



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA Y MICOLOGÍA MÉDICA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
“DR. BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ”
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES
TIPO TOLL (TLRs) 7 Y 8 Y CARGA VIRAL EN PIEL DE
PACIENTES PORTADORES DE VERRUGAS VULGARES TRATADOS
CON IMIQUIMOD CREMA AL 5% Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA”.**

TESIS DE POSGRADO
Que para obtener el título de especialista en
D E R M A T O L O G Í A
P r e s e n t a:
DRA. ROXANA TORRES SANCHEZ



Asesor: Dra. Liliana Serrano Jaen
Co- asesor: Dr. Constantino III López Macías

México, D. F.

Marzo 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “DR. BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ”
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA Y MICOLOGÍA MÉDICA**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES
TIPO TOLL (TLRs) 7 Y 8 Y CARGA VIRAL EN PIEL DE
PACIENTES PORTADORES DE VERRUGAS VULGARES TRATADOS
CON IMIQUIMOD CREMA AL 5% Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA”.**

Director de tesis
Dra. Liliana Serrano Jaén
Médico Adscrito al Servicio de Dermatología y Micología Médica
Hospital de Especialidades. CMN Siglo XXI.

Dra. Roxana Torres Sánchez
Médico Residente de 5º año de la Especialidad en Dermatología

DRA. DIANA GRACIELA MENEZ DÍAZ
JEFE DE DIVISION DE EDUCACION M
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ"
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

DRA. ADRIANA ELIZABETH ANIDES FONSECA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO EN DERMATOLOGIA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ"
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

DRA. LILIANA SERRANO JAEN
DIRECTORA DE TESIS
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ"
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

DR. CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS
CO- ASESOR DE TESIS
INVESTIGADOR TITULAR A
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN INMUNOQUÍMICA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ"
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis
Dra. Liliana Serrano Jaen
y
Dr. Constantino III Roberto López Macías
Por la propuesta de este proyecto y apoyo constantes

A la Dra. Adriana Anides Fonseca
Por sus enseñanzas y consejos

A mis maestros:
Dr. Arévalo, Dr. Blancas, Dr. Méndez, Dra. Serrano y Dr. Vázquez.
Por su confianza, orientación y la gran cantidad de conocimientos compartidos a lo largo de
tres años.

A los pacientes
Por su participación y constancia en este estudio
y por ser parte básica en mi formación

Q. en Alimentos. Noemí Alejandra Saavedra Avila
Por su paciencia y tiempo

DEDICATORIA

A mi abuelita: Guadalupe Gilabert T.
Por su ejemplo, amor y apoyo incondicionales.
Donde quiera que estés eres y serás mi gran motivación.

A mi madre: Guadalupe Sánchez G.
Por cariño, su paciencia y las horas de desvelo conjuntas.

A mi familia:
Tíos (as) y primos (as). Gracias por su fe en mí y por ser un pilar básico en mi vida.

A mi mejor amigo:
Edgar Alvarez Z.
18 años a mi lado. Siempre presente en los momentos más difíciles.

A mis compañeras (os) de residencia:
Medicina Interna y Dermatología

CONTENIDO

RÚBRICAS	3
CONTENIDO	5
ÍNDICE	6
AGRADECIMIENTOS	8
DEDICATORIA	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12

INDICE

PARTE 1. INTRODUCCION

I.	Antecedentes	
	Introducción	15
	Epidemiología del virus del papiloma humano	15
	Fisiopatología del virus del papiloma humano	16
	Inmunología del virus del papiloma humano	18
	Hallazgos clínicos	19
	Diagnóstico	23
	Tratamiento	23
	Modificadores de la respuesta inmune	27
	Receptores tipo Toll	30
	Expresión de TLRs en piel	34
II.	Justificación	37

PARTE 2. INVESTIGACION

III.	Planteamiento del problema	38
IV.	Hipótesis	
	Alterna	39
	Nula	39
V.	Objetivos	40
VI.	Material y métodos	41
	• Diseño del estudio	41
	• Universo de trabajo	41
	• Descripción de las variables	41
	• Descripción operativa	42
	• Criterios de selección	43
	• Procedimientos	44
VII.	Consideraciones éticas	49

VIII.	Recursos para el estudio	50
IX.	Cronograma de actividades	51
X.	Resultados	52

PARTE 3. DISCUSION Y CONCLUSIONES

XI.	Discusión	63
XII.	Conclusiones	66
XIII.	Bibliografía	67
XIV.	Anexos	69

PARTE I

ANTECEDENTES

Introducción

Las verrugas virales son proliferaciones benignas de la piel y las mucosas que son causadas por el virus del papiloma humano (VPH).

Hasta el momento han sido identificados más de 100 diferentes tipos de VPH, teniendo algunos de ellos predilección por presentarse en sitios anatómicos particulares; sin embargo, las verrugas y el VPH pueden ocurrir en cualquier parte.

Su transmisión se lleva a cabo por contacto directo de persona a persona, siendo uno de sus factores predisponentes de mayor importancia: la pérdida de la continuidad de la barrera epitelial. El tratamiento suele ser difícil por las frecuentes fallas y recidivas, sin embargo muchas verrugas suelen remitir en forma espontánea en un período aproximado de 1-2 años.

La infección está confinada al epitelio y no presenta diseminación sistémica del patógeno. La replicación ocurre en células epiteliales diferenciadas del estrato superior, sin embargo partículas virales pueden ser encontradas en la capa basal. Desafortunadamente un pequeño subgrupo de VPH se encuentra asociado al desarrollo de neoplasias malignas (tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 35) más comúnmente vista en pacientes con verrugas genitales y en inmunocomprometidos (ej. VIH, receptores de transplantes etc), mientras que los tipos 5, 8, 20 y 47 tienen potencial oncogénico en pacientes con epidermodisplasia verruciforme.²

RESUMEN

INTRODUCCION. Las verrugas virales son proliferaciones benignas de la piel y las mucosas causadas por el virus del papiloma humano (VPH). Han sido identificados más de 100 diferentes tipos de VPH y su tratamiento suele ser difícil por las frecuentes fallas y recidivas.

Los miembros de la familia TLR- 7, 8 y 9 están filogenéticamente relacionados por la similitud de su estructura y a que son activados por compuestos ácido-ribonucleicos o sus análogos. Su activación origina la producción de citocinas inflamatorias (IFN- α , IFN- β , IL-6, IL-12, FNT- α), regulación de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86), del MCH y receptores de quimiocinas (CCR7), dirigidas al reconocimiento de agentes virales y a su eliminación del organismo. El imiquimod crema al 5% es miembro de una nueva clase de modificadores de la respuesta inmune, es un ligando específico de estos receptores y actualmente encuentra recomendado para el tratamiento de verrugas en genitales.

JUSTIFICACION: El presente estudio se lleva a cabo con el fin de entender mejor los mecanismos de acción de imiquimod crema al 5% en el tratamiento de verrugas vulgares, y a su vez, se pretende determinar si los niveles de expresión de TLR-7 y/o 8 podrían ser un marcador que permita estratificar a los pacientes con verrugas en bueno, regular o pobre respondedor a un medicamento como el imiquimod al 5%; como el conocer si la expresión de dichos receptores puede ser de utilidad como un factor molecular de evaluación del tratamiento y pronóstico de respuesta al tratamiento.

OBJETIVOS: Determinar si hay diferencias en la expresión de TLR-7 y TLR-8 en de piel de portadores de verrugas vulgares inmunosuprimidos como inmunocompetentes y compararlos con controles sanos sin verrugas. Determinar si existe relación a mayor expresión de los niveles de TLR 7 y 8 con la mejoría o curación clínica en pacientes portadores de verrugas vulgares inmunosuprimidos e inmunocompetentes después del tratamiento de imiquimod crema al 5% durante 16 semanas. Evaluar la utilidad de la determinación de la expresión de TLR-7 y 8 en piel como marcadores moleculares en la estratificación de los pacientes con verrugas y /o como marcadores para evaluar la curación y el pronóstico.

HIPOTESIS: Los niveles de expresión de TLR-7 y 8 se encuentran disminuidos en los pacientes con verrugas vulgares en comparación con pacientes sanos. Después de tratamiento con imiquimod crema al 5% los pacientes que expresen en mayor proporción los TLR- 7 y 8 presentarán eliminación clínica de la verruga y la ausencia de recidivas.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se realizará un estudio prospectivo, comparativo, longitudinal (cohorte longitudinal), donde se incluirán biopsias de piel por punch de pacientes inmunosuprimidos e

inmunocompetentes que serán comparadas con biopsias de voluntarios sanos. Las muestras serán sometidas a PCR en tiempo real para poder determinar la expresión de TLR-7 y 8.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Las diferencias en la expresión de los receptores entre los diferentes grupos, así como las diferencias de la expresión en relación a la mejoría clínica se realizarán en el programa SPSS® Versión 10.0 con la prueba ANOVA y prueba Post hoc Turkey.

RESULTADOS: 27 pacientes con verrugas vulgares, 12 inmunosuprimidos (grupo A) y 15 (grupo B) a pacientes inmunocompetentes. La expresión de TLR- 7 y 8 de los grupos A y B fue comparada con la piel de 10 voluntarios sanos (Grupo C).

La expresión TLR- 7 en el grupo vs el grupo B no resultó significativa ($p= 0.997$). Pero la diferencia de expresión fue relevante al comparar el grupo A con los controles ($p <0.005$), al igual que la diferencia entre grupo B contra el C ($p= 0.002$). Para TLR- 8 las medias de expresión de los grupos A vs B, A vs C y B vs C ($p = 0.675$, $p = 0.734$ y $p = 0.675$), en ninguno de los tres casos mostró significancia estadística.

La respuesta clínica en el grupo A: 2 casos con mejoría clínica completa (16.6%), 3 mejoría parcial (2%) y 7 pacientes no mejoraron (58.3%). En el grupo B; 5 pacientes curaron en forma completa (33.3%), 4 tuvieron mejoría parcial (26.6%) y 6 sin respuesta (40%).

La comparación entre la mejoría clínica en grupo A contra el B contra la expresión de los receptores TLR-7 no se mostró diferencias, con un valor de $p=1.0$. Al igual que los no respondedores del los grupos A y B ($p=0.995$) En cuanto a TLR- 8, la mayor expresión se encontró entre los pacientes inmunosuprimidos sin respuesta al tratamiento, y el último los inmunosuprimidos sin respuesta (A vs B con respuesta y A vs B sin respuesta es de $p=0.999$ y $p=0.452$ respectivamente).

Los efectos adversos más frecuentes fueron: eritema ($n= 6$), dolor de tipo ardoroso ($n= 3$) y prurito ($n= 3$), no ameritando en ningún caso suspensión del tratamiento.

COMENTARIO: Este es el primer estudio realizado en nuestro país que correlaciona la expresión de este tipo de receptores (con una técnica recientemente estandarizada) con un medicamento (Imiquimod crema al 5%) .Se trata de un estudio piloto con pocos pacientes que ameritará extensión y la inclusión de una población más heterogénea y la determinación de la carga viral para poder llevar cabo comparaciones con lo reportado en la literatura por otros autores.

CONCLUSIONES: El imiquimod 5% crema es un medicamento modificador de la respuesta inmune utilizado en muchas dermatosis, útil en verrugas genitales, con escasos efectos adversos pero no demostrando en este estudio ser un medicamento eficaz pueda sustituir a los tratamiento de primera elección.

MARCO TEORICO

Las verrugas virales son proliferaciones benignas de la piel y las mucosas que son causadas por el virus del papiloma humano (VPH).

Hasta el momento han sido identificados más de 100 diferentes tipos de VPH, teniendo algunos de ellos predilección por presentarse en sitios anatómicos particulares; sin embargo, las verrugas y el VPH pueden ocurrir en cualquier parte.

Su transmisión se lleva a cabo por contacto directo de persona a persona, siendo uno de sus factores predisponentes de mayor importancia: la pérdida de la continuidad de la barrera epitelial. El tratamiento suele ser difícil por las frecuentes fallas y recidivas, sin embargo muchas verrugas suelen remitir en forma espontánea en un período aproximado de 1-2 años.

La infección está confinada al epitelio y no presenta diseminación sistémica del patógeno. La replicación ocurre en células epiteliales diferenciadas del estrato superior, sin embargo partículas virales pueden ser encontradas en la capa basal. Desafortunadamente un pequeño subgrupo de VPH se encuentra asociado al desarrollo de neoplasias malignas (tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 35) más comúnmente vista en pacientes con verrugas genitales y en inmunocomprometidos (ej. VIH, receptores de transplantes etc), mientras que los tipos 5, 8, 20 y 47 tienen potencial oncogénico en pacientes con epidermodisplasia verruciforme.²

Epidemiología

Muchas personas pueden experimentar infección con VPH en algún momento de su vida. En niños y adolescentes se encuentran en el tercer lugar de la consulta dermatológica (3.9% y 4.9% respectivamente). Mientras que otras estadísticas mencionan porcentajes que van del 3- 20% y un 3.5% en adultos con un rango de edad entre 25- 34 años.³

A pesar de que el VPH es ubicuo hay predilección de afección por las personas de

raza blanca, como ha sido demostrado en estudios que los comparan con otros grupos étnicos.³

Es una entidad muy común en pacientes crónicamente inmunosuprimidos, varios estudios han revelado una alta prevalencia de verrugas vulgares que va desde el 17.5 al 87.7% de pacientes con transplantes alogénicos.⁴ Mientras que en pacientes portadores del VIH (con CD4 < 224 mm³) la prevalencia reportada va del 3.3 – 11.2%.⁵ En los receptores de transplante renal las verrugas vulgares aparecen en un 50% de los pacientes al año y del 77 al 95% a los 5 años.⁹

Fisiopatología del VPH

El VPH es un virión de 55 nm de diámetro, su cápside le proporciona una envoltura que lo hace muy estable e infeccioso inclusive por años, motivo por el cual puede ser resistente a muchos agentes terapéuticos. Su ADN está compuesto de 8000 pares de bases de nucleótidos que codifican 8 genes: E (“early”, seis genes E1., E2 y E4-7) y L (“late”, dos genes, L1 y L2)¹. Los genes E interfieren con la regulación del ciclo celular, lo cual está relacionado con la transformación tumoral (fenotipos malignos E5-7), la replicación/ expresión del genomas (E1, E2) y la liberación del virus (E4). Los genes L codifican proteínas que forman la cápside.^{1,2} El hecho de que su ciclo vital se lleve a cabo sólo en epitelios escamosos ha impedido su estudio en cultivos de líneas celulares, donde la expresión de los genes tardíos y la producción de los viriones no ocurre (Fig. 1).

La infección e inducción de la hiperproliferación se inician cuando el virus entra en las células basales epiteliales. Esta capa de células normalmente no es accesible a los virus debido a la barrera mecánica formada por las capas celulares de las células diferenciadas. El receptor que media la unión del virus a las células epiteliales no se ha identificado definitivamente, pero la unión parece depender de la proteína principal de la cápside (L1) y el heparán sulfato de la superficie celular. Una vez unido, la proteína menor (L2) puede

reforzar la infección uniéndose de manera específica a proteínas de la superficie celular y facilitando la entrada del virus. Al dividirse las células basales infectadas, algunas emigrarán a la superficie y otras permanecerán creando un reservorio de ADN a largo plazo².

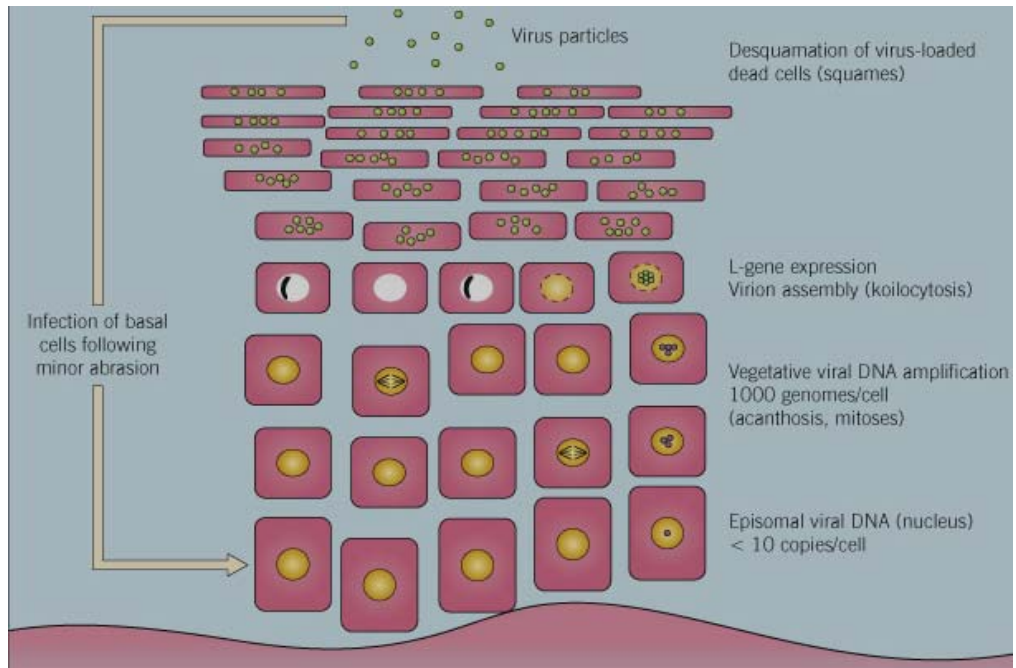


FIG. 1. CICLO VITAL DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO 2

Inmunología del virus del papiloma humano

La adquisición del VPH resulta en una infección de duración variable la cual puede estar o no asociada con lesiones clínicamente aparentes.

La piel funciona principalmente como una barrera mecánica, pero en la actualidad se sabe que tiene un papel mucho más complejo en la inmunidad celular. Los queratinocitos, constitutivamente secretan bajos niveles de una variedad de citocinas, incluidas las citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas, capaces de inducir una gran variedad de estímulos.

Dentro de la respuesta inmune innata hay una gran cantidad de citocinas que son consideradas como importantes por sus efectos antivirales y antiproliferativos, estas incluyen al TGF- β , el FNT y los IFN tipo I (α y β). Un gran número de estudios ha investigado la utilidad de las citocinas como TGF- β , el TNF y los interferones en la inhibición de la proliferación in vitro de queratinocitos infectados por el VPH, así como la inhibición de la expresión de algunos genes de este virus (E6 y E7).^{6,7}

Una de las evidencias de mayor peso para la asociación entre los defectos de la respuesta celular inmune y la infección por el VPH es la presencia de esta dermatosis en porcentajes elevados en las personas con VIH. Tales individuos tienen una prevalencia incrementada, la persistencia de lesiones anogenitales y la infección por serotipos con mayor potencial oncogénico; sin embargo la asociación entre los marcadores de la etapa del VIH (conteo de CD4 y la carga viral) y el VPH han sido inconstantes. Muchos estudios han sugerido que estadios más avanzados de la enfermedad y un gran déficit inmunológico se encuentran asociados con una alta prevalencia y persistencia de esta entidad.⁷ Los diferentes componentes involucrados en el reconocimiento y las fases efectoras de la respuesta adaptativa han sido demostrados en la infección del VPH en piel y mucosas. Estos incluyen a las células de Langerhans, las cuales capturan el antígeno para transportarlo a ganglio linfático regional y presentarlo a las células T, para dar lugar a una expansión clonal que van hacia los tejidos infectados por mecanismos que involucran a las quimiocinas, moléculas de adhesión y otros grupos celulares como lo son los macrófagos.

La respuesta inmune adaptativa al VPH debe ser considerada en términos de estas dos fases (reconocimiento y efectora).⁶ En la fase efectora las citocinas particularmente importantes con la IL- 1 α , IL- 1- β y FNT, todas encargadas de promover la migración de las células de Langerhans y la producción de IL- 10, producida por los queratinocitos. Por lo tanto una posible asociación entre los déficits en la producción de estas citocinas y la presencia de VPH ha sido postulado. La posibilidad de que el VPH tenga varios mecanismos para evadir la respuesta celular inmune también ha sido sugerida. El primero de ellos pudiera involucrar mecanismos que limitan la extensión de los antígenos virales que expondrían al virus a reconocimiento inmunológico. EL VPH por lo tanto retarda la expresión de abundantes proteínas virales hasta la etapa de diferenciación terminal en el epitelio escamoso, esta localización anatómica tan superficial hace que las células del sistema inmune tengan menos acceso al agente infeccioso. El segundo mecanismo involucra proteínas como la E7, donde su sobreexpresión puede inhibir la capacidad presentadora de antígenos de las células dendríticas en los epitelios, y por último, que los queratinocitos pueden ser relativamente menos susceptibles a la lisis mediada por células T. Desafortunadamente el papel que juegan todos estos mecanismos contiene información que aún se encuentra en la especulación.⁶

Hallazgos clínicos

Los tipos cutáneos y mucosos del VPH forman dos grupos distintos, según infecten la piel o las mucosas. Sin embargo, el tropismo de virus no es absoluto, puesto que se puede encontrar ADN de tipos cutáneos en verrugas genitales y orales, y en casos raros se pueden asociar tipo mucosos a lesiones cutáneas. Las manifestaciones clínicas dependen del tipo de VPH implicado, de la localización anatómica y de la situación inmunológica del huésped.^{1, 5, 8} Entre los tipos cutáneos se incluye un pequeño grupo de virus que infectan

la piel y producen verrugas vulgares, verrugas palmares y plantares, verrugas en mosaico, verrugas planas y verrugas del carnicero.

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

Las verrugas vulgares aparecen como neoformaciones papulares o nodulares, hiperqueratóticas, cupuliformes y con una superficie irregular. Se localizan a menudo en dedos (Fig. 2), la superficie dorsal de las manos y otras zonas que sufren traumatismos, como las rodillas y los codos.^{1, 8}

Las verrugas palmoplantares son pápulas endofíticas con una depresión central que recuerda a un hormiguero, de ahí viene el nombre de *mimercia* (Fig 3 y 4). En las plantas son dolorosas a la deambulaci3n debido al crecimiento endofítico. Cuando las lesiones plantares confluyen para dar lugar a grandes placas reciben el nombre de *verrugas en mosaico*.



Fig. 2 VERRUGAS PERIUNGUEALES



Fig. 3 VERRUGAS PALMARES



Fig. 4 VERRUGAS PLANTARES

Las verrugas planas habitualmente están producidas por los tipos 3 y 10, se encuentran constituidas por pequeñas pápulas del color de la piel o rojizas, superficie lisa discretamente elevada y planas, pueden presentarse en número pequeño o en cientos que se agrupan o confluyen. Los sitios de predilección son la cara, las manos y brazos.

Pueden aparecer con distribución lineal como resultado del rascado o un traumatismo (fenómeno de Koebner).^{1,8} Las verrugas del carnicero, que deben su nombre a su presentación en profesionales que procesan carne, son neoformaciones de aspecto verrugoso, gran tamaño o lesiones en forma de coliflor que suelen localizarse en dorso de la mano, palma, bordes periungueales o dedos y se asocian con infección por el VPH 7.

La epidermodisplasia verruciforme, es una entidad rara, que se hereda en forma autosómica recesiva que se caracteriza por una susceptibilidad especial a las infecciones cutáneas por un grupo de VPH relacionados filogenéticamente, conocidos como tipo EDV. Las verrugas vulgares son comúnmente asintomáticas, pero pueden causar desfiguración cosmética o dolor, no así, en el caso de las verrugas plantares donde el dolor que producen puede llegar a ser tan intenso que dificulte o impida la deambulación. Los pacientes inmunosuprimidos incapaces de generar una adecuada respuesta inmune mediada por células (Th1) se consideran como susceptibles a contraer la infección por el VPH y pueden desarrollar verrugas virales de gran tamaño. Estas lesiones son regularmente múltiples, recalcitrantes y dolorosas y en raras ocasiones presentan involución espontánea.^{8,9}

Los cambios malignos en las verrugas no genitales son raros pero han sido reportados (carcinoma verrugoso), considerado como un carcinoma de células escamosas bien diferenciado que muestra un patrón de crecimiento lento e invasión local que fácilmente puede ser confundido con una verruga vulgar y manejarse como tal por años. Aunque este tipo de cáncer en raras ocasiones metastatiza su importancia radica en que puede ser localmente muy destructivo.²

Diagnóstico

El diagnóstico de las verrugas vulgares es clínico pero en caso de duda podemos apoyarnos del estudio histopatológico, los hallazgos consisten en acantosis epidérmica evidente con papilomatosis, áreas de orto y paraqueratosis, hipergranulosis, elongación de procesos interpapilares, capilares prominentes, tortuosos y trombosados. Puede haber queratinocitos con núcleo picnótico rodeados por una halo perinuclear (coilocitos, característicos de los papilomas asociados a VPH) en o inmediatamente por debajo del estrato granuloso.¹⁰

La detección inmunohistoquímica de las proteínas estructurales del VPH puede confirmar la presencia del virus en la lesión pero desafortunadamente tiene baja sensibilidad. Mientras que la identificación del ADN viral usando Southern blot es la técnica más sensible y específica para identificar el tipo específico de VPH presente en el tejido.

La reacción de polimerasa en cadena puede ser usada para amplificar el ADN viral, pero aunque el VPH puede ser detectado en lesiones recientes, no es de utilidad para lesiones de mayor tiempo de evolución.

Tratamiento

No existe un tratamiento considerado 100% efectivo (Fig. 5) y por lo tanto en muchas de las ocasiones es necesaria la administración en forma combinada.

Debemos inclusive tomar en cuenta que si el paciente así lo desea puede adoptarse sólo una actitud expectante en búsqueda de la involución espontánea, no recomendable para el caso de las lesiones plantares por el dolor que suelen provocar o en inmunosuprimidos donde esta regresión no suele ocurrir.¹¹

Los tratamientos ablativos comprenden: al ácido salicílico, la crioterapia, el curetaje y láser.

El ácido salicílico es un agente queratolítico que actúa lentamente destruyendo la epidermis infectada por el virus. El resultado es una irritación moderada que puede estimular

la respuesta inmune. En un estudio realizado por Sterling y colaboradores se demostró que el ácido salicílico sólo produjo una mejoría de las lesiones en un 67% de los casos con verrugas en manos y un 84% en aquéllos con verrugas plantares en 12 semanas.¹¹

Existen varias presentaciones disponibles pero hay poca información que compare la eficacia entre las diferentes preparaciones (ácido salicílico/ ácido láctico 11- 17% en colodión elástico, ácido salicílico al 26% en una base poliacrílico oclusiva, ácido salicílico al 25% con podofilina en ungüento y ácido salicílico al 50% en ungüento).¹²

La crioterapia también se encuentra en la modalidad ablativo, el nitrógeno líquido es el agente más comúnmente usado.¹¹

La destrucción de las verrugas por congelamiento cada 3 semanas puede producir curación de verrugas en manos en un 69% de los casos en aproximadamente 12 semanas. El intervalo ideal entre los ciclos es incierto, el estudio Bunney demostró que el intervalo por arriba de 3 semanas reduce la tasa de curación a 12 semanas, otros han mostrado que la remisión es dependiente del número de tratamientos, así que las aplicaciones semanales resultan en una mejoría más rápida.¹³

La remoción quirúrgica de las verrugas es ampliamente practicada, particularmente por medio de curetaje seguido de cauterización. Es particularmente útil para las verrugas filiformes de cara o extremidades. La curación es hasta el 65- 85%, sin embargo la formación de cicatrices es usual después del procedimiento y las recurrencias son hasta del 30%.¹¹ La destrucción producida por el láser de CO2 es empleada en verrugas periungueales y subungueales difíciles de erradicar con métodos convencionales. El porcentaje de curación va del 64- 71% a los 12 meses, pero el dolor posoperatorio y la cicatrización suelen presentarse, disminuyendo la sintomatología cuando se emplea el láser con luz pulsada.¹⁴

Tratamientos antimetabólicos comprenden a la podofilina/ podofilotoxina y la bleomicina entre los principales.

La podofilitoxina contiene el ingrediente activo de la podofilina que actúa como un agente antimitótico dando por resultado en un bloqueo de la división celular. Es usado ampliamente para verrugas anogenitales, pero su penetración es pobre en sitios con estrato córneo de mayor grosor.¹⁴

La bleomicina intralesional que es un agente citotóxico se ha empleado para tratar verrugas que no han respondido a agentes de primera línea. En algunos estudios se ha utilizado en inyección intralesional a concentraciones de 250- 1000 U/ mL con porcentajes de respuesta que van del 31% al 100%. Sin embargo el dolor que produce la aplicación es el principal factor limitante para su uso, ameritando en la gran mayoría de los casos aplicación de algún anestésico previo al procedimiento, además de la cicatrización, hiperpigmentación y alteraciones ungueales que puede provocar.¹⁵

Otros tratamientos:

Tratamientos virucidas: Formaldehído y glutaraldehído

Inmunoestimulación: Dinitroclorobenceno, cimetidina.¹¹

Strength of evidence	Treatment	Suggested method of use
A, I	Cryotherapy	15–20 s single or double freeze of warts, every 3–4 weeks
B, I	Photodynamic therapy	3 treatments: 20% topical amino-laesulinic acid + irradiation
B, II ii	Salicylic acid (SA)	Daily application of 15–20% SA in suitable base, 25–50% SA may be used cautiously on plantar warts, 2–5% SA cream may be used for plane face warts.
	Bleomycin	Single intralesional delivery
	Retinoids	Topical: 0.05% tretinoin cream daily Systemic: 1 mg/kg/day acitretin for 3 months
C, II ii	Formaldehyde	Daily application of 0.7% gel or 3% solution as short soak for mosaic plantar warts
C, III	Thermo-cautery	Single surgical removal of wart; risk of scarring
	Glutaraldehyde	Daily application of 10–20% in suitable base.
C, IV	Chemical cautery	Twice weekly application
	CO ₂ laser	Single treatment
	Pulsed dye laser	Single treatment
	Topical sensitization	Sensitization with 2% diphenylpyrone, then weekly application of appropriate dilution of the allergen.
D, I	Cimetidine, oral	Up to 40 mg/kg/day for 3 months
	Homeopathy	
Insufficient evidence	Podophyllin	
	Folk remedies	
	Hypnosis	
	Heat treatment	
	Interferon	
	Imiquimod	

Fig. 5 TRATAMIENTOS PARA VERRUGAS VULGARES Y SU EVIDENCIA CLINICA

Modificadores de la respuesta inmune:

El imiquimod crema al 5% pertenece a una nueva clase de modificadores de la respuesta inmune, está indicado en el tratamiento de verrugas en genitales y actualmente está considerado como la primera línea de tratamiento en esta condición, es una imidizoquinolinona (1- (2 metilpropil)- IH- imidazo [4,5-c] quinolin- 4- amina (Fig 6) que se encuentra disponible en EUA, Europa y muchas ciudades de América Latina incluyendo nuestro país comercialmente con el nombre de Aldara® crema al 5% que contiene 50 mg de imiquimod en una base de aceite en agua. ¹⁶

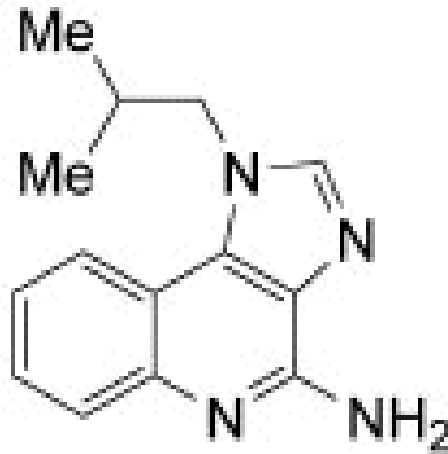


FIG. 6 ESTRUCTURA QUIMICA DEL IMIQUIMOD¹⁶

Este medicamento estimula la respuesta inmune innata por medio de la inducción, síntesis y liberación de citocinas específicas (Fig 7). La inducción del interferón (IFN) – α por el imiquimod se ha observado tanto en animales como en humanos. ¹⁶ También afecta otros aspectos de la respuesta innata en modelos animales, como son la actividad de las células asesinas naturales, activación de macrófagos para la secreción de citocinas y óxido nítrico y la inducción de proliferación y diferenciación de linfocitos B.

La respuesta inmune adquirida contiene tanto inmunidad humoral como celular. El

imiquimod estimula predominantemente la respuesta celular incrementando la producción de citocinas Th1 como el INF- γ debido a su unión a dos receptores que son TLR-7 y 8, de los cuales el imiquimod es un ligando específico. También inhibe parte de la respuesta humoral ya que el IFN inducido por este agente es capaz de inhibir la producción de citocinas de tipo Th2 (IL-4 e I-5).^{16, 17}

De igual importancia es su efecto sobre la activación de las células de Langerhans, la célula presentadora de antígenos más importante de la epidermis (CPA). Induce la producción de citocinas y estimula la migración de éstas células al ganglio linfático regional, potencialmente aumentando la presentación de antígenos a las células T.

La acción del imiquimod al estimular la respuesta inmune da por resultado una potente acción antiviral, antitumoral y propiedades inmunorreguladoras.^{17, 18, 19}

Cytokine	Designation	Putative actions
Interferon α	IFN- α	Antiviral
Interferon γ	IFN- γ	Antiviral
Interleukin 1	IL-1	Lymphocyte stimulation
Interleukin 5	IL-5	B-cell growth and activation
Interleukin 6	IL-6	NK cell activation
Interleukin 8	IL-8	T-lymphocyte, neutrophil attraction
Interleukin 10	IL-10	B-cell activation
Interleukin 12	IL-12	NK cell activation; Interferon γ production
Interleukin 1 receptor antagonist	IL-1RA	IL-1 inhibition
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	GM-CSF	Mimics actions of IFN- γ
Macrophage inflammatory protein	MIP1 α,β	Macrophage activation
Macrophage chemotactic protein	MCP-1	Macrophage attraction
Tumor necrosis factor- α	TNF- α	Interferon-like protective effects Stimulates cytokine production Tumor-killing by macrophages

Fig. 7 EFECTOS INMUNOREGULADORES DEL IMIQUIMOD.¹⁷

Puesto que el imiquimod tiene la capacidad de regular la respuesta inmune, también puede ser una opción potencial de tratamiento para enfermedades cutáneas que se encuentren asociadas a otros tipos de virus como los que causan las verrugas extragenitales y los poxvirus.

Las verrugas vulgares, las cuales se encuentran asociadas principalmente a VPH 2, 4 y 7 parecen responder a la terapia con imiquimod. En un ensayo clínico en pacientes con verrugas vulgares tratados con imiquimod crema 5% una vez al día por 5 días de cada semana durante 16 semanas los resultados mostraron que de 50 pacientes, 28 (56%) experimentaron remisión completa o reducción > 50% después de 9.2 semanas de tratamiento, sin recurrencias en el área tratada durante un seguimiento de 32 semanas.¹⁸

En población pediátrica también han reportado resultados eficaces. En un estudio que incluyó 18 niños con verrugas recalcitrantes de más de 2 años de evolución se presentó una mejoría completa en 16 de ellos 88.9%, sólo con 2 recurrencias posterior al seguimiento.²⁰ En la actualidad sin embargo hay una gran cantidad de padecimiento cutáneos en los cuales este medicamento ha mostrado utilidad (Fig. 8)²¹

ENFERMEDAD	% DE RESCRIPCION
Verrugas	
Vulgares	38.8
Plantares	16.1
Extragenitales	13.1
Planas	3.4
Molusco	8.6
Carcinoma basocelular	12.1
Queratosis actínicas	6.1
Vitiligo	0.6
Alopecia areata	0.3
Carcinoma de células escamosas	0.4
Herpes simple	0.3
Otras	0.3

Fig. 8 DERMATOSIS TRATADAS CON IMIQUIMOD AL 5%²¹

Receptores tipo Toll (TLRs)

Un requerimiento fundamental para cualquier sistema inmune es la capacidad de reconocer la invasión por algún agente patógeno dentro de los tejidos. En respuesta a esta exposición a patógenos el huésped emplea tanto al sistema inmune innato y adaptativo que lo protegen contra esa infección.

La respuesta innata utiliza barreras físicas tales como la piel y las mucosas dando lugar a una respuesta rápida mediada por células dendríticas (CD), Asesinas naturales (NK), granulocitos y células epiteliales. Estas células expresan receptores de reconocimiento que median la respuesta a patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP). Los receptores humanos tipo Toll (TLRs) son un subgrupo de esta gran familia de receptores de reconocimiento capaces de iniciar la respuesta inmune innata e influir posteriormente en las respuesta de tipo adaptativo.

Se describieron inicialmente en la mosca *Drosophila melanogaster*, son una familia de proteínas transmembrana cuya función es el reconocimiento de los PAMPs (pathogen-associated molecular patterns, Fig. 9).^{22, 23}

La importancia de este descubrimiento radica en la confirmación de que los TLRs están involucrados en la respuesta inmune innata. Se han descrito hasta el momento 10 TLRs en humanos (Fig. 10), como ya se comentó son proteínas transmembrana con un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (N-terminal), un dominio transmembrana y uno intracelular denominado TIR (C-terminal), el cual es similar al dominio intracelular del receptor de interleucina- 1 (IL-1). Se expresan tanto en tejido linfóide como no linfóide (Fig.11). TLR1 se expresa en monocitos, neutrófilos, células B y células asesinas naturales. TLR2 en monocitos, neutrófilos y células dendríticas. TLR3 en células dendríticas. TLR4 en monocitos, neutrófilos, células dendríticas y endoteliales. TLR5 en monocitos y células

dendríticas. El resto de TLRs se expresan fundamentalmente en monocitos y células dendríticas

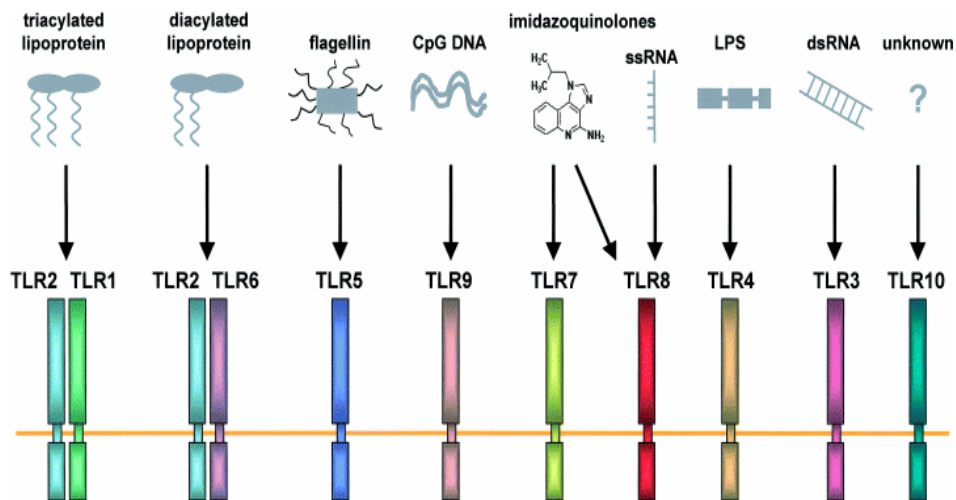


FIG 9. ESPECIFICIDAD DE LOS TLRs Y SU RECONOCIMIENTO DE PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATOGENOS Y/O COMPONENTES SINTETICOS²⁷.

TLR1	Triacyl lipopeptides
TLR2	Lipoproteins Peptidoglycan Lipoteichoic acid Lipoarabinomannan Porins Zymosan
TLR3	Viral double-stranded RNA
TLR4	Lipopolysaccharide Respiratory syncytial virus fusion protein
TLR5	Flagellin
TLR6	Diacyl lipopeptides Lipoteichoic acid Zymosan
TLR7/8	Viral single-stranded RNA Synthetic materials (Imidazoquinoline, Bropirimine, Loxoribine)
TLR9	Unmethylated CpG containing DNA
TLR10	?

FIG 10. LIGANDOS SINTÉTICOS Y MICROBIANOS PARA LOS TLRs²⁴

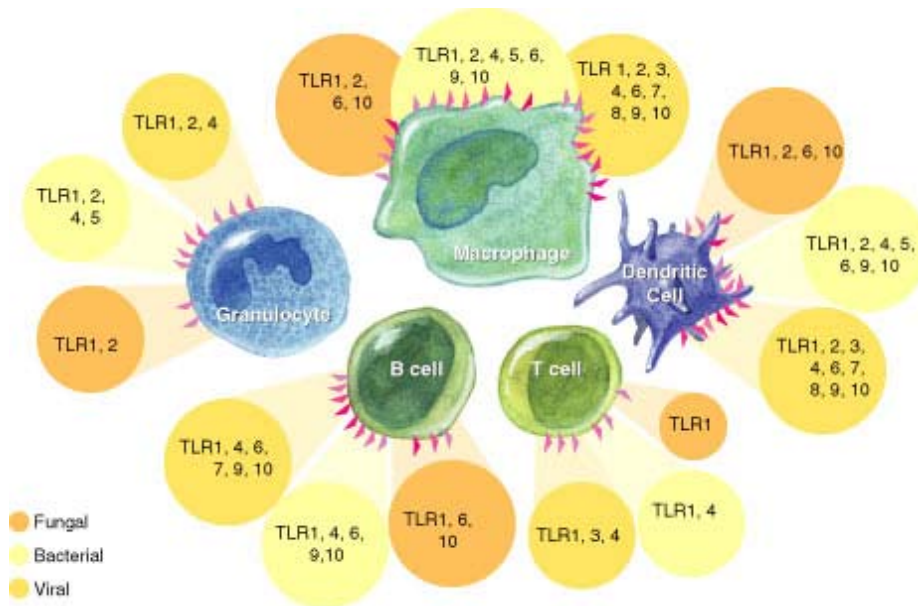


FIG. 11 EXPRESION DE LOS TLRs EN DIFERENTES POBLACIONES CELULARES

Los miembros de la familia TLR7, TLR-8 y TLR-9 se encuentran filogenéticamente relacionados debido a las similitudes de su estructura genómica, son activados por compuestos ácido ribonucleicos o análogos de éstas moléculas. La activación de TLR7 se traduce en la producción de varias citocinas inflamatorias (IFN- α , IFN- β , IL-6, IL-12, FNT- α), regulación de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), del complejo mayor de histocompatibilidad y receptores de quimiocinas (CCR7). En humanos TLR7 se expresa sólo en unas especies celulares como lo son las células dendríticas y los linfocitos B.²⁵

La activación de TLRs contribuye a la respuesta inflamatoria del huésped gracias a la transcripción de genes inmunomoduladores (Fig. 12), incluyendo genes de varias citocinas y quimiocinas, ambas son consideradas como detonantes dentro del proceso inflamatorio por medio del reclutamiento de células del sistema inmune del huésped y la

activación de defensas antimicrobianas. Aunque esta respuesta va encaminada a eliminar la infección en el individuo, la inflamación mediada por los TLRs puede también dar lugar a un daño excesivo a los tejidos y desencadenar choque séptico.²⁴

Más recientemente se ha demostrado que la activación de los TLRs también se encuentra involucrada en la fagocitosis de patógenos por las células del huésped.

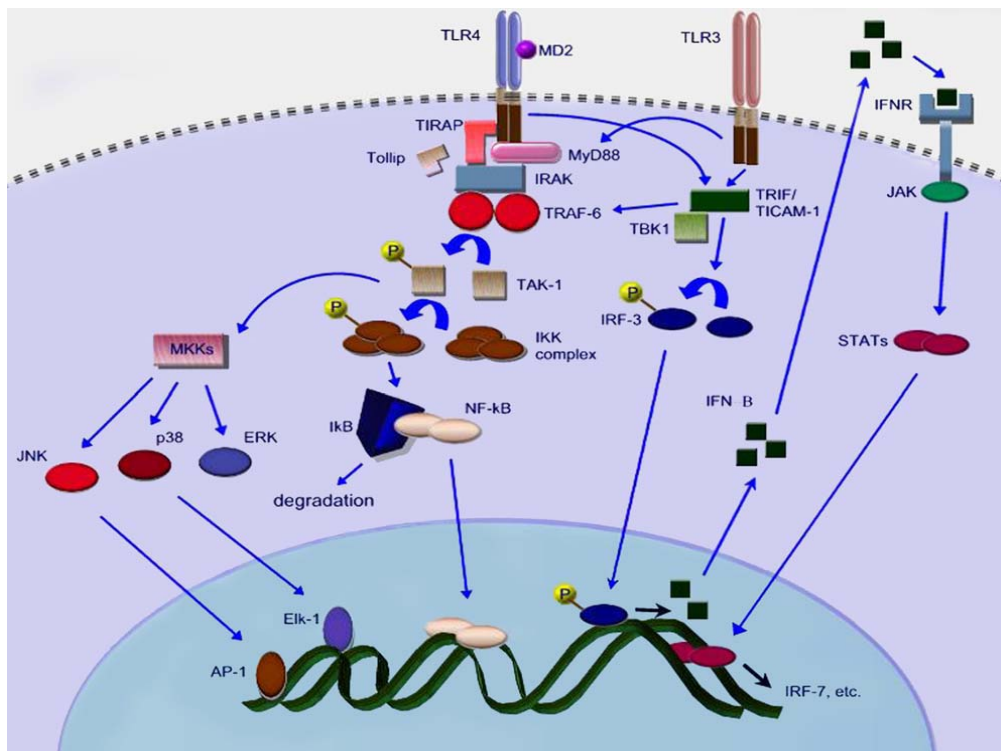


FIGURA 12. PASOS EN COMUN DE LOS TLRs²⁶

Expresión de TLRs en la piel

Tal y como ya se mencionó previamente, los TLRs se expresan en varias células de la respuesta inmune, dado que la piel es otra interfase crucial para el encuentro del huésped con los invasores, en este sitio también se expresan TLRs que complementan su trabajo como barrera ante las infecciones.^{26, 27}

Para el médico clínico las novedades en el ámbito de la biología molecular no siempre tienen relevancia en la práctica actual. Sin embargo el descubrimiento de los TLRs y los detalles sobre su cascada de señalización pueden ayudar al entendimiento de la fisiopatología de una gran cantidad de enfermedades.

La biología de los receptores tipo Toll parece estar íntimamente asociada con una gran cantidad de condiciones dermatológicas y sorprendentemente su compromiso no se encuentra limitado a condiciones de etiología infecciosa.

En acné vulgar: Las citocinas producidas por el potencial inflamatorio de *Propionibacterium acnes* favorecen la expresión de moléculas de adhesión y el reclutamiento de células inflamatorias como neutrófilos y linfocitos.

El receptor tipo Toll-2 se encuentra abundantemente expresado en los macrófagos que se encuentran a nivel perifolicular y peribulbar, así como la producción de IL-6, IL- 8 y 12 en respuesta a *P. acnes* que fue dependiente del receptor tipo Toll-2.

Las mutaciones de genes de este receptor favorecen a la adquisición de *M. avium*.

Los reportes más recientes sobre los retinoides revelan cierta capacidad antiinflamatoria disminuyendo la expresión local de los recetores tipo Toll-2 y de citocinas.

²⁸ En la lepra tuberculoide el organismo responde a la presencia de la micobacteria con una respuesta inmune de tipo celular encabezada por citocinas derivadas de linfocitos TH1 (IFN- gama, IL 12 e IL 18, macrófagos y factor estimulante de colonias dentro de las lesiones), mientras que la lepra lepromatosa está caracterizada por citocinas TH2 (IL-4 e IL-

10).

La primera evidencia del papel de los receptores tipo Toll 2 en la defensa contra la micobacteria fue presentada por Underhill, quien demostró activación de los macrófagos a través de los receptores tipo Toll 2 lleva a una diferenciación mielóide, con reclutamiento de monocitos y neutrófilos al foco infeccioso, inducción de fiebre y estimulación hepática para la producción de reactantes de fase aguda.

En pacientes afectados con lepra se ha logrado demostrar que 10 de cada 45 muestran mutaciones de este receptor, no elaborándose las citocinas proinflamatorias en forma adecuada, considerándose como paciente susceptibles para la infección de *M. leprae*.²⁹

En sífilis, el infiltrado celular que se presenta en el sitio de chancro inicial contiene predominantemente linfocitos (predominantemente TH1), macrófagos y células plasmáticas.

La evidencia señala los antígenos responsables capaces de desencadenar la activación de la respuesta inmune innata son los lipopéptidos en abundancia que expresa el microorganismo en su superficie.

Otro antígeno potencialmente reconocible por las células dendríticas es el flagelo de *T. pallidum* el cual está compuesto en gran parte por subunidades de flagelina polimerizada que es capaz de activar al receptor tipo Toll 5 traduciendo una activación de NF- κ B y la subsecuente producción de TNF alfa.²⁶

Entre los principales efectos de la radiación ultravioleta se encuentra la supresión del sistema inmune a nivel local y sistémico. A nivel local, las bajas dosis de radiación UV son capaces de repletar el número de células de Langerhans y de inhibir su potencial como células presentadoras de antígenos. Actualmente los modelos aceptados para este fenómeno implican que los altos niveles de IL-10 secretados por las células T son responsables de la inmunosupresión observada.

A nivel sistémico la radiación UV a altas dosis puede promover la elaboración de citocinas inmunosupresoras por los queratinocitos, más notablemente IL-10 y en menor

importancia TNF alfa, ambos en respuesta a antígenos a distancia desde el sitio de la exposición. Este efecto habitualmente es completamente reversible por la IL-12 una citocina antagonista de IL-10 producida por fagocitos mononucleares y células dendríticas.²⁶

En el caso de la Psoriasis no hay diferencias importantes en cuanto a la expresión de TLR. Sin embargo se notó que los receptores TLR2 parecieron expresarse más en la epidermis superior de los pacientes con psoriasis, mientras que la expresión de TLR2 se encontraba en la capa basal de la piel normal y de la piel sin lesiones. También la expresión de TLR5 se encontró disminuida en los queratinocitos de la capa basal de las lesiones en comparación con la piel normal.^{30, 31}

Para la enfermedad de Lyme, causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* se ha encontrado que uno de sus antígenos es capaz de estimular una respuesta inmune es una proteína de la superficie externa que es la lipoproteína A (OspA). Más recientemente se ha demostrado que los heterodímeros TLR1/2 son necesarios para reconocer OspA y proporcionar una respuesta inmune efectiva hacia *B. burgdorferi*. Los macrófagos de los pacientes que padecen la enfermedad aunque expresan niveles normales de TLR2, tienen una baja expresión de TLR1 en su superficie.³²

PARTE 2. INVESTIGACION

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En la actualidad no se conoce si existe una relación entre los niveles de expresión de TLR-7 y 8 con la susceptibilidad o con el grado de infección por VPH y por tanto con la aparición de verrugas.

El imiquimod al 5% (Aldara®) es un compuesto aprobado actualmente por la (FDA) para el tratamiento contra las verrugas, sus efectos como inmunorregulador empiezan a entenderse, sabiéndose hasta el momento que tiene capacidad de inducir la producción de citocinas proinflamatorias, citocinas antivirales y maduración de células de la respuesta inmune innata a través de los receptores tipo Toll 7 y 8 (TLR- 7 y 8) debido a que es un ligando específico de estos. Sin embargo, no se conoce si el imiquimod produce una mejor respuesta clínica en aquellos pacientes cuya expresión en piel de los TLRs-7 y 8 es mayor, si esto correlaciona con la erradicación del VPH y por lo tanto, con la eliminación clínica de la verruga y con la prevención de las recidivas.

OBJETIVOS

1. Determinar si existen diferencias en los niveles de expresión de TLR-7 y TLR-8 en biopsias de piel de pacientes portadores de verrugas vulgares tanto en pacientes inmunosuprimidos como inmunocompetentes.
2. Determinar si existen diferencias en los niveles de expresión de TLR-7 y TLR-8 en pacientes con verrugas vulgares inmunosuprimidos e inmunocompetentes comparados con biopsias de piel de voluntarios sanos.
3. Determinar si existe relación a mayor expresión de los niveles de TLR 7 y 8 con la mejoría o curación clínica en pacientes portadores de verrugas vulgares inmunosuprimidos e inmunocompetentes después de la aplicación de imiquimod crema al 5%.
4. Evaluar la utilidad de la determinación de la expresión de TLR-7 y 8 en piel como marcadores moleculares en la estratificación de los pacientes con verrugas y /o como marcadores para evaluar la curación y el pronóstico.

HIPOTESIS.

- **HIPOTESIS ALTERNA**

Los niveles de expresión de TLR-7 y 8 se encuentran disminuidos en los pacientes con verrugas vulgares inmunosuprimidos en comparación con pacientes inmunocompetentes con verrugas y ambos a su vez con sanos sin verrugas. Con el tratamiento con imiquimod crema 5% los pacientes que tengan una mayor expresión de

TLR-7 y 8 demostrarán una mejor respuesta clínica en comparación con los pacientes que presentan una menor expresión de estos receptores.

- **HIPOTESIS NULA**

Los niveles de expresión de TLR-7 y 8 no se encuentran disminuidos en los pacientes con verrugas vulgares (inmunosuprimidos e inmunocompetentes) en comparación con pacientes sanos sin verrugas. Con el tratamiento con imiquimod crema 5% los pacientes que tengan una mayor expresión de TLR -7 y 8 no demostrarán una mejor respuesta clínica en comparación con los pacientes que presentan una menor expresión de estos receptores.

JUSTIFICACION

El presente estudio se lleva a cabo con el fin de entender mejor los mecanismos de acción de imiquimod crema al 5% en el tratamiento de verrugas vulgares, y a su vez, se pretende determinar si los niveles de expresión de TLR-7 y/o 8 podrían ser un marcador que permita estratificar a los pacientes con verrugas en bueno, regular o pobre respondedor a un medicamento como el imiquimod al 5%; así también como el conocer si la expresión de dichos receptores puede ser de utilidad como un factor molecular de evaluación del tratamiento y pronóstico de respuesta al tratamiento y posibles recidivas.

El tratamiento efectivo y oportuno contra las verrugas también radica en evitar los altos costos que para las instituciones representa su manejo sobre todo por lo recidivante de la entidad en el grupo de pacientes inmunosuprimidos y aunque el porcentaje documentado en la literatura de transformación a carcinomas epidermoides es bajo, el erradicarlos en forma oportuna antes de su conversión a lesiones premalignas y malignas repercute favorablemente en la calidad de vida de estos grupos poblacionales.

La gran mayoría de los tratamientos disponibles en la actualidad originan dolor importante en los pacientes y tienen que ser en algunas ocasiones manejados previamente con anestésicos locales tópicos o intralesionales, el Imiquimod crema al 5% podría ser una buena opción de manejo, con escasos efectos adversos y que puede realizarse en el domicilio del paciente.

Sin embargo, para la elección del tratamiento óptimo se carecen de parámetros inmunológicos moleculares que permitan una mejor y más adecuada estratificación de los pacientes y que además permita evaluar y pronosticar el éxito de una terapia seleccionada, como lo es en este caso el Imiquimod crema al 5%.

MATERIALES Y METODOS

1.- Diseño del estudio:

Se realizará un estudio prospectivo, comparativo, longitudinal (cohorte longitudinal).

2.- Universo de trabajo:

Pacientes de ambos sexos, de 16 a 65 años (inmunocompetentes e inmunocomprometidos) con diagnóstico clínico de verrugas vulgares extraplantares, que acudan a la consulta externa de Dermatología del Hospital de Especialidades CMN. Siglo XXI, IMSS de septiembre del 2006 a junio del 2007.

3.- Descripción de las variables:

VARIABLE INDEPENDIENTE

Variable	Tipo	Descripción
Verruga vulgar	Cuantitativa discreta	Biopsia por punch de 3mm que incluya epidermis y dermis en inmunosuprimidos e inmunocompetentes
Piel de controles sanos	Cuantitativa discreta	Biopsia por punch de 3 mm de piel sana de un individuo sin antecedente de verrugas virales.
Tipo de tratamiento	Cualitativa nominal	Imiquimod crema al 5%, aplicación por las noches sobre la lesión en forma oclusiva con micropore.

VARIABLE DEPENDIENTE

Variable	Tipo	Descripción
Expresión de TLR 7 y 8 en piel con verruga de inmunocomprometidos e inmunocompetentes	Cuantitativa	Expresión de cada gen con el gen endógeno en unidades de fluorescencia
Expresión de TLR 7 y 8 en controles sanos	Cuantitativa	Expresión de cada gen con el gen endógeno en unidades de fluorescencia
Eficacia: Tiempo de mejoría o curación	Cualitativa	-Eliminación completa de la verruga -Disminución en el tamaño >50 % del inicial
Recidivas	Cuantitativa	-Porcentaje de pacientes con recidiva posterior a las 12 semanas de tratamiento.

Descripción operativa.

Receptores tipo Toll- 7 y 8 (TLRs 7 Y 8).

Receptores importantes de la respuesta inmune innata activados por imidazoquinolinas y RNA de cadena sencilla, evento que induce la síntesis de citocinas principalmente de tipo proinflamatorias y antivirales.

Verruga vulgar.

Neoformación epitelial benigna de la piel causada por el virus del papiloma humano.

Imiquimod.

Es una crema al 5%, de color blanco, sin olor, contiene en la solución ácido isoteárico, alcohol cetílico, alcohol estearílico, vaselina blanca, polisorbato 60, monoestearato de sorbitano, glicerina, goma de xantano, agua purificada, alcohol bencílico, metilparabeno y propilparabeno.

Eficacia.

Se considerará eficacia completa al tratamiento cuando se presente una remisión clínica total del tamaño de la verruga o parcial cuando esta reducción sea mayor al 50% con respecto a la medición inicial de su tamaño.

4.-Selección de la muestra:**Criterios de Selección:**

A).- Criterios de inclusión: pacientes de ambos sexos de 16- 65 años con verrugas vulgares inmunosuprimidos (LES, TR, TMO, HIV etc), pacientes no inmunosuprimidos con verrugas vulgares extraplantares y pacientes voluntarios.

B).- Criterios de no inclusión: pacientes menores de 16 años o mayores de 65 años. Embarazadas. Verrugas anogenitales, plantares y planas, pacientes con antecedente de hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de la analgesia intralesional (xilocaína o epinefrina) o al imiquimod crema 5%, pacientes que hayan recibido algún otro tratamiento para verrugas vulgares 4 semanas previas.

C).- Criterios de exclusión: pacientes que no acudan a citas programadas. Pacientes que no cumplan con el tratamiento.

5.- Procedimientos:

Se estudiarán pacientes de ambos sexos, de 16 a 65 años de edad, con verrugas vulgares sin tratamiento previo mínimo durante 4 semanas previas al inicio del estudio, a cada uno se le realizará historia clínica y exploración física donde de no existir contraindicación se incluirán en el estudio y previamente deberán firmar carta de consentimiento informado (anexo A).

Se formarán 3 grupos, el primero (Grupo A) con biopsias de piel portadora de verruga vulgar y de piel sin lesión de pacientes bajo algún tratamiento inmunosupresor (transplante renal, lupus, artritis reumatoide etc), el segundo grupo (Grupo B) estará conformado por biopsias de piel con verruga y sin verruga de pacientes sin patología asociada a inmunosupresión, la expresión de TLR en ambos grupos será comparada con la expresión de TLR 7 y 8 de biopsias de piel de pacientes controles sanos sin antecedente de verrugas a ningún nivel.

Los pacientes del grupo A y B recibirán como tratamiento imiquimod crema al 5% (en sobres) el cual deberá aplicar sobre la verruga o verrugas a tratar en forma diaria por las noches en cura oclusiva con micropore y al día siguiente lavará el área tratada. La aplicación de la crema se realizará por un periodo de 16 semanas.

A cada paciente portador de verrugas, en la primera consulta se le tomará biopsia de piel con sacabocado de 3mm (previa asepsia, antisepsia y analgesia intralesional con xilocaína con epinefrina al 2%) del sitio con lesión, posteriormente cada paciente acudirá en forma programada a control cada 4 semanas.

Para cada paciente se tendrá una hoja de recolección de datos (anexo B), donde se evaluarán los siguientes parámetros clínicos: topografía, número de lesiones, tamaño (se seleccionará una de las verrugas que será la más representativa de todas y se medirá su tamaño), se tomará además control iconográfico.

Se considerará respuesta al tratamiento cuando la verruga vulgar haya desaparecido al 100% o reducido su tamaño en por lo menos un 50% de la medición inicial y falla terapéutica cuando no exista mejoría, esta sea menor al 50% o se presente un incremento de tamaño.

Los efectos adversos se medirán con una escala análoga visual. (anexo B)

Extracción del RNA.

- Se agrega a 5 mg de tejido un mL de Trizol (Invitrogen) y se homogeniza suavemente.
- Se agregan 300 μ L de cloroformo calidad HPLC y se homogeniza durante 2 min en vortex a baja velocidad.
- Se centrifuga a 8000xg durante 15 min, al terminar se separa la fase acuosa que es donde se encuentra el RNA en la fase superior en otro tubo y se le adicionan 500 μ L de isopropanol calidad HPLC, se incuba 20min a 4°C o para mejorar rendimiento toda la noche.
- Después de la incubación se centrifuga a 8000 xg durante 10 min a 4° C se decanta el sobrenadante y se le adiciona 1mL de Etanol al 80% en agua DEPC, se centrifuga nuevamente 10min 4° C a 8000 xg, se decanta. Posteriormente se agrega Trizol y se homogeniza suavemente, se adicionan 300 μ L de cloroformo, se homogeniza por 2 min en vortex a baja velocidad. Transcurrido el tiempo de homogenización de la

muestra se centrifuga a 8000xg durante 15 min. Al terminar la centrifugación se separa la fase acuosa que es donde se encuentra el RNA y se encuentra en la fase superior en otro tubo y se le adicionan 500 μ L de isopropanol calidad HPLC, se incubaba 20min a 4°C o para mejorar rendimiento toda la noche.

Después de la incubación se centrifuga a 8000 xg durante 10 min a 4° C se decanta el sobrenadante y se le adiciona 1mL de Etanol al 80% en agua DEPC, se centrifuga nuevamente 10min 4° C a 8000 xg con micropipeta se elimina la mayor cantidad de etanol posible sin tocar la pastilla, se deja la pastilla destapada.

- Pasados los 5 min se agregan 12 μ L de agua DEPC y se disuelve colocando los tubos a 45° C durante 5 min

1. Cuantificación, verificación de pureza y e integridad del RNA total:

Se hace una dilución 1:100 de la muestra que se obtiene de la extracción de RNA total disolviendo en agua nanopura o en agua DEPC y se lee en una celda de cuarzo de 200 μ L la absorbancia de ese a 260 y 280nm colocando como blanco el agua nanopura o DEPC. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de RNA total presente en la muestra, la relación A260/A280 debe ser entre 1.7-2.0 para que el RNA total que se obtuvo sea de alta pureza.

Para verificar la integridad del RNA y que la muestra no contenga DNA genómico se hace un gel de agarosa al 1% en regulador de tris-boratos-EDTA (TBE) al que se le agrega Bromuro de etidio en una concentración de 0.5 μ g/mL al cual se coloca en un caja para electroforesis y se deja polimerizar al menos una hora a temperatura ambiente. Cuando haya transcurrido este tiempo se llena la cámara con regulador TBE. Finalmente se toma para cada muestra 1 μ L de regulador para la muestra con el volumen proporcional de la muestra tal que sean 3 μ g de RNA con la finalidad de que sea visible el RNA en el gel.

Las muestras se corren a un voltaje constante a 60V si el gel es pequeño y 90V si el gel es grande incluyendo un carril con marcadores de tamaño molecular.

2. Transcripción inversa del ácido ribonucleico mensajero (RNAm):

Se toma el volumen proporcional a 3 μg de RNA total al cual se le añade 2 μL de la solución concentrada 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de oligo dT en un volumen de 10 μL de agua DEPC, ésta mezcla se deja incubar a 65° C durante 10 min. Después incuba la reacción en hielo durante 5 min y se agregan 10 μL de la mezcla de reacción que consta de:

Mezcla de reacción para la transcripción inversa		
Reactivos	Cantidad (μL)	Concentración final de la reacción
Agua DEPC	2.4	
5x regulador para la primera cadena	4.0	1X
200U/ μL M-MLVRT	0.8	160U/ reacción
10mM dNTPs	0.8	400 μM
100mM DTT	2.0	10 μM

El volumen final de la reacción es de 20 μL .

Continuar la reacción en un termociclador o en un baño incubando a 37 °C durante una hora y 95° C durante 5 min.

Terminada la reacción centrifugar 5 seg. y agregar 80 μL de agua DEPC para obtener un volumen final de 100 μL , de este cDNA se tomaran 5 μL para hacer la PCR punto final de un gen constitutivo.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final:

Para cada reacción de PCR se usan 5µL de cDNA diluido y se adicionan 45µL de la mezcla de reacción para PCR obteniendo un volumen final de 50µL

Mezcla de reacción para la PCR			
Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final en la reacción	Concentración en la que la reacción en funcional
Agua DEPC	35.3		
Regulador 10x PCR	5.0	1x	1x
MgCl ₂ 50mM	2.5	0.5 mM	0.5-4mM
dNTPs 10mM	1.0	200 µM	200 µM
Primer 5´ 20mM	0.5	0.2 µM	0.2-1µM
Primer 3´ 20mM	0.5	0.2 µM	0.2-1µM
Taq polimerasa 5U/µL	0.2	1U/reacción	1-2.5 U/reacción
cDNA	5.0		

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Se utilizan los oligonucleótidos diseñados para TLR1-TLR9 y β-actina respectivamente y el kit LightCycler FastStart DNA SYBR Green I (ROCHE). Para calcular la eficiencia de la reacción se realiza una curva estándar con diluciones, se obtiene la pendiente y se utiliza la fórmula $E = 10^{-1/m}$.

Se realizan las reacciones de PCR con las muestras, utilizando las condiciones estandarizadas para cada reacción. La cantidad de copias en cada muestra se calcula normalizando la expresión de cada gen con el gen endógeno utilizando el método

$\Delta\Delta CT$. Donde al número de ciclo donde aparece el amplificado en la región logarítmica de la reacción para cada TLR y el gen constitutivo, se resta el número de ciclo donde aparece el amplificado en la región logarítmica de la reacción de GAPDH, a este se le resta el ΔCT del parámetro que se utiliza como basal y se aplica la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ para obtener la cantidad relativa del amplificado.

6. Análisis estadístico

Se utilizará estadística descriptiva. Con rango y promedio para variables demográficas y tiempo de curación. Para el porcentaje de recidivas, se calculará promedio. Las diferencias en la expresión de los receptores entre los diferentes grupos, así como las diferencias de la expresión en relación a la mejoría clínica se realizarán en el programa SPSS ® Versión 10.0 con la prueba ANOVA y prueba Post hoc Turkey donde será considerado como significativo cualquier valor de $p < 0.05$.

CONSIDERACIONES ETICAS.

Se solicitará consentimiento por escrito de los pacientes que participaran dentro del protocolo de estudio, explicando claramente el objetivo del estudio, sus posibles ventajas y riesgos.

De acuerdo a lo que dicta la Ley General de Salud en nuestro país y la declaración de Helsinki a nivel internacional el proyecto de investigación será sometido a la consideración del Comité Local de Investigación y del Subcomité de ética. El estudio será realizado por médicos especialistas en Dermatología que se encargarán de la vigilancia

estrecha y de la evolución de cada paciente y en caso de detectar fallas al tratamiento con progresión de la lesión se considerará otra opción terapéutica.

RECURSOS PARA EL ESTUDIO

1. Humanos.

- 1 Dermatólogo adscrito al Servicio de Dermatología al HE del CMN Siglo XXI.
- 1 Médico residente de Dermatología de 5º año.
- 1 Investigador Asociado a la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
- 1 Estudiante en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la UNAM.

2. Materiales.

- Papelería.
- Computadora personal.
- Cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 3.0 mp.
- Imiquimod crema al 5% en sobres.
- Equipo para biopsia cutánea (sacabocado 3.0 mm, pinzas Addson con dientes, tijeras iris, sutura de nylon 4-0)
- Material de curación (gasas, agua inyectable, isodine espuma, micropore)
- Criotubos para biopsias cutáneas
- Nitrógeno líquido para congelamiento de biopsias

- En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica se cuentan con los equipos y materiales necesarios para el trabajo con células y biología molecular y se cuenta con acceso a PCR tiempo real a través del Centro de Instrumentos de la Coordinación de Investigación en salud.

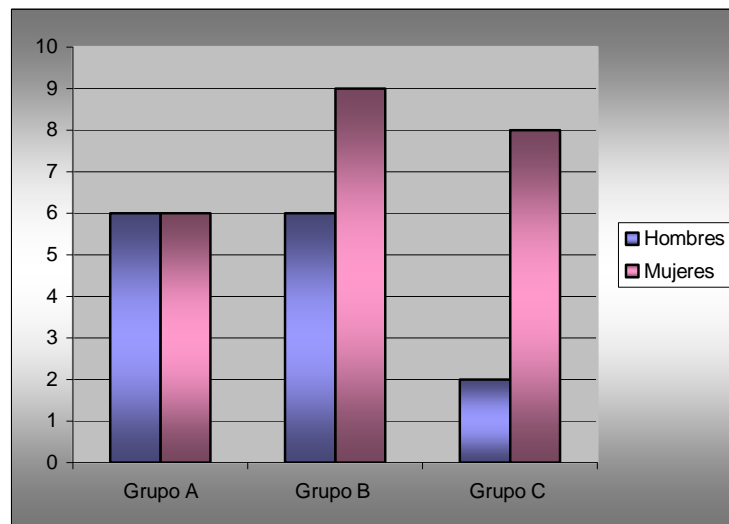
RESULTADOS

POBLACION DE ESTUDIO

Un total de 27 pacientes con verrugas vulgares fueron incluidos en el estudio, los cuales fueron divididos en dos grupos, 12 pacientes (6M/6F) correspondieron a inmunosuprimidos con verrugas vulgares (grupo A), con un promedio de edad de 40.41 años (rango 18- 63 años), un promedio de 4.5 verrugas por paciente y un tiempo medio de evolución de la dermatosis de 13 meses (rango 3 meses a 5 años).

El grupo B estaba constituido por 15 pacientes no inmunosuprimidos con verrugas vulgares (6M/ 9F) con promedio de edad de 44.7 años (rango 24- 65 años), 1.2 lesiones en promedio por paciente y una media de duración de 18.3 meses (rango de 3 meses a 5 años).

Los pacientes control (grupo C) correspondieron a 10 voluntarios sanos (2M/ 8F) con un promedio de edad de 35.6 (rango de 24 y 54 años) sin antecedentes de verrugas virales a ningún nivel (Gráfica 1).

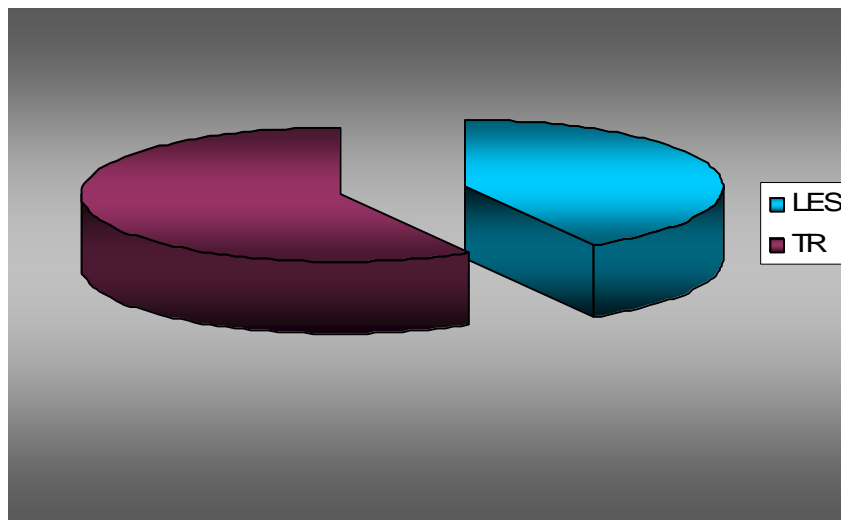


Gráfica 1. Población de estudio. Distribución por sexo

El grupo A correspondió a los pacientes con inmunosupresión portadores de verrugas vulgares, mientras que el grupo B incluyó pacientes con verrugas vulgares sin factores de inmunosupresión. Las biopsias de piel de verrugas de ambos grupos se compararon con la biopsia de piel de una tercera población (Grupo C) que correspondía a 10 voluntarios sanos.

Las causas de inmunosupresión en los pacientes del grupo A correspondieron a: Lupus eritematoso sistémico en 5 (41.6 %, 1M/ 4F) y 7 (58.4 %, 5M/ 2F) eran portadores de trasplante renal.

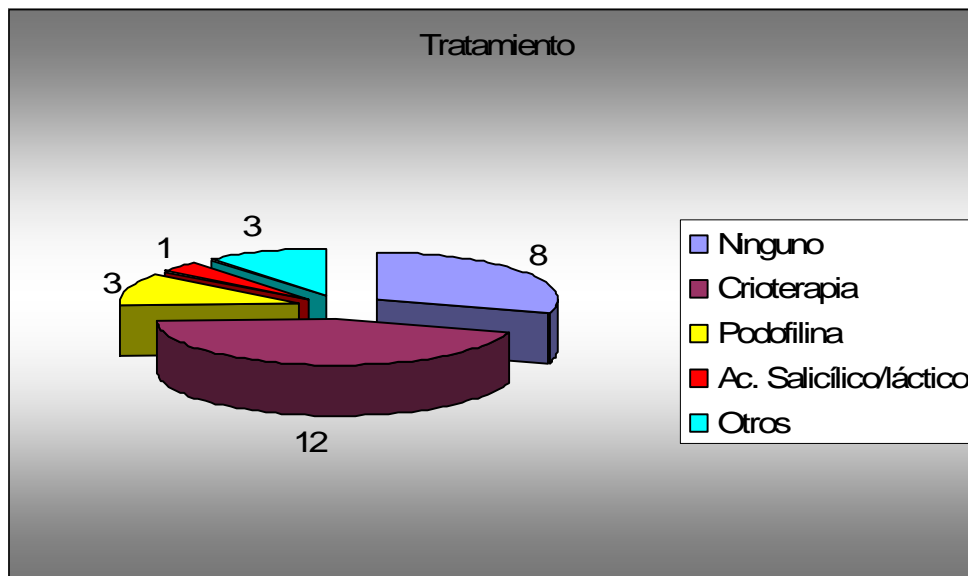
Todos los pacientes al momento de ser incluidos en el estudio y durante la realización del mismo se encontraban en tratamiento con 1 o más fármacos inmunosupresores como parte de su tratamiento entre los más frecuentes cabe mencionar a la prednisona, azatioprina y ciclosporina. (Gráfica 2)



Gráfica 2. Causas de inmunosupresión.

Las patologías causantes de inmunosupresión en la población que integró el grupo A (n=12) fueron en un 41.6% a pacientes portadores de LES (n= 5) y los 7 restantes (58.3%) a pacientes con trasplante renal.

De los 27 pacientes con verrugas vulgares, 8 de ellos (29.6%) no había utilizado tratamiento antes de su inclusión al estudio, 19 (70.4%) había recibido atención médica en forma previa, en 17 casos con aplicación de sólo uno de los siguientes tratamientos: 12 (63.1%) crioterapia, 3 (15.8%) podofilina, 1 (5.3%) ácido salicílico/ácido láctico y los 3 (15.8%) restantes dos o más terapéuticas como: bleomicina, rasurado, medicina alternativa. (Gráfica 3)



Gráfica 3. Tratamientos previos.

Del total de los 27 pacientes 8 no habían aplicado ningún tratamiento. En los 19 restantes en forma decreciente los tratamientos más utilizados como monoterapia correspondieron a crioterapia (n=12), podofilina (n=1), ácido salicílico/ láctico (n= 1) y 3 pacientes algunos de los siguientes: bleomicina, el rasurado y medicina alternativa no especificada.

EVALUACION DE LA EXPRESION DE TLR-7 y TLR-8

- TLR-7

Se comparó la diferencia de expresión de los TLR- 7 de las biopsias de piel con verrugas vulgares entre pacientes del grupo A contra la expresión de este mismo receptor en los pacientes del grupo B y ambos con el grupo control.

En el grupo A demostró una media 2.18, mientras el grupo B cuya media fue de 1.60, la diferencia entre ambos con una $p=0.997$ no mostró diferencia estadísticamente significativas.

Sin embargo la diferencia de expresión entre el grupo A con los controles (Grupo C), si mostró diferencias, media de 32.2 y un valor de $p < 0.005$.

Esta misma comparación entre el grupo B contra el grupo C, también mostró significancia estadística con una $p= 0.002$. (Gráfico 4).

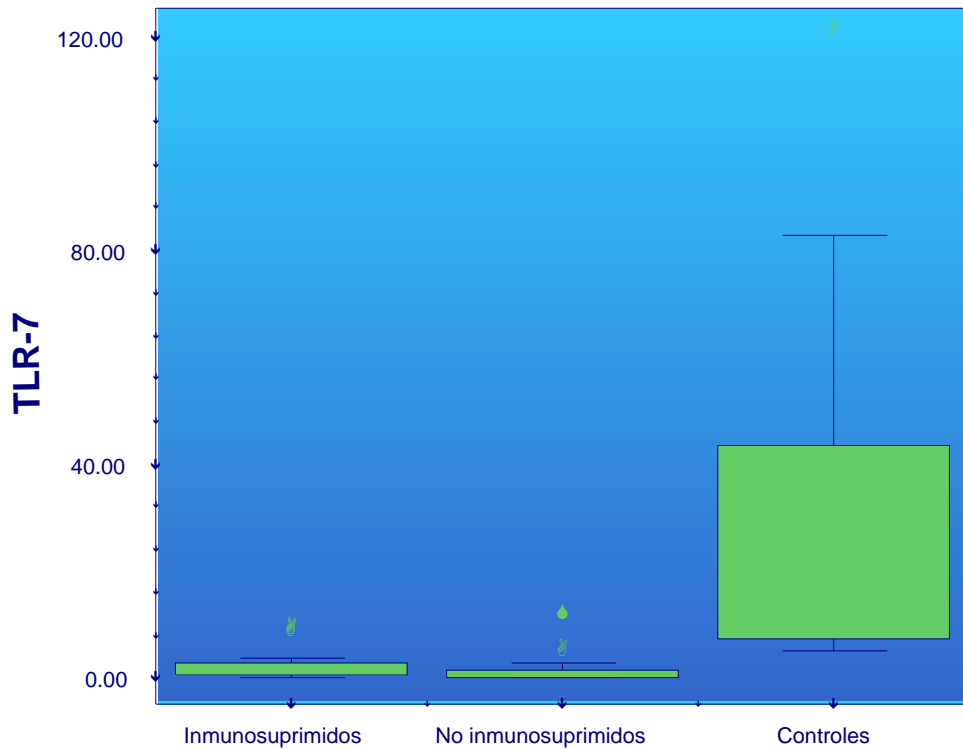


Gráfico 4. Diferencias de expresión de TLR-7.

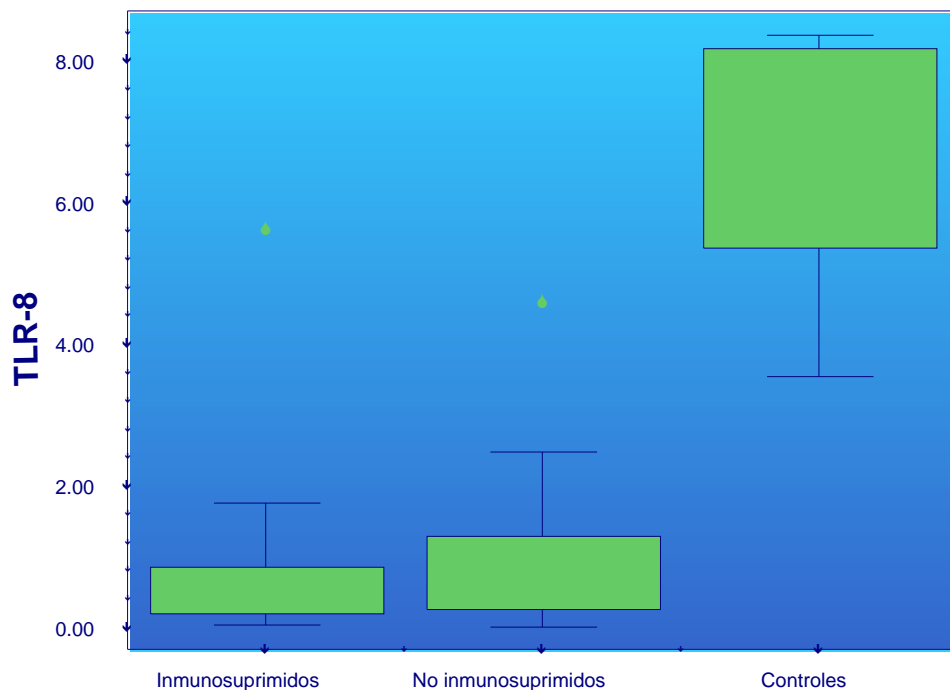
La comparación de la media de expresión de TLR- 7 entre los grupos A y B no mostró diferencia estadística significativa ($p= 0.997$), pero al comparar la media de expresión entre el grupo A vs C y B vs C los valores fueron $p <0.005$ y $p= 0.002$ respectivamente.

Estos resultados pueden hacernos ver que en los pacientes con verrugas vulgares independientemente de que cuenten con un factor de inmunosupresión o no, expresan niveles bajos del TLR- 7.

- TLR- 8

En el caso del TLR 8 las medias en la expresión de los grupos A, B y C (gráfica 5) fueron de 1.10, 1.06 y 6. 16 respectivamente, con diferencias prácticamente mínimas al comparar a los grupos A vs B, A vs C y B vs C ($p = 0.675$, $p = 0.734$ y $p = 0.675$).

Por lo cual aparentemente la baja expresión de este receptor no parece tener un papel predictor en la adquisición de la infección por el VPH en piel.

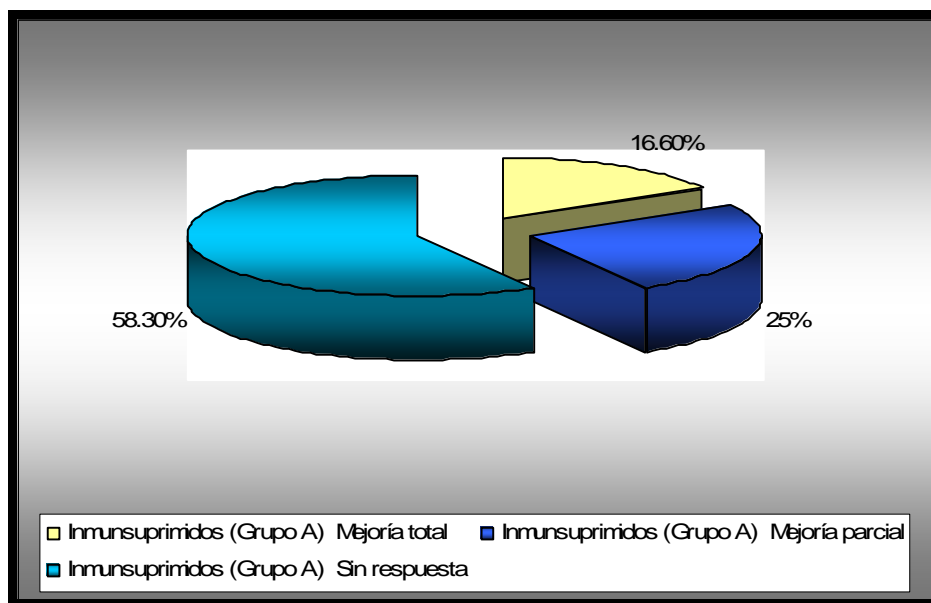


Gráfica 5. Diferencias de expresión de TLR- 8. La comparación de la expresión de TLR- 8 en a biopsia de piel con verruga entre los grupos A vs B, A vs C y B vs C no mostró diferencias estadísticamente significativas.

EVALUACION DE LA RESPUESTA CLINICA CON IMIQIMOD CREMA al 5%.

La respuesta clínica de los pacientes con la aplicación de Imiquimod crema al 5% en el grupo A fue la siguiente: 2 pacientes presentaron curación (16.6%), 3 mejoría en forma parcial (25%) y 7 pacientes no mejoraron o presentaron incremento en el tamaño de las lesiones (58.3%).

De los 2 pacientes que curaron clínicamente en forma completa dicha curación se reportó en las consultas correspondientes a las semanas 8 y 12 (promedio 10 semanas), mientras que en los casos con mejoría sólo en forma parcial y los que no mejoraron se completó el estudio como se tenía programado hasta la semana 16 y se dio tratamiento con crioterapia hasta la curación.

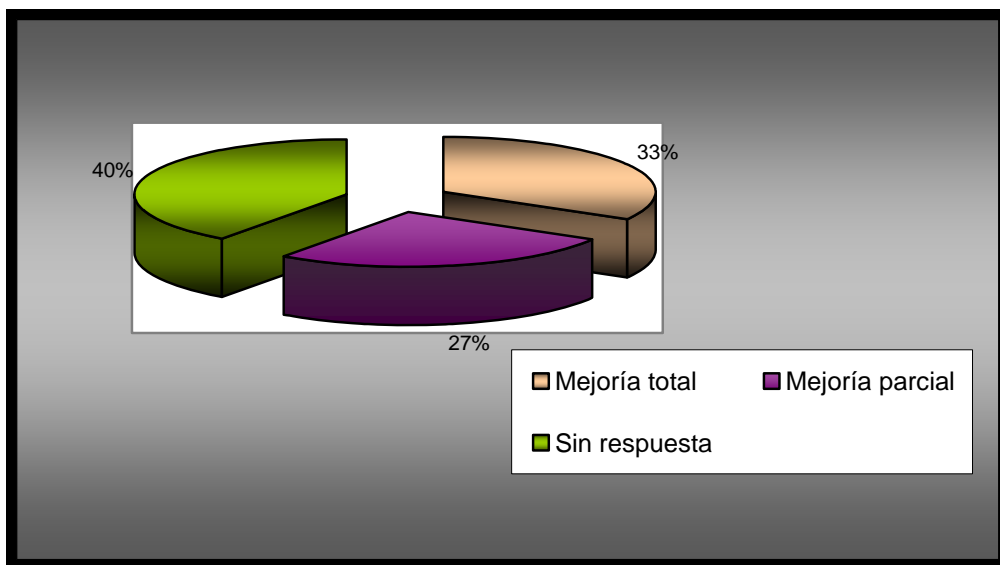


Gráfica 6. Respuesta clínica al Imiquimod crema al 5% en el grupo A.

En el grupo de pacientes inmunosuprimidos, el tratamiento con imiquimod crema al 5% permitió en 2 pacientes la curación en forma completa (16.6%), 3 con mejoría parcial (25%) y 7 no tuvieron respuesta (58.3%)

En el grupo B; 5 pacientes curaron en forma completa (33.3%), 4 tuvieron mejoría parcial (26.6%) y 6 no tuvieron respuesta al tratamiento (40%).

El tiempo promedio para la curación completa fue de 14 semanas, y al igual que en el grupo A, el resto de los pacientes fue manejado al final del protocolo con nitrógeno líquido.



Gráfica 7. Respuesta clínica al Imiquimod crema al 5% en el grupo B.

De un total de 15 pacientes, 5 mejoraron en forma completa en un tiempo promedio de 14 semanas, 4 sólo presentaron una respuesta de tipo parcial y el resto no tuvieron ningún cambio en el tamaño de las lesiones.

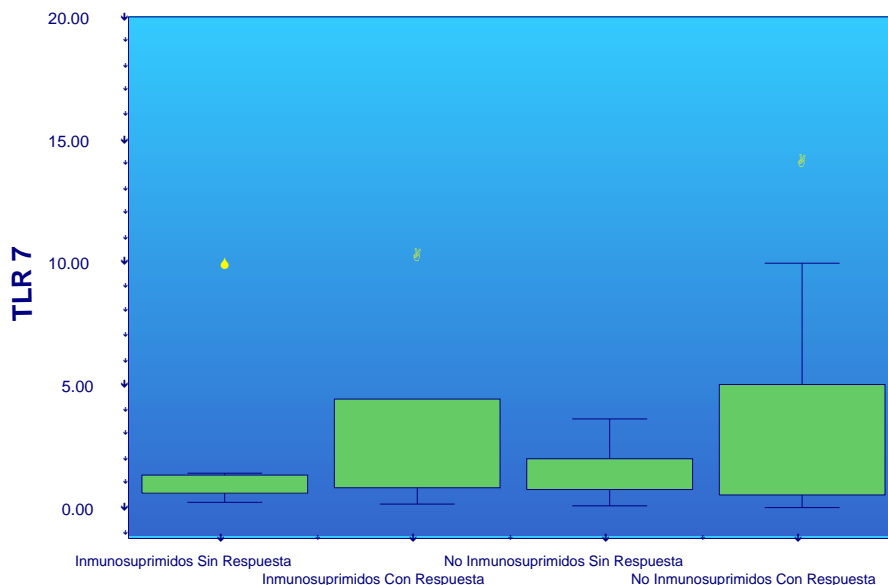
CORRELACION CLINICA CON LA EXPRESION DE TLR-7 y 8

- **TLR-7**

La comparación entre la correlación de la mejoría clínica entre los pacientes del grupo A contra el B (con respuesta al tratamiento) contra la expresión de TLR-7 no mostró significancia estadística ($p=1.0$).

Lo mismo ocurrió al realizar esta comparación para el caso de los pacientes no respondedores A y B ($p=0.995$).

Sin embargo en forma gráfica (gráfica 8) podemos observar como los pacientes con respuesta al imiquimod tienen los niveles más altos de expresión de TLR-7 en comparación con los casos no respondedores.



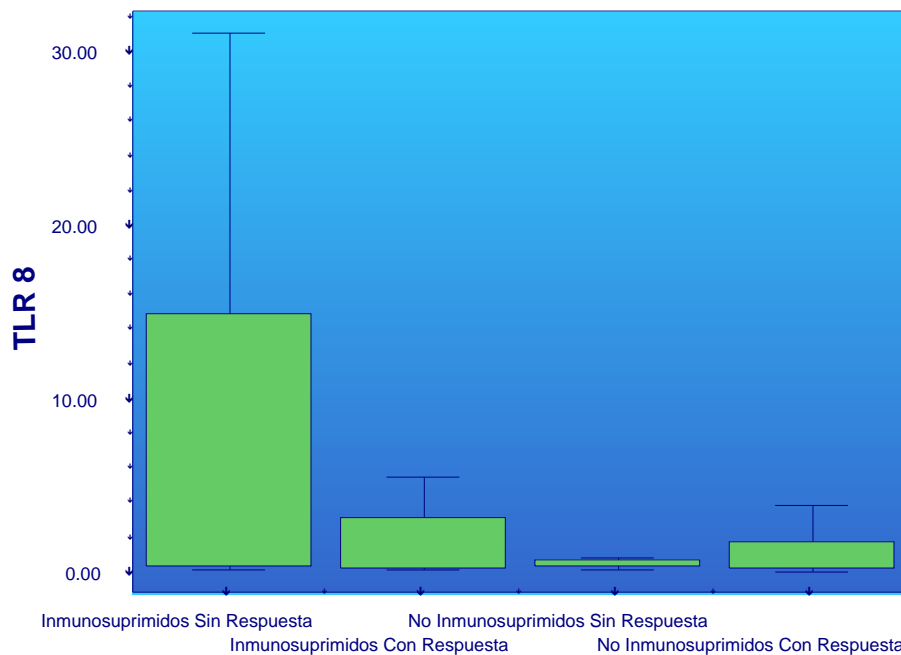
Gráfica 8. Correlación en la expresión de TLR-7 con respecto a la mejoría.

Al comparar la expresión de receptores TLR-7 entre los pacientes con mejoría (parcial o total) de los grupos A y B al igual que la comparación de ambos grupos entre los que no mejoraron las diferencias son mínimas. A pesar de que estas diferencias no son estadísticamente significativas hay una mayor expresión de TLR en inmunosuprimidos e inmunocompetentes respondedores que entre los no respondedores.

- **TLR-8**

Para el caso de TLR-8, los pacientes del grupo A y B los resultados mostrados parecen confusos ya que los grupos donde se reportaron cifras de expresión mayores de este receptor se encontraron entre los pacientes del grupo A sin respuesta seguidos de los pacientes de este mismo grupo con respuesta.

La estadística nos revela que la comparación de A vs B con respuesta y A vs B sin respuesta es de $p=0.999$ y $p=0.452$ respectivamente.



Gráfica 9. Correlación en la expresión de TLR-8 con respecto a la mejoría.

Al contrario de lo esperado la tendencia de mayor expresión se encontró en los pacientes del grupo A que no mejoraron con el tratamiento, mientras que el segundo lugar encontramos a los pacientes del mismo grupo con respuesta, seguidos en forma decreciente los pacientes no inmunosuprimidos, las diferencias son apreciables en la gráfica, pero los resultados estadísticos no muestran un valor de p significativo, entre el primer grupo y el último.

EFFECTOS ADVERSOS CON IMIQUIMOD CREMA AL 5%

Entre los principales efectos adversos reportados en las visitas de control efectuadas cada 4 semanas, el total de los 27 pacientes incluidos comentaron haber cursado en algún momento durante el primer mes de tratamiento: eritema +/++++ (n= 6), dolor de tipo ardoroso +/++++ (n= 3) y prurito +/++++ (n= 3) (Gráfica 10), en ninguna ocasión corroborado en forma objetiva por los realizadores de este estudio.

A pesar de esto, los 12 pacientes afectados comentaron que la intensidad de la sintomatología no ameritó interrupción en el tratamiento.

Efecto adverso	No.	Intensidad
Eritema	6	+/++++
Dolor	3	+/++++
Prurito	3	+/++++
Ninguno	15	

Gráfica 10. Efectos adversos.

De los 27 pacientes incluidos, 12 reportaron sintomatología mínima ante la aplicación del Imiquimod crema al 5% durante las primeras 4 semanas de tratamiento.

RECIDIVAS

De los pacientes que tuvieron mejoría completa: 2 del grupo A y 5 del grupo B, el seguimiento postratamiento se realizó a las 12 semanas. De los cuales ninguno mostró recidivas.

DISCUSION

El imiquimod crema al 5% es un compuesto aprobado actualmente por la (FDA) para el tratamiento contra las verrugas, el entendimiento completo de los diferentes efectos que puede ejercer sobre el sistema inmune continúa en estudio, hasta el momento como ya hemos comentado se sabe acerca de su potencial para inducir la producción de citocinas proinflamatorias, antivirales, la estimulación y maduración de diferentes células que participan en la respuesta inmune innata a través de los receptores TLR-7 y TLR-8, de quienes es un ligando específico.

En este estudio inicialmente pensamos que la expresión de ambos receptores se encontraba disminuida en forma notoria en el grupo de pacientes inmunosuprimidos y que por lo tanto, esta población mostraría bajos porcentajes de respuesta al tratamiento debido a las pocas probabilidades de producir una respuesta inmune adecuada debido al tratamiento que reciben y la patología de base.

Sin embargo nuestros resultados muestran que también los pacientes inmunocompetentes tienen baja expresión de TLR- 7 y 8.

Desafortunadamente aunque la diferencia de expresión de TLR-8 es menor en los grupos A y B en comparación con los controles quienes los expresan de 5 a 6 veces más, las cifras no resultan ser estadísticamente significativas probablemente por el número de individuos que forman la población de estudio.

Estos datos pueden sugerirnos que la baja expresión de ambos receptores, ya sea en personas sanas o inmunosuprimidas puede ser un marcador de susceptibilidad para la adquisición del virus del papiloma humano.

La mejoría (parcial o total) y la falta de respuesta no tuvo para ninguno de los receptores asociación con la expresión. Llama nuestra atención que en las gráficas se muestra para el caso de los TLR- 8 una expresión mayor inmunosuprimidos con respuesta al tratamiento, seguidos por los pacientes del mismo grupo sin respuesta. Desconocemos si

lo anterior corresponda a un mecanismo de sobreexpresión de receptores por parte del sistema inmune en un intento de eliminar al virus del papiloma de la piel.

Debemos de tomar en cuenta que el presente trabajo corresponde a un estudio piloto con un pequeño grupo de pacientes donde se estandarizó en el laboratorio de la institución una prueba no aplicada previamente en esta entidad.

Idealmente esperamos poder llevar a cabo una extensión de este trabajo donde se incluya un mayor número de pacientes con otras causas de inmunosupresión (VIH, trasplante de médula ósea, hígado, etc) con la finalidad de dar mayor validez a nuestros resultados, tener una población más heterogénea y así poder realizar una comparación con los porcentajes de mejoría reportados por otros autores.

Esta extensión podrá incluir la determinación del serotipo y la carga viral del VPH que inicialmente se tenían contemplados como parte del protocolo, pero que desafortunadamente no pudieron investigarse debido a falta de insumos.

El imiquimod crema al 5% ha demostrado por medio de estudios doble ciego aleatorizados resultados importantes en cuanto al tratamiento de las verrugas genitales con su aplicación tres veces por semana durante un lapso de 16 semanas, sin embargo no ha podido establecerse una eficacia similar en el caso de las verrugas extragenitales, además de que son pocas las publicaciones en las cuales se incluyen pacientes inmunosuprimidos.

En un ensayo clínico de Hengge durante 16 semanas mostró remisión completa en 56% de los casos.^{18.}

Mientras que el equipo de Grussendorf en un estudio doble ciego aleatorizado con población pediátrica reporta remisiones tan altas como el 88.9%.²⁰

Nuestros porcentajes de respuesta al tratamiento son más cercanos al estudio realizado en el año 2005 en nuestro servicio donde se compara nitrógeno líquido vs imiquimod crema, donde el índice de curación fue del 25%.

El Imiquimod crema al 5% parecen ser medicamento seguro, con escasos efectos adversos para el tratamiento de verrugas vulgares. Sin embargo los porcentajes de mejoría

no pueden ubicarlo en un tratamiento que pueda ser considerado dentro de las primeras líneas terapéuticas en esta entidad.

Un vehículo más apropiado para favorecer la penetración de medicamentos como el Imiquimod para áreas con un estrato córneo de mayor grosor podría ser una de las opciones a desarrollar en el futuro, así como lo representa la creación de nuevas moléculas con capacidad modificadora de la respuesta inmune.³³

La determinación de PCR es una técnica útil y recientemente estandarizada en nuestro país que sirve para la medición de la expresión de esta familia de receptores. Su uso permitirá realizar estudios de extensión en diferentes entidades dermatológicas no sólo de etiología infecciosa.

Para el médico clínico las novedades en el ámbito de la biología molecular no siempre tienen relevancia en la práctica actual. Sin embargo el descubrimiento de esta familia de receptores y los detalles sobre su cascada de señalización puede ayudar al entendimiento de la fisiopatología de diferentes entidades, por lo tanto pueden ser utilizados como predictores de la adquisición de enfermedades y de las probabilidades de respuesta a un tratamiento.

CONCLUSIONES

- La expresión de receptores tipo Toll 7 y 8 es menor en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes con verrugas vulgares en comparación con controles sanos.
- La expresión disminuida los convierte probablemente en una población propensa a la adquisición del virus.
- Su expresión no mostró ser de utilidad como predictor de respuesta a tratamiento con Imiquimod crema al 5%.
- El imiquimod crema al 5% es un medicamento con baja eficacia en el tratamiento de verrugas vulgares.

ANEXOS

- A. Hoja de consentimiento informado.
- B. Hoja de recolección de datos.

ANEXO A.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
SERVICIO DE DERMATOLOGIA
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN INMUNOQUIMICA

Av. Cuauhtémoc# 330 col. Doctores. México D.F.

Tel. 56 27 69 00 ext. 21 539

“Evaluación de los niveles de expresión de receptores tipo Toll (TLRs) 7 y 8 y carga viral en piel de pacientes portadores de verrugas vulgares tratados con imiquimod crema al 5% y su correlación clínica”.

INVESTIGADORES: Dra. Liliana Serrano Jaén

Dr. Constantino López Macías

Dra. Roxana Torres Sánchez

Nombre del voluntario

No. De afiliación del IMSS

Voluntario #

Como voluntario adulto se le ha pedido participar en un estudio de investigación sobre el tratamiento con imiquimod crema al 5% en verrugas vulgares y las modificaciones en los niveles de expresión de las moléculas TLR 7 y 8, bajo la dirección de la Dra. Liliana Serrano Jaén y el Dr. Constantino López Macías, con número telefónico 56 27 69 00 ext. 21 539.

Este documento proporcionará información de fondo sobre las verrugas vulgares y su tratamiento con imiquimod crema al 5% que está siendo evaluado en este estudio. El diseño del estudio e información sobre los beneficios potenciales y posibles efectos adversos también se describen. Finalmente, se describen sus derechos como voluntario.

Por favor, lea completamente esta forma y pregunte cualquier duda que tenga antes de firmar esta forma de consentimiento.

Información sobre Verrugas Vulgares .

Las verrugas vulgares son neoformaciones benignas de la piel, causadas por virus del papiloma humano (VPH)

Son muy frecuentes y aproximadamente el 22% de la población las puede padecer en algún momento de su vida, la mayor frecuencia es en la adolescencia.

Existen diversos tratamientos pero la curación es difícil de alcanzar, debido a las frecuentes recidivas, por eso se continúan investigando nuevos medicamentos.

Imiquimod crema 5%

Es una amina modificadora de la respuesta inmune con potente efecto antiviral y actividad antitumoral. El mecanismo de acción no se conoce exactamente, pero se ha visto que estimula el sistema inmunológico, activa a las células a través de los receptores TLR-7 y 8 involucrados en el reconocimiento en diversos microorganismos que producen enfermedades infecciosas. El imiquimod que usted recibirá se ha utilizado en el tratamiento de verrugas anogenitales y algunos tipos de cáncer de piel con excelentes resultados, recientemente se ha utilizado en el tratamiento de verrugas vulgares con buenos resultados.

Por esta razón se está llevando a cabo el presente estudio para entender mejor el mecanismo de acción de este medicamento al curar a pacientes con verrugas vulgares y buscar mejores formas para el diagnóstico y evaluación de los tratamientos.

Diseño del estudio

El propósito de este estudio de investigación es evaluar la expresión de los TLR 7 y 8 (receptores tipo toll) tanto en pacientes sanos como pacientes inmunosuprimidos que tengan verrugas vulgares, determinar la efectividad del imiquimod crema al 5% para curar verrugas vulgares y determinar si los niveles de expresión de las moléculas TLR-7 y 8 se modifican con dicho tratamiento y si estos marcadores moleculares nos pueden ayudar para clasificar mejor y dar mejores tratamientos a los pacientes.

El voluntario deberá tener una historia clínica completa, se requerirá toma de biopsia cutánea de piel enferma en la 1ª consulta y de piel tratada en la semana 16.

Riesgos potenciales

La toma de biopsia cutánea es un procedimiento sencillo, rápido y poco doloroso, sin embargo dado que la tolerancia al dolor es variable, amerita una colocación en pequeña cantidad de analgesia local y como cualquier evento quirúrgico puede potencialmente infectarse o al cerrar dejar una pequeña cicatriz.

El tratamiento con imiquimod crema como efectos adversos puede causar eritema, ardor, descamación y/o fisuras en la piel tratada.

En caso de que el voluntario experimente algún síntoma que crea relacionado con el procedimiento o tratamiento, deberá reportar inmediatamente a la Dra. Liliana Serrano Jaén o la Dra. Roxana Torres Sánchez al teléfono 56 27 69 00 ext. 21 539.

Confidencialidad

Su identidad permanecerá confidencial de cualquier publicación que resulte de este estudio, los expedientes se mantendrán confidenciales durante y después del estudio.

Derechos de retiro

El voluntario puede retirarse de esta investigación en cualquier momento, lo cual no tendrá ninguna repercusión o coacción en su tratamiento y atención médica.

Consentimiento

He leído este documento y he decidido participar voluntariamente en este estudio de investigación y he preguntado y recibido respuestas satisfactorias a todas mis preguntas. He recibido una copia de esta forma y estoy al tanto de que una copia permanecerá en los archivos de este centro hospitalario.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

1. Entiendo que el estudio en que estoy participando no pone en riesgo mi salud, ni mi vida.
2. Sé que los riesgos que puedo obtener son razonables con relación a los beneficios.
3. Este producto ya esta a la venta, en diferentes mercados a nivel mundial desde hace varios años.
4. Este producto ha brindado efectividad a las personas que lo han utilizado.
5. Entiendo que el estudio en que voy a participar tendrá una duración de 30 semanas, durante las cuales acudiré a las citas programadas, para que el dermatólogo vigile mi tratamiento.
6. Se que tengo verrugas vulgares, y que se puede aplicar un tratamiento a este padecimiento.
7. Si llegara a presentarse una complicación con la aplicación del medicamento y necesitara suspenderse, estoy en toda la libertad de hacerlo.
8. Se que con la aplicación del tratamiento pueden presentarse efectos adversos. Entiendo que si durante el estudio se llegaran a presentar efectos adversos como resultado del tratamiento, el dermatólogo a cargo me proporcionará atención médica. El proveer este tipo de atención médica no es admisión de responsabilidad legal, por parte del dermatólogo.
9. Entiendo que no debo aplicar ningún otro producto, que no haya sido prescrito por mi dermatólogo durante el curso del estudio.
10. Toda información que concierne a mi persona durante este estudio es absolutamente confidencial.
11. Estoy conciente de que mi participación en este estudio es absolutamente voluntaria y que estoy en libertad de suspenderlo en cualquier momento.
12. Después de haber leído lo anterior declaro:
 - a) He sido informado de la naturaleza de este proyecto de estudio y su propósito; en conformidad con la Declaración de Helsinki (1964) y las Enmiendas en Tokio (1975), Venecia (1983), y Hong Kong (1989), Ley General de Salud y su reglamento para la investigación en humanos.
 - b) Sé que los requerimientos éticos locales han sido satisfechos.
 - c) Sé que este estudio será conducido en conformidad con los principios de las Buenas Prácticas Clínicas y los requerimientos regulatorios locales.
 - d) Mujeres: certifico que no estoy embarazada ni lactando.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del médico

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

ANEXO B.

ESCALA ANALOGA VISUAL.

IMIQUIMOD CREMA al 5%.

Semanas	Eritema	Edema	Erosiones/ ulceraciones	Prurito	Dolor
0					
4					
8					
12					
16					

Valores:

Ninguno = 0, leve = +, moderado = ++, severo = +++.

EVALUACION MENSUAL

Semanas	Número de verrugas	Tamaño
0		
4		
8		
12		
16		

IMÁGENES



Paciente del Grupo A al inicio del estudio



Semana 16. Sin respuesta al tratamiento



Paciente del grupo A. Foto inicial



Respuesta clínica a las 12 semanas de tratamiento.



Paciente del grupo B, pretratamiento.



Respuesta completa al tratamiento, a las 14 semanas.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP. Dermatología 2004,1a ed. Elsevier: 1217- 1233.
- 2 Nebesio C, Mirowski Ginat, et al. Human papillomavirus: clinical significance and malignant potencial. Int J Dermatol 2001, pp 373-379.
- 3 Williams H, Potter A, et al. The descriptive epidemiology of warts in British schoolchildren. Br J Dermatol 1993; 128: 504- 511.
- 4 Rudlinger R, Smith IW. Human papillomavirus infections in a group of renal transplant recipients. Br J Dermatol 1986; 115: 681- 92.
- 5 Tschachