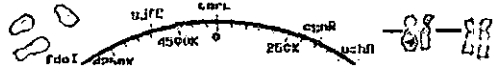
Alrededor del 50% de las verrugas comunes remiten de forma espontánea en 1 a 2 años, pero en las verrugas anogenitales esto es más improbable. A menudo se considera el tratamiento de las verrugas por motivos estéticos, control del dolor, hemorragias y la alteración de la función laríngea o la preocupación en cuanto a la transmisión sexual.<sup>6,26,56,68.</sup>

Ninguna de las alternativas terapéuticas hasta la fecha ha demostrado una gran superioridad, por lo que el clínico es el que debe elegir cuál es la más adecuada en función de la presentación clínica de las lesiones. Las terapéuticas disponibles podemos agruparlas en tres categorías: citotóxicas, destructivas e inmunológicas.<sup>7,12,14,56,57,68.</sup>

### 1.14.1 CITOTÓXICAS

La solución de podofilina al 20% es el tratamiento citotóxico más empleado en las verrugas genitales. Su lenta respuesta, alta frecuencia de recidivas y los efectos secundarios locales limitan su uso. Además, no está libre de toxicidad sistémica y teratogénica, estando contraindicada en los condilomas cervicales e intrauretrales y en el embarazo. Podría ser el tratamiento de elección en los condilomas vaginales, así como en la profilaxis de las recidivas de los extirpados por métodos quirúrgicos. La solución etanólica de podofilotoxina al 0.5% está ofreciendo buenos resultados y pudiera ser una alternativa.

El ácido tricloracético sólo es efectivo frente a pequeños condilomas encontrados tanto en superficies mucosas como queratósicas; y es frecuente la aparición del dolor y úlceras con gran cicatrización. Es muy útil para tratamientos a largo plazo.



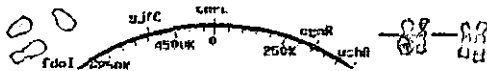
La aplicación tópica de 5-fluorouracilo está indicada en el tratamiento de condilomas resistentes y vulvares extensos, y podría ser de elección en los condilomas vaginales y para la prevención de recidivas de condilomas extirpados quirúrgicamente. Es más útil en lesiones planas que en lesiones espiculadas e hiperqueratósicas (lesiones duras).

El inductor de interferón (Imiquimod-Adara) es una crema que el mismo paciente se puede aplicar, es muy útil en condilomas acuminados recurrentes, donde no han tenido éxito otras alternativas o donde el paciente no puede acudir regularmente al consultorio del urólogo. No debe ser aplicada en mujeres embarazadas. De producirse erosiones se deberá suspender el tratamiento.<sup>7,9,12,14,17,56,57,68.</sup>

#### 1.14.2 QUIRÚRGICAS, ABLATIVOS O EXTIRPATIVOS.

Los métodos quirúrgicos, el curetaje y la electrocoagulación tienen una tasa variable de éxito, estando reservados para las lesiones orales y las anogenitales refractarias a otros tratamientos. Por ello este tratamiento se ofrece a aquellos que piden la eliminación inmediata de las verrugas; para los que tienen lesiones muy queratinizadas (donde hay mayor probabilidad de recurrencia); aquellos pacientes que regresan luego de tratamientos tópicos con recurrencias, en ocasiones más intensas que cuando se trataron la primera vez; pacientes con enfermedad rugosa masiva, a los cuales se les quiere dar un tratamiento que disminuya sustancialmente el volumen global de la infección.

La crioterapia es el método más asequible para el tratamiento ambulatorio de las verrugas anogenitales y es el de elección en los condilomas cervicales. Se aplica nitrógeno líquido en la verruga, lo que producirá un infarto hemorrágico, así como hialinización vascular con necrosis celular.



Electrofulguración o electrocoagulación, es la destrucción de tejidos a través de la coagulación celular por el calor generado por corriente de alta frecuencia. Se debe emplear anestesia local.

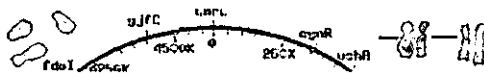
El tratamiento con láser de CO<sub>2</sub> puede obtener éxitos del 85 al 95%, y es la terapéutica idónea en las embarazadas y en los condilomas extensos y resistentes a otros tratamientos. La recidiva en los condilomas anorrectales es más frecuente con este tratamiento.<sup>7,9,12,57,68.</sup>

### 1.14.3 INMUNOLÓGICAS

La administración intralesional (interferon local) y parenteral (interferón sistémico) de los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  se han empleado con éxito en los condilomas acuminados recalcitrantes. No siempre es eficaz su empleo aislado, por lo que se precisa su combinación con terapias médicas y quirúrgicas convencionales. La aplicación tópica de interferón no mejora el pronóstico a largo plazo en condilomas anogenitales. La vía parenteral es de elección en la enfermedad diseminada, sin que existan diferencias en los resultados obtenidos en relación con la dosis utilizada, aunque con dosis altas los pacientes mejoran rápidamente y la curación parece ser más duradera. En pacientes con epidermodisplasia verruciforme, el interferón sistémico reduce un 50% las lesiones y, aunque parecía tener cierto grado de eficacia en el tratamiento de la papilomatosis respiratoria, recientemente se ha demostrado que ni es curativo ni se puede considerar una terapéutica coadyuvante a largo plazo en el tratamiento de este proceso.<sup>7,9,12,57,68.</sup>

#### 1.14.3.1 VACUNA PARA VPH

En la actualidad se están considerando tanto las partículas virales vacías como las proteínas estructurales aisladas (L1/L2) para una vacuna profiláctica. Hasta la fecha se ha demostrado que partículas sintéticas (L1/L2) pueden ser obtenidas en sistemas de vectores recombinantes (virus de vaccina). El empleo de tales construcciones está permitiendo lograr la inducción de una respuesta inmune humoral-específica y controlar de esta manera las infecciones iniciales.<sup>12,27,36,37.</sup>



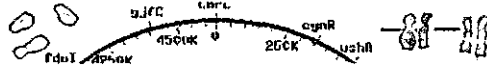
## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la participación del VPH como factor etiológico en el desarrollo de la hiperplasia epitelial focal, verruga vulgar y papiloma es necesario caracterizar y tipificar el tipo específico de VPH que participa en cada una de estas displasias a través de técnicas moleculares tales como la inmunohistoquímica e hibridación "in situ" y de esta manera correlacionar las lesiones con un posible riesgo a desarrollar un carcinoma bucal de células escamosas asociadas al VPH tipo 6, 11, 16 y 18.

## 3. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país no existen reportes de la incidencia de infecciones por el virus del papiloma humano en lesiones bucales tales como la hiperplasia epitelial focal, la verruga vulgar y el papiloma, estas lesiones tienen una gran similitud tanto en los aspectos histopatológicos como clínicos es por eso que es necesario correlacionar la histología, la clínica y la evolución con la presencia del virus ya sea de bajo u alto riesgo.

Además será de suma importancia poder utilizar las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación "in situ" como herramientas para detectar la presencia de secuencias virales, y también para el diagnóstico diferencial de las diversas neoplasias utilizando los marcadores inmunológicos adecuados.



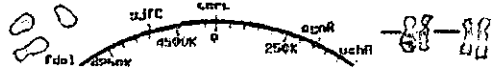
## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la participación del VPH como factor etiológico en el desarrollo de la hiperplasia epitelial focal, verruga vulgar y papiloma es necesario caracterizar y tipificar el tipo específico de VPH que participa en cada una de estas displasias a través de técnicas moleculares tales como la inmunohistoquímica e hibridación "in situ" y de esta manera correlacionar las lesiones con un posible riesgo a desarrollar un carcinoma bucal de células escamosas asociadas al VPH tipo 6, 11, 16 y 18.

## 3. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país no existen reportes de la incidencia de infecciones por el virus del papiloma humano en lesiones bucales tales como la hiperplasia epitelial focal, la verruga vulgar y el papiloma, estas lesiones tienen una gran similitud tanto en los aspectos histopatológicos como clínicos es por eso que es necesario correlacionar la histología, la clínica y la evolución con la presencia del virus ya sea de bajo u alto riesgo.

Además será de suma importancia poder utilizar las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación "in situ" como herramientas para detectar la presencia de secuencias virales, y también para el diagnóstico diferencial de las diversas neoplasias utilizando los marcadores inmunológicos adecuados.

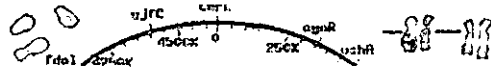


#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un estudio retrospectivo de biopsias de pacientes que fueron recabadas durante el año 99-2000 en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental (División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de UNAM) cuyo diagnóstico histopatológico era de papiloma, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal, para aplicarles pruebas de Biología Molecular tales como hibridación "in situ" e inmunohistoquímica; para detectar la presencia del virus del papiloma humano (VPH).

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.-Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica para la detección de proteínas del VPH.
- 2.-Estandarización de la técnica de hibridación "in situ" para la detección de secuencias de ADN del VPH.
- 3.-Realizar en los casos diagnosticados histopatológicamente como papiloma, verruga vulgar, e hiperplasia epitelial focal, la técnica de inmunohistoquímica para comprobar la presencia de proteínas virales del virus del papiloma humano.
- 4.-Confirmar los resultados positivos obtenidos por inmunohistoquímica a través de la técnica de hibridación "in situ", para encontrar secuencias genómicas del virus de papiloma humano.



## 6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si el virus del papiloma humano tiene un papel en la etiología de la hiperplasia epitelial focal, la verruga vulgar y papiloma, entonces las muestras a estudiar serán positivas por IHQ e Hibridación "in situ" a VPH.

## 7. HIPÓTESIS ALTERNA

Si no existe expresión de VPH en la hiperplasia epitelial focal, verruga vulgar y papiloma, probablemente se debe a que el número de copias virales por célula es inferior a 100, que son las mínimas necesarias para que la técnica de inmunohistoquímica sea efectiva.

Si no existe expresión de VPH en la hiperplasia epitelial focal, papiloma y verruga vulgar, probablemente sea por que el virus no está en la fase de replicación episómica, donde el anticuerpo policlonal para VPH puede reconocer la región L1 y L2 (proteínas tardías de la cápside), que se consideran de las más estables en los diferentes subtipos de VPH, sobretodo L1.

## 8. VARIABLES DEPENDIENTES

Papiloma bucal

Hiperplasia epitelial focal

Verruga vulgar

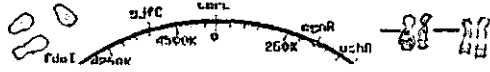
## 9. VARIABLES INDEPENDIENTES

Anticuerpo policlonal de VPH

Sonda de ADN para VPH

## 10. TIPO DE ESTUDIO O DE INVESTIGACIÓN

Retrospectiva, observacional y transversal.



## 11. MATERIAL Y MÉTODOS

### 11.1 UNIVERSO DE ESTUDIO:

Se estudiaron 32 especímenes de tejido fijado en formol/ embebido en parafina del año 1999-2000 con diagnóstico de papiloma, hiperplasia epitelial focal y verruga vulgar, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

### 11.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron 32 biopsias, de las cuales 17 tienen diagnóstico histopatológico de papiloma, 10 de verruga vulgar y 5 de hiperplasia epitelial focal; que fueron recabas y fijadas en formol y embebidas en parafina en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Todas las biopsias fueron analizadas por 2 patólogos:

Un patólogo bucal que realizó el diagnóstico histopatológico de verruga vulgar, papiloma y de hiperplasia epitelial focal.

Un patólogo pediátrico que se encargó de la interpretación de los resultados de la inmunohistoquímica e hibridación "in situ".

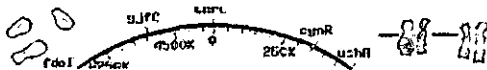
A cada bloque de parafina se le realizó 4 cortes de 1 a 3 micras para poder llevar a cabo las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación "in situ".

Se utilizó una biopsia de faringe positiva a VPH como control positivo para dar validez a los datos obtenidos en la realización de las prácticas con los bloques tanto de inmunohistoquímica como de hibridación "in situ."

### 11.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muestras con material insuficiente.

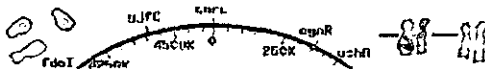




#### 11.4 PROCESO DE INMUNOHISTOQUIMICA (LSAB+/DAB)

La presencia de proteínas virales se llevó a cabo mediante la técnica de inmunohistoquímica a través de un anticuerpo policlonal, se utilizó como control positivo una biopsia de papiloma faríngeo a la que ya se le había demostrado la presencia de este virus.

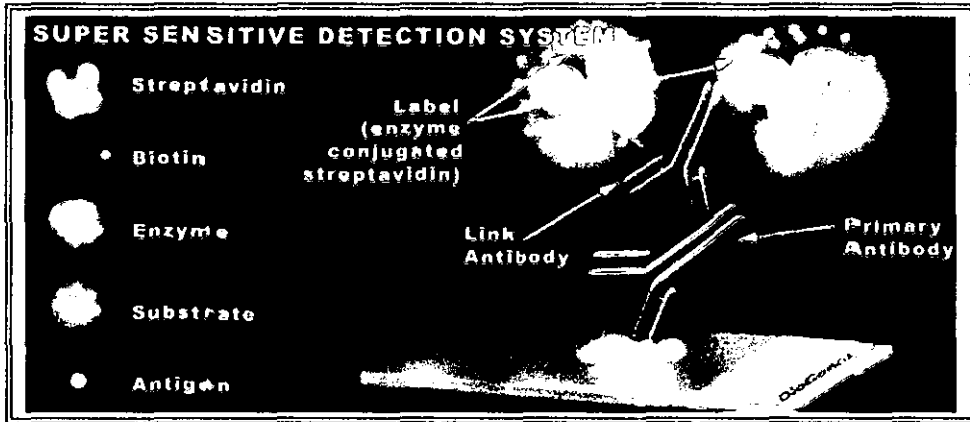
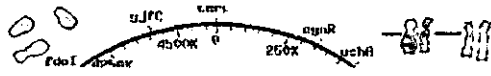
1. Se fundió la parafina del tejido durante dos horas a 60 °C.
2. Posteriormente se realizó recuperación de antígenos con trilogy (cell marque<sup>R</sup>) en una olla de presión y en horno de microondas.
3. Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente.
4. Se realizaron dos lavados con agua destilada.
5. Se incubaron las laminillas en peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos.
6. Se realizó lavado con PBS IX durante 5 minutos.
7. Se incubó con suero o albúmina al 1% durante 15 minutos.
8. Se agregó el anticuerpo primario para VPH (Fig. 28), y se dejó incubando en una cámara húmeda a 4 grados (en refrigerador) por 12 horas.
9. Se realizó lavado con PBS IX durante 5 minutos.
10. Se agregó el anticuerpo secundario biotilnado por 30 minutos a temperatura ambiente(Fig. 28).
11. Se realizó lavado con PBS IX durante 5 minutos.
12. Se agregó el complejo de estreptavidina/peroxidasa por 30 minutos a temperatura ambiente (Fig. 28).
13. Se realizó lavado con PBS IX durante 5 minutos.
14. Se agregó el cromógeno (3'3'-deaminobencidina) y se monitoreó en microscopio óptico.
15. Se contratiñó con hematoxilina.
16. Para diferenciar la tinción se utilizó hidróxido de amonio al 0.37 M.
17. Se deshidrató el tejido.
18. Se montaron las laminillas con resina entellan y se observaron en el microscopio óptico.



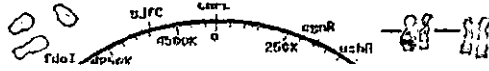
## PROCESO DE INMUNOHISTOQUÍMICA (LSAB+/AP)

Por medio del anticuerpo vimentina, proteína constitutiva del citoesqueleto, vasos sanguíneos y tejido conectivo, se pretendió demostrar si los casos tuvieron un adecuado proceso de fijación.

1. Se fundió la parafina del tejido durante 30 min a 60° C.
2. Se hidrataron las muestras.
3. Se realizó la recuperación de antígenos con target (DAKO<sup>R</sup>) en una olla de presión y en horno de microondas.
4. Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente .
5. Se realizaron dos lavados con agua destilada.
6. Se incubaron las laminillas en peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos.
7. Se realizó un lavado con agua destilada y luego con PBS IX por 5 min.
8. Se incubó con suero o albúmina al 1% por 5 min.
9. Se decantó el suero y se incubó con el anticuerpo primario vimentina durante 45 minutos a temperatura ambiente (Fig. 28).
10. Se realizó lavado con PBS IX durante 5 minutos.
11. Se agregó el anticuerpo secundario para fosfatasa (AP) durante 30 min. (Fig. 28).
12. Se realizó lavado con PBS IX durante 5 minutos.
13. Se agregó el complejo estreptavidina/fosfatasa por 30min (Fig. 28).
14. Se realizó lavado con PBS IX durante 5 minutos.
15. Se reveló con el cromógeno de nueva fucsina.
16. Se contratiñió con hematoxilina.
17. Para diferenciar la tinción se utilizó hidróxido de amonio al 0.37M.
18. Se deshidrataron las laminillas.
19. Se montaron las laminillas con medio de montaje glycergel y se observaron al microscopio óptico.



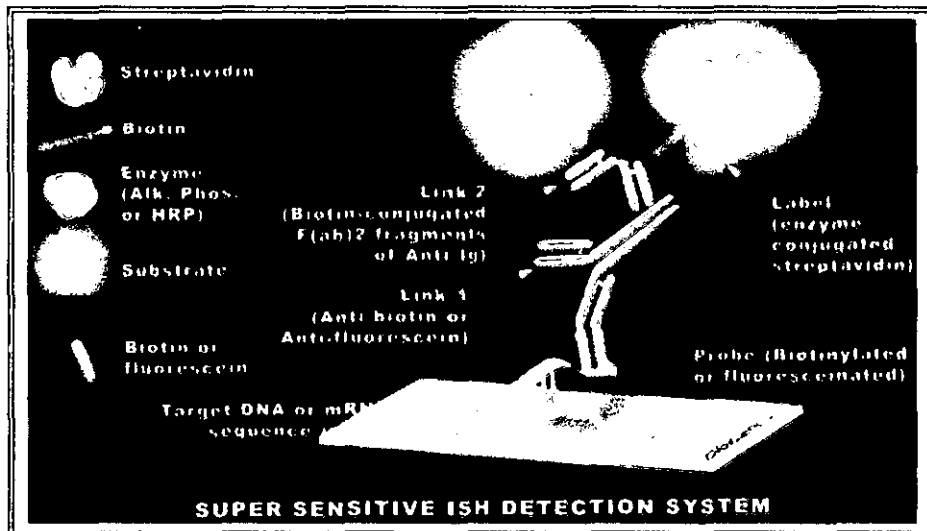
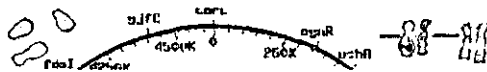
**Fig. 28 ROCESO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.** Se observan los componentes que intervienen en los pasos fundamentales de este sistema de detección que son unión de antígeno con anticuerpo primario, de éste con el anticuerpo secundario biotilnado y de éste último con el complejo de estreptavidina/peroxidasa.



### 11.5 PROCESO DE HIBRIDACIÓN "IN SITU".

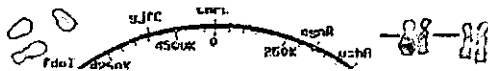
La presencia de secuencias genómicas del VPH se llevó a cabo utilizando una sonda biotilada de amplio espectro para VPH, se empleó una biopsia de papiloma faríngeo como control positivo a VPH por la técnica de HIS.

1. Se fundió la parafina a 60°C por 30 minutos.
2. Se desparafinaron e hidrataron las muestras.
3. Se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente.
4. Se incubó con proteinasa K a 37°C por 10 minutos.
5. Se lavó con PBS IX por 5 minutos.
6. Se hidrataron las laminillas.
7. Se dejaron secar las laminillas por 10 minutos.
8. Se incubaron las muestras con la sonda biotilada a 94°C por 10 minutos (Fig. 29).
9. Se incubaron las muestras con la sonda biotilada a 37°C toda la noche.
10. Se lavó con PBS IX por 5 minutos.
11. Se lavó con solución de astringencia a 48°C por 30 minutos .
12. Se lavó con PBS IX por 5 minutos.
13. Se incubó con el complejo estreptavidina/fosfatasa alcalina por 20 minutos a temperatura ambiente (Fig. 29).
14. Se lavó con PBS IX por 5 minutos.
15. Se incubó con el cromógeno BCIP/NBT y se monitoreó al microscopio.
16. Se lavó con PBS IX por 5 minutos.
17. Se contratificó con fuschina básica al 0.01% (opcional).
18. Se montaron las laminillas y se observaron al microscopio.



**Fig. 29 PROCESO DE HIBRIDACIÓN "IN SITU"**. Se muestran los elementos que participan en la reacción, para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante una sonda biotilnada y el complejo de estreptavidina-fosfatasa alcalina.





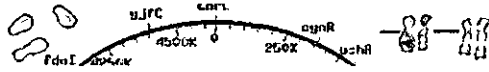
Analizando cada entidad patológica por separado se encontraron los siguientes resultados:

En el caso del papiloma se presenta una mayor incidencia en el género masculino (59%) que en el femenino (41%) (Fig. 31), de acuerdo a la edad se presentó durante la cuarta y quinta década de la vida (23%) (Tabla 8); se localiza preferentemente en la lengua (41%) (Tabla 9) y en un 64% fue diagnosticado clínicamente como papiloma, coincidiendo con el estudio histopatológica (Tabla 10).

En la hiperplasia epitelial focal se encontró una mayor incidencia en el género femenino (60%) con respecto al masculino (40%) (Fig. 31), de acuerdo a la edad, se presentó una mayor frecuencia en la sexta década de la vida (60%) (Tabla 8), se localizó preferentemente en la mucosa labial inferior (80%) (Tabla 9), y todos los casos tuvieron un diagnóstico clínico igual al histopatológico (Tabla 10).

En cuanto a la verruga vulgar se encontró una incidencia dominante en género masculino con respecto al femenino, en donde no se reportó ningún caso. (Fig. 31); con respecto a la edad se presentó la mayor incidencia en la tercera década de la vida (30%) (Tabla 8), no se encontró una localización preferente, aunque se podría considerar a la lengua (30%) y la piel (30%) (Tabla 9); así mismo no hay una entidad patológica sobresaliente con la que se hayan diagnosticado clínicamente, aunque se podría considerar al papiloma (30%) y a la hiperplasia fibrosa (30%) (Tabla 10).

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



Mediante la técnica de IHQ se logró detectar la presencia del VPH en el 100% de los casos con diagnóstico de hiperplasia epitelial focal, en el 82% de los casos con diagnóstico de papiloma y en el 40% de los casos con diagnóstico de verruga vulgar (Fig. 32 ).

De los 32 casos analizados el 78% (25 de 32) resultó positivo a VPH por la técnica de IHQ y el 22% (7 de 32) resultó negativo (Fig. 33).

De los 32 casos trabajados mediante la técnica de IHQ, se seleccionaron 4 (3 positivos y 1 negativo) para desarrollar la técnica de hibridación "in situ" (HIS) utilizando una sonda de amplio espectro para VPH, el resultado fue el mismo, es decir, que los 3 casos positivos por IHQ fueron también positivos para la técnica de HIS y el único caso negativo por IHQ también lo fue para la técnica HIS; confirmando así los resultados obtenidos con la primera técnica empleada. Los ejemplos más representativos de los casos positivos al VPH obtenidos en este estudio, corresponden a una hiperplasia epitelial focal (Fig. 34) con su respectivo control faríngeo positivo para la técnica de IHQ (Fig. 35) y un papiloama bucal (Fig. 36) con su respectivo control faríngeo positivo para la técnica de HIS (Fig. 37).

Para el análisis estadístico de los casos se utilizó el programa SPSS versión 9.0 para Windows y para graficar los datos, el programa Microsoft Excel (Office 2000).



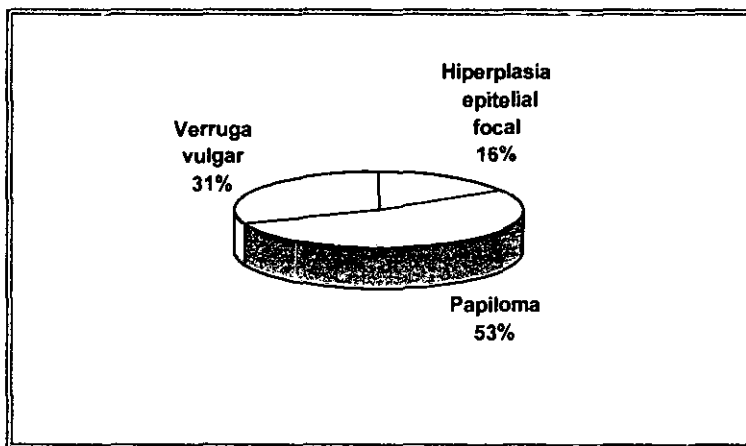


Fig. 30 GRÁFICA DE LOS CASOS ANALIZADOS.

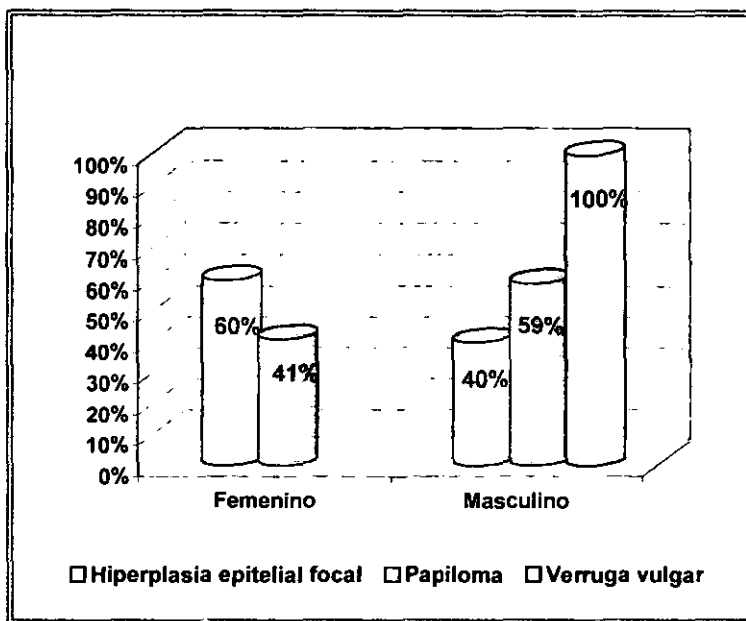
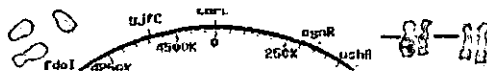
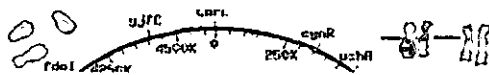


Fig.31 GRÁFICA DE INCIDENCIA DE LAS TRES PATOLOGÍAS EN CUANTO AL GÉNERO.



EDAD	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL		VERRUGA VULGAR		PAPILOMA		TOTAL	
	No. Casos	%	No. Casos	%	No Casos	%	No. Casos	%
1-10 años	1	20%					1	3%
11-20 años			2	20%	3	18%	5	16%
21-30 años			3	30%	2	12%	5	16%
31-40 años					4	23%	4	12%
41-50 años			2	20%	4	23%	6	19%
51-60 años	3	60%			2	12%	5	16%
61-70 años			1	10%	1	6%	2	6%
Más de 70 años	1	20%	2	20%	1	6%	4	12%
Total	5	100%	10	100%	17	100%	32	100%

Tabla 8. RELACIÓN DE LAS TRES PATOLOGÍAS Y LA EDAD.



LOCALIZACIÓN	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL		VERRUGA VULGAR		PAPILOMA		TOTAL	
	No. Casos	%	No. Casos	%	No. Casos	%	No. Casos	%
Labio superior					1	6%	1	3%
Labio inferior					1	6%	1	3%
Comisura labial			1	10%			1	3%
Mucosa bucal	1	20%	1	10%	1	6%	3	9%
Mucosa labial inferior	4	80%	1	10%			5	16%
Piso de boca					1	6%	1	3%
Lengua			3	30%	7	41%	10	32%
Paladar duro					1	6%	1	3%
Paladar blando					3	17%	3	9%
Encía interdientaria			1	10%	1	6%	2	7%
Orofaringe					1	6%	1	3%
Piel			3	30%			3	9%
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>100%</b>	<b>10</b>	<b>100%</b>	<b>17</b>	<b>100%</b>	<b>32</b>	<b>100%</b>

Tabla 9. RELACIÓN DE LAS TRES PATOLOGÍAS Y SU LOCALIZACIÓN.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL		VERRUGA VULGAR		PAPILOMA		TOTAL	
	No Casos	%	No. Casos	%	No. Casos	%	No. Casos	%
Hiperplasia epitelial focal	5	100%			2	12%	7	23%
Papiloma			3	30%	11	64%	14	44%
Verruga vulgar			2	20%	1	6%	3	9%
Hiperplasia fibrosa			3	30%			3	9%
Fibroma					1	6%	1	3%
Carcinoma epidermoide					1	6%	1	3%
Neoplasia Benigna			1	10%			1	3%
Queratosis solar			1	10%			1	3%
Granuloma					1	6%	1	3%
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>100%</b>	<b>10</b>	<b>100%</b>	<b>17</b>	<b>100%</b>	<b>32</b>	<b>100%</b>

**Tabla 10. RELACIÓN ENTRE EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y EL HISTOPATOLÓGICO.**

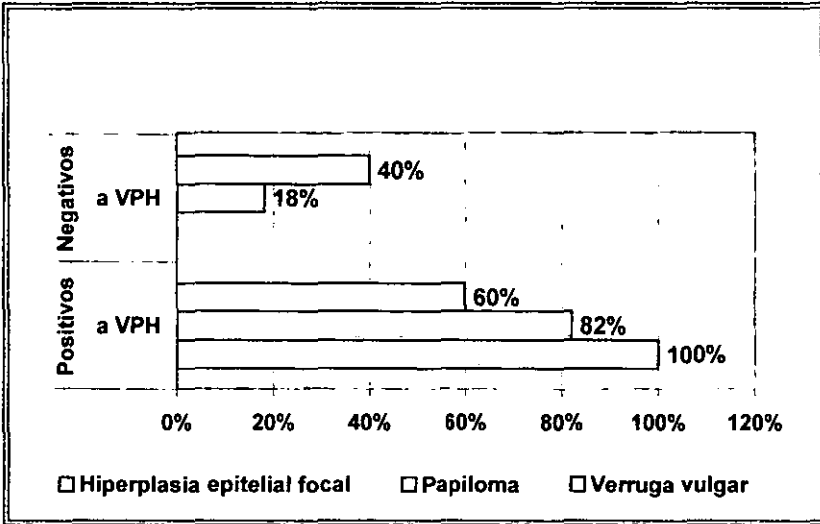
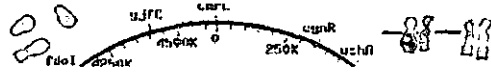


Fig. 32 GRÁFICA DE INMUNOEXPRESIÓN POR TIPO DE LESIÓN.

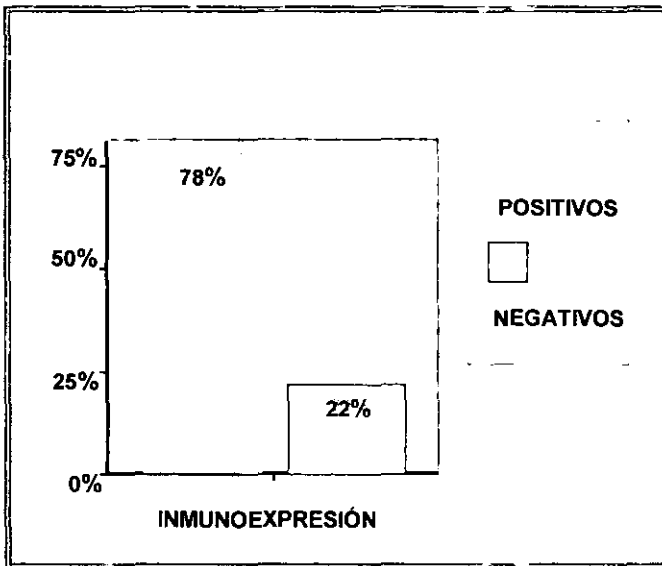
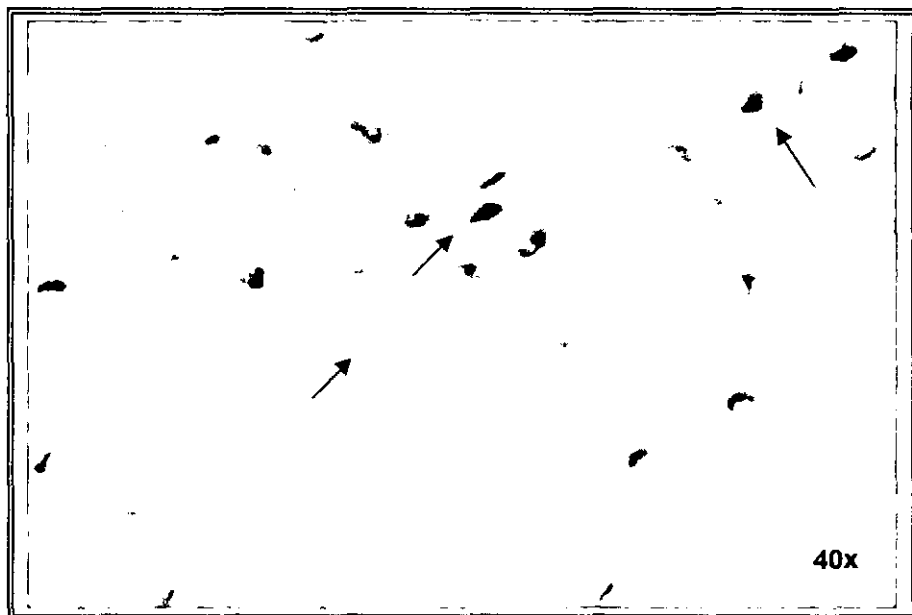
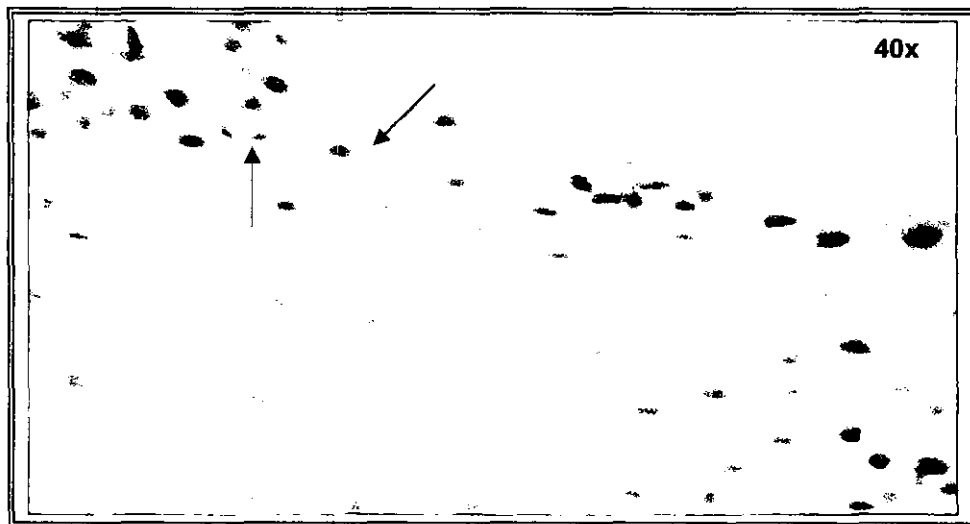


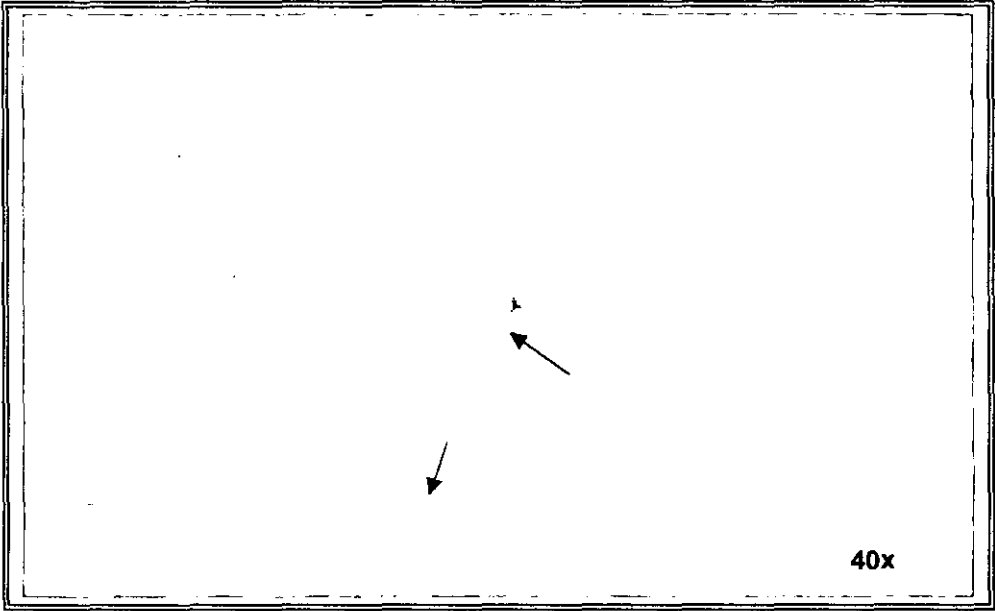
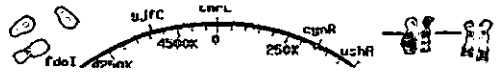
Fig. 33 GRÁFICA DE INMUNOEXPRESIÓN GENERAL.



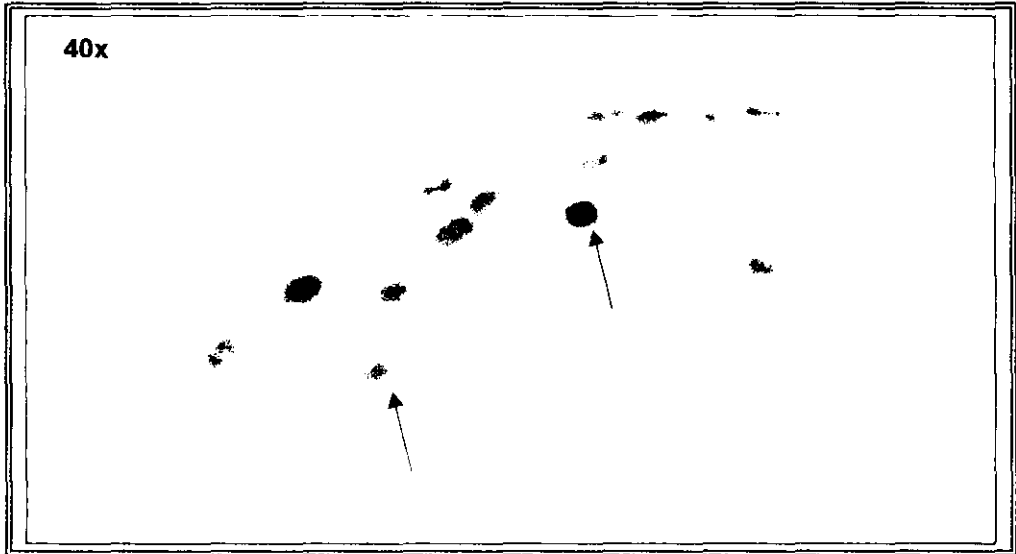
**Fig. 34 HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL.** Las flechas indican células positivas a VPH (de color café) por la técnica de IHQ (LSAB+/DAB).



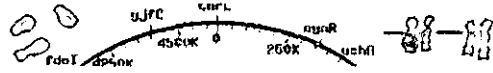
**Fig. 35 CONTROL DE PAPILOMA FARÍNGEO PARA LA TÉCNICA DE IHQ (LSAB+/DAB).** Las flechas indican algunas de las células positivas a VPH (de color café).



**Fig. 36 PAPILOMA BUCAL.** Las flechas indican células positivas a VPH (color morado) por la técnica de HIS (estreptavidina/fosfatasa alcalina).



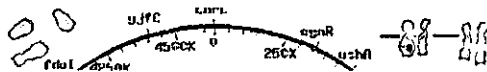
**Fig. 37 CONTROL DE PAPILOMA FARÍNGEO PARA TÉCNICA DE HIS.** Las flechas indican células positivas a VPH (color morado).



### 13. CONCLUSIONES

- La técnica de inmunohistoquímica es una herramienta muy importante en el diagnóstico diferencial de las diferentes neoplasias (tumores) con lo que podemos garantizar a los pacientes un tratamiento oportuno.
- La técnica de inmunohistoquímica en combinación con la técnica de hibridación "in situ", permiten confirmar la presencia de proteínas y secuencias genómicas virales asociadas a la patología del paciente, en este caso confirmar la asociación del VPH a lesiones bucales como papiloma, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal.
- Tanto la inmunohistoquímica como la hibridación "in situ" son técnicas que fácilmente pueden ser estandarizadas en un laboratorio, donde el diagnóstico histopatológico es de suma importancia para el paciente.
- Debemos considerar que una parte fundamental para obtener buenos resultados del empleo de este tipo de tecnología, es la preservación y procesado de las piezas quirúrgicas por el personal médico y técnicos.
- Es importante hacer hincapié en la aplicación de estas técnicas de la Biología Molecular, en todo tipo de lesiones papilares para así poder dar un diagnóstico y tratamiento oportuno; sobre todo por la gran asociación que tiene el VPH en el desarrollo de lesiones malignas.
- Podemos confirmar nuestra hipótesis a cerca de la relación etiológica del VPH con las lesiones bucales estudiadas en este trabajo.





## 14. DISCUSIÓN

- Para corroborar que todos los casos estudiados cumplieron con el control de calidad de fijación en formaldehído e inclusión en bloques de parafina, se comprobó la intensidad de expresión de la vimentina, en una biopsia de apéndice y de papiloma faríngeo, procesados en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría, de todos los casos analizados, sólo uno resultó de baja intensidad, con lo que podemos aseverar que en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la Facultad de Odontología de la UNAM, cuentan con un buen proceso de preservación de las piezas quirúrgicas.

- Podemos decir que todos los casos que resultaron positivos a VPH mediante la técnica de IHQ se debió a dos razones principalmente:

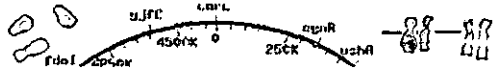
- El virus de VPH se encontraba en una fase de replicación episómica, donde hay expresión de las proteínas tardías de la cápside (L1 y L2 ), que son las que reconoce específicamente el anticuerpo policlonal de VPH, sobretodo la región L1 que es de las más conservadas en todos los tipos de VPH.

- El número de copias virales necesariamente debió de ser de un mínimo de 100/célula en adelante.

- Y en los casos que resultaron negativos a VPH quizá tengan la siguiente explicación:

- Posiblemente se debe a que la etiología viral no esté asociada a esta lesión.

- El número de copias virales por célula fue inferior a 100, que son las mínimas necesarias para que la técnica de IHQ sea efectiva.

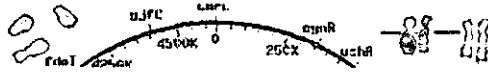


## 15. PERSPECTIVAS A FUTURO

Más adelante se puede llevar a cabo un estudio más profundo, mediante la tipificación del VPH en cada uno de los casos con la técnica de HIS, utilizando las sondas específicas de cada tipo de VPH y así confirmar lo que la literatura refiere a cerca de cada patología y su asociación al tipo específico de VPH.

Otro estudio a futuro que puede llevarse a cabo, es el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una de las técnicas más modernas ya que ofrece muchas ventajas como el poder amplificar secuencias específicas de ADN, tanto en tejido fresco y tejido fijado en formol/embebido en parafina y tiene una sensibilidad elevada que permite detectar 1 copia/ $10^5$  por célula del virus, pudiendo así identificar las infecciones latentes por VPH.

Con este trabajo de investigación se demuestra la gran importancia que tiene implementar a futuro las técnicas de IHQ e HIS como de rutina en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la UNAM con el fin de que sirvan de complemento al diagnóstico por H & E; así como el poder garantizar un servicio más completo a los solicitantes; además debemos considerar que toda la información archivada podrá ser empleada para crear la inquietud de desarrollar nuevas líneas de investigación y como fuente de conocimiento a las próximas generaciones.



## 16. ABREVIATURAS

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico. Es el material genético y está formado por una doble cadena de nucleótidos.

**ARN.** Ácido ribonucleico. Está integrado por una cadena sencilla de nucleótidos.

**EST.** Enfermedad de transmisión sexual.

**IHQ.** Inmunohistoquímica.

**HIS.** Hibridación "in situ".

**Kb.** Kilobase, unidad de longitud del ADN equivalente a mil pares de bases.

**LSAB+/AP.** Marcador de estreptavidina-biotina para fosfatasa.

**LSAB+/DAB.** Marcador de estreptavidina-biotina para peroxidasas.

**Mb.** Megabase, un millón de pares de bases ADN.

**nm.** Nanómetro  $10^{-9}$  metros.

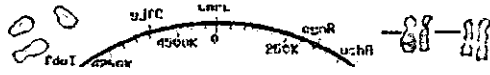
**PBS.** Buffer de fosfato salino.

**PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación de segmentos específicos de ADN mediante oligonucleótidos específicos ("primers") expuestos a ciclos de replicación.

**URR.** (del inglés Upstream Regulatory Region) región reguladora superior o LCR (del inglés Long Control Region) región larga de control.

**VPH.** Virus del papiloma humano.

**VIH.** Virus de inmunodeficiencia humana.



## 17. GLOSARIO

**ADN recombinado.** Molécula de ADN en la que se ha producido artificialmente una redistribución de genes. Para romper las moléculas aisladas de ADN en fragmentos que después se redistribuyen en la secuencia deseada se utilizan enzimas. También pueden introducirse en la molécula porciones de material de ADN provenientes de otros organismos de la misma o de diferentes especies, que se replican y dan lugar a alteraciones genéticas y fenotípicas del organismo.

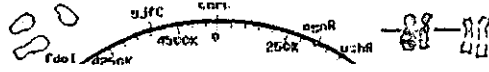
**Acantosis.** Grosor anormal del estrato espinoso de la piel.

**Amplificación genética.** El incremento en el número de copias de un fragmento de ADN. Puede ocurrir in vivo o in vitro.

**Antígeno.** Son moléculas que provocan una reacción inmunitaria cuando se introducen al huésped que las reconocen como no propias. Son moléculas grandes (proteínas o polisacáridos rígidos con PM de 5000).

**Antisuero.** Suero animal o humano que contiene anticuerpos frente a una enfermedad concreta, que se utiliza para conferir inmunidad pasiva para esta enfermedad.

**Antioncogen.** Son genes supresores del cáncer inhibidores del crecimiento. Se conocen también como genes supresores de la proliferación o genes supresores de tumor.



**Biología Molecular.** Rama de la Biología que estudia el origen, transformación e interacción de los genes y sus productos en el individuo, población o especie.

**Cápside.** La envoltura proteínica que envuelve al ácido nucléico del genoma. Las cápsides vacías pueden ser subproductos del ciclo de replicación de los virus con simetría icosaédrica.

**Capsómero.** Son subunidades proteicas que conforman la cápside viral, aparecen como proyecciones en una o dos disposiciones geométricas: cúbica (icosaédrica) o helicoidal.

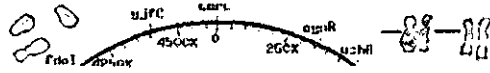
**Carcinoma.** Cáncer o tumor maligno constituido por células epiteliales polimorfas con tendencia infiltrativa hacia los tejidos próximos y metástasis.

**Carcinoma in situ.** Son los cambios displásicos marcados, que involucran todo el grosor del epitelio. Es una etapa preinvasora del cáncer.

**Carcinogénico.** Que favorece el desarrollo de cáncer.

**Cebador.** (en inglés primer) Oligonucleótidos de cadena sencilla que promueven la copia de un templete de ADN situado entre dos primers.

**Citomegalovirus.** Virus que al ser transmitido al feto por la madre produce un síndrome con retardo mental y microcefalia.



**Codificar.** Capacidad que tiene la secuencia de nucleótidos en el ácido desoxirribonucleico (ADN) para determinar o especificar la secuencia aminoácida que debe tener la cadena polipeptídica de cada tipo de proteína.

**Codón.** Triplete de bases de la molécula de ADN ó ARNm que codifica para un aminoácido específico en la cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas. El orden de los codones determina la secuencia de aminoácidos de la proteína.

**Cubierta.** Membrana que contiene lípidos y que circunda a ciertas partículas virales. Se adquiere durante la maduración del virus por un proceso de gemación a través de una membrana celular. En la superficie de la cubierta quedan expuestas las glucoproteínas codificadas por el virus.

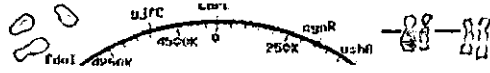
**Desnaturalización o desnaturación.** Privación de los caracteres o naturaleza de una sustancia por adición de otra que la hace impropia para un objeto determinado.

**Displasia.** Proliferación excesiva de células basales. Comprende pérdida de la uniformidad de células individuales así como de su orientación estructural. Anarquía arquitectónica.

**Disqueratosis.** Queratinización anormal o prematura de las células epiteliales.

**Diploide.** Cepa o célula que posee dos grupos completos de cromosomas homólogos como sucede en el caso de las células somáticas y las células germinales primordiales antes de su maduración .

**Electroforesis.** Procedimiento para separar moléculas como fragmentos de ADN.



**Endonucleasas de restricción.** En Genética Molecular, es una enzima que rompe el ADN en un lugar específico. Cada una de las múltiples endonucleasas diferentes aisladas de diversas bacterias actúa en lugares específicos para cada especie, haciendo posible a los investigadores dividir el ADN en segmentos pequeños.

**Episoma.** Unidad extracromosómica replicante que funciona autónomamente o con un cromosoma.

**Epiteliotrópicas.** Que tiene afinidad por el epitelio.

**Epitopo.** Determinante antigénico que produce una reacción específica con una inmunoglobulina. Es una porción pequeña de la molécula que consta de unos cuantos aminoácidos. Es la parte exacta del antígeno que reacciona con el sistema inmunitario.

**Epstein Barr, virus de (EBV).** Virus del grupo herpes que produce la mononucleosis infecciosa.

**Exones.** Bloques o fragmentos de secuencias de ADN que constituyen a los genes y que codifican para dominios discretos de las proteínas, se intercalan con regiones que no codifican (intrones) en numerosos genes de células de organismos superiores (los eucariotes).

**Exonucleasa.** Nucleasa que degrada el ADN por sus extremos.

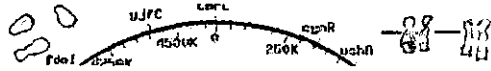
**Extracromosomal.** Que no está integrado en el cromosoma.











**Nucleótido.** Molécula compuesta de azúcar, ácido fosfórico y una base púrica o pirimidica.

**Oligonucleótido.** Pequeños polímeros de ADN, sintetizados para hibridar específicamente con una cadena sencilla de ADN.

**Oncogen.** Gen que en ciertas condiciones es capaz de causar la conversión inicial y continua de las células anormales. Este término puede usarse para designar a un gen de esta clase presente en un genoma vírico.

**Oncogénesis.** Proceso que inicia y promueve el desarrollo de una neoplasia.

**Paraqueratosis.** Presencia de los núcleos de los queratocitos en el estrato córneo de la piel.

**Pedunculada.** Provisto de pedúnculo (parte conectiva en forma de tallo) mediante el cual una lesión se une al tejido normal.

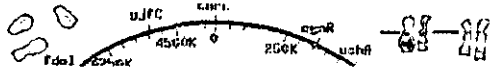
**Pinocitosis.** Proceso de captación de líquido extracelular por parte de una célula. La membrana celular desarrolla una indentación sacular que se llena de líquido extracelular; a continuación se cierra sobre ella y forma una vesícula o vacuola intracelular.

**Pirimídica.** Bases nitrogenadas que son citosina, timina, uracilo.



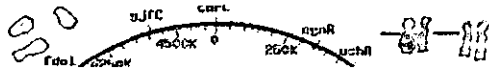






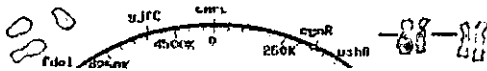
## 18. REFERENCIAS

1. Jawetz, E. **Microbiología Médica**. Editorial: El manual moderno S.A de C.V. 15a Edición México, D.F 1996 .pp:375-376;611-631.
2. Regetzi, J .**Patología Bucal Interamericana Mc Graw-Hill** Segunda Edición 1995 pp:6-193.
3. Green, T.L . **Oral and labial verruga vulgaris: clinical, histologic and immunohistochemical evaluation**. *Oral surg oral med oral pathol*. October, 1986, 62:4;410-416.
4. Sherris , J. **Microbiología médica. Introducción a las enfermedades infecciosas**. Edit. Doyma , Barcelona, España 1993, pp:691-692.
- Tsuchiya, H . **Detection of human papillomavirus in head and neck tumor with DNA hibridization and immunohistochemical analysis**. *Oral surg med oral pathol* , June, 1991;71:6;721-725.
5. Schaechter, M. **Microbiología mecanismos de las enfermedades infecciosas**, Edit. Médica-panamericana, 2da edición México 1994, pp: 527-534.
6. [http://www.urologiaaldia.com/Vol2\\_n3/parte1.html](http://www.urologiaaldia.com/Vol2_n3/parte1.html)
7. <http://omega.ilce.edu.mx3000/sities/ciencia/volz/ciencia3071/htm/sec-13htm>
8. Joklik, W. **Microbiología Zinsser**. Edit. Médica Panamericana, 20<sup>va</sup> edición, Buenos Aires, Argentina, 1996 pp:1277-1300.
9. Scully, C. **Papillomaviruses: their possible role in oral disease**. *Oral surg med oral pathol* , August, 1985;60:2; 166-174.
10. Volk, W. **Microbiología Médica**. Edit. Interamericana Mc Graw Hill, 3ra edición México 1988, pp:638-648; 673-682.
11. White, D. **Medical Virology**. Academic Press, 4<sup>th</sup> edition United States of America 1994 , pp:170-184;294-302.

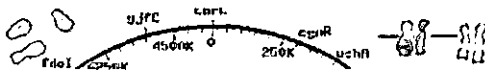


12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Fig. 1,2,3.
13. Aznar, J. **Infecciones genitales por papilomavirus.** *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 1990;7:183-185.
14. Bernad H.U. **Evolution of papillomavirus.** *Curr top microbiol immunol* 1994;186:34-51.
15. De Villers, E. **Heterogeneity of the Human Papillomavirus Group.** *Journal of Virology.* Nov. 1989;63,11;4898-4903.
16. De Villers, E.M. **Human Papillomavirus Types: an update.** *Curr top microbiol immunol* 1994;186:1-9.
17. Tjoun-Won, P. **Molecular biology of cervical cancer and its precursor.** *Cancer Complemente* 1995;76(10):1902-13.
18. Zeuss, M. **In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions.** *Oral surg oral med oral pathol*, June 1991,71:6;714-720.
19. Chang, F. **Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease.** *J Oral Pathol Med* 1991;20:305-17.
20. Herrington, CS. **Human Papillomaviruses and Cervical Neoplasia I Classification, virology, pathology and epidemiology.** *J Clin Pathol* 1994;47:1066-1072.
21. Herrington, CS. **Human papillomaviruses and cervical neoplasia II. Interaction of HPV with other factors.** *J. Clin Pathol* 1995;48:1-6.
22. Zur Hausen, H. **Papillomavirus infections –a major cause of human cancers.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1996 F55-F78.
23. Scheffner, M. **Functions of human papillomavirus proteins.** *Curr top microbiol immunol.* 1994;186:83-97.
24. Kumar, V. **Patología Humana.** Edit. Interamericana Mc Graw-Hill, 5ta. edición México 1995 pp:175-221.

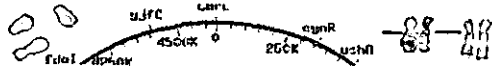




25. Schaffner, W. **Infección causada por el virus del papiloma humano.** *Atención Médica*. julio 2000;13:7;12-28. Fig. 4
26. <http://www.insp.mx/salud/38/381-7s.html>.
27. [http://200.10.68.58/bibvirtual//revistas/anales/vol61\\_N1papilomavirus.htm](http://200.10.68.58/bibvirtual//revistas/anales/vol61_N1papilomavirus.htm)
28. Sapp, J. **Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea** Harcourt Barcelona, España 2000 pp:157-158; 211-214. Fig 12,13,14,16,22,23,24.
29. Baum, B. **The impact of gene therapy on dentistry** *Jada* February 1995;126:179-189.
30. Lawton, GM. **Human Papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection.** *J Oral Pathol Med* 1992;21:265-269.
31. Vousden, K. H. **Viruses and Human Cancer Genetics in malignant Disease.** *British Medical Bolletin* 1994;50:3;560-581.
32. Playfair, J . **Microbiología Médica . Edit. Mosby Doyma Libros** Gran Bretaña 1995, pp:15-16
33. Snijders, P J F. **Papillomaviruses and Cancer of the upper digestive and respiratory tracts.** *Curr top microbial immunol.* 1994;186:177-195.
34. Mc Cance, D. **Human Papillomaviruses.** *Infectious Disease Clinics of North America.* December 1994;8;4,751-767.
35. <http://www.bibliomed.com>
36. <http://www.diariomedico.com>
37. Miller, C. **Human Papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions and squamous cell carcinoma.** *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82;57-68.
38. Cawson, A. R. **Oral pathology and diagnosis color atlas with integrated text.** *W.S Saunders Company.* Philadelphia, USA 1992 pp:13.2-13.5. Fig 15,16,19.

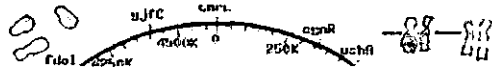


39. Nuovo, G. **The Histologic spectrum of epidermodysplasia verruciforme.** *The American Journal of Surgical Pathology.* 2000; 24(10): 1400-1406.
40. Gorlin, J.R. **Sindromes of the head and neck.** *Oxford monographs on medical genetics* no.19 Tercera Edición New York, Oxford United States of America 1990.
41. [http://www.uv.es/medicina-oral/revista\\_13/mendeze.htm](http://www.uv.es/medicina-oral/revista_13/mendeze.htm)
42. Shafer ,W. G. **Tratado de Patología Bucal.** Nueva Editorial Interamericana pp:-23,86-88,388.Cuarta Edición México, D. F. 1988.
43. [http://www.uv.es/medicina\\_oral/docencia/atlas/tumoresbenignos/1.htm](http://www.uv.es/medicina_oral/docencia/atlas/tumoresbenignos/1.htm)  
Fig.9,10,11,17,18.
44. Alder-Storthzk, K. **Identification of Human Papillomavirus Types In Oral Verruca Vulgaris.** *J Oral Pathol* 1986,15:230-233.
45. Syrjanen, S . **Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA-hybridization applied on paraffin sections.** *Oral surg med oral pathol,* December, 1986;62:6;660-667.
46. Cohen, P. **Focal Epithelial Hyperplasia. Heck Disease.** *Pediatric Dermatology* 1993 ;10:3;245-251.
47. Chindia, M. L. **Focal Epithelial Hyperplasia (Heck's Disease) in three Kenyan Girls: case report.** *East African Medical Journal* September 1993;7:9;595-596.
48. Landells, I. **Oral Mucosal Lesions in a Somali Boy.** *Pediatric Dermatology* 1994;11:3;274-276.
49. Romman, C. **Multifocal Papiloma virus epithelial hyperplasia .** *Oral Surg. Oral Med, Oral Pathol* 1994;77:631-5.



50. Summersgill, K. **Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents.** *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* January 2001,91:1;62-69.
51. Arnold, W.J. **Disease of head and neck an atlas of histopathology.** *Georg thieme verlag*, New York 1987, pp: 8.12-8.13. Fig.20
52. Bording, G.M. **Atlas of head and neck pathology.** *W. B Saunders Company, Harcourt Jovanovich, Inc. USA* 1993, pp: 227-228. Fig. 21
53. Eversole, L R . **Oral squamous papillomas: detection of HPV DNA by in situ hybridization.** *Oral surg med oral pathol* May 1988;5:65;545-550.
54. Steigleder, G. K. **Atlas de Dermatología.** *Edit. Científica PLM.* 1ra reimpresión México 1989, pp.161-169. Fig.7,8,25,26.
55. Wilson, J. **Principios de Medicina Interna de Harrison.** *Mc Graw-Hill* 14va. Edición vol. I y II. México 1998 pp: 238,239;328,437;623-625,632,931-932.
56. <http://cancernet.nci.gov>
57. Rosai, J. **Ackerman's surgical pathology.** *The C.V Mosby Company*, Seventh Edition; Washington, D.C 1989 PP:35-45.
58. Philipp, N. **Molecular and cellular pathology products Biogenex USA** catalog 2001 pp:50,76. Fig. 28, 29.
59. Segura, M.L. **Hibridación "in situ" ultraestructural.** *Plaza y Valdes editores*, México 1997 , pp:5-27.
60. Lisker, R. **Introducción a la genética Humana.** *El Manual Moderno* pp: 276-318; 63-66. Primera Edición México, D.F 1995 PT: 318.
61. Watson, D.J . **Recombinant DNA.** *Scientific American Books*, Second Edition, New Yorkj, USA,1998. Fig. 27.
62. Dimitrov, S .**The limit of PCR amplification** *J theor, Biol.* 1996;178;425-426.





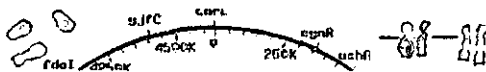
## 19. ANEXOS

### MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUÍMICA:

- Guantes.
- Micropipeta desde 10, 20, 100, 200 y 1000 $\mu$ l.
- Caja de tinción de vidrio.
- Cubreobjetos de 24x24 y 24x50.
- Puntas para micropipetas (blancas, amarillas y azules)
- Gasas.
- Vasos de Koplín con rosca de plástico y de vidrio.
- Marcador de tinta indeleble.
- Marcador hidrofóbico (Dako pen).
- Pinzas de estuche de disección.
- Tubos ependorff de 600 $\mu$ l.
- Laminillas con pantalla esmerilada.

### EQUIPO:

- Horno de microondas 12" x 22".
- Cronómetro.
- Microscopio óptico.
- Estufa.
- Refrigerador a 4°C.
- Olla de presión Microwave Tender Cooker cat. No. 62104, Nordic Ware y/o Black and Decker HS80 Steamer.



**REACTIVOS /SUSTANCIAS:**

- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- PBS IX.
- Tween 20 de 100ml (DAKO) cat. S1966.
- Fosfato de potasio monobásico.
- Cloruro de sodio.
- Cloruro de potasio.
- Albúmina o suero de caballo al 1%.
- Hematoxilina de Harris.
- Hidróxido de amonio.
- Xilol
- Alcohol al 50%, 70%,96% y 100%.
- Recuperador de antígenosTrilogy (CELL MARQUE) o Target Retrieval Solution High pH (Dako) cat. S3308.
- Agua destilada y bidstilada para preparar reactivos.
- Resina sintética (entellan).
- Medio de montaje a base de glicerol, Glycergel (DAKO) cat. C563.

**Kit de detección IHQ LSAB+/DAB (DAKO):**

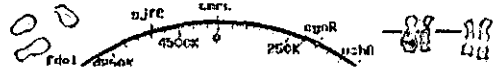
- Anticuerpo secundario.
- Complejo (estreptavidina-peroxidasa) cat. K0690.
- Cromógeno 3'3'-Deaminobencidina (3',3,4,'4'tetraaminobifeniltetrahydroclotrato) cat.K3468.

**Kit de detección IHQ LSAB+/AP (DAKO) cat. K0689:**

- Anticuerpo secundario.
- Complejo (estreptavidina-fosfatasa).

**-Anticuerpo primario para VPH:**

Rabbit –antivirus papillomavirus polyclonal antibody 1ml DAKO cat. B0580 proveedor química VALANER y/ o rabbit polyclonal papillomavirus (HPV) de 0.5ml concentrado Cell Marque cat. CMC427.



- New Fuchsin Substrate System cat. K698.
- Anticuerpo Primario antivimentina 1ml (DAKO) cat. M0725.

#### MATERIAL PARA HIBRIDACIÓN "IN SITU"

- Cubreobjetos.
- Termómetro.
- Micropipetas.
- Puntas para micropipetas.
- Lápiz hidrofóbico.
- Gasas.

#### EQUIPO.

- Cronómetro.
- Estufa.
- Baño María.
- Microscopio óptico.

#### REACTIVOS /SUSTANCIAS.

- Alcohol al 50%, 70%,96% y 100%.
- Proteinasa K o Pepsina (DAKO) cat. S3020.
- PBS IX.
- Kit de detección HIS (DAKO) del catálogo K0601:
  - Sol. de astringencia (1:50).
  - Estreptavidina alcalina conjugada o fosfatasa.
  - Cromógeno BCIP/NBT.
- Sonda biotilnada para VPH de amplio espectro (DAKO) cat. K0601.
- Fuschina Básica.
- Resina entellan.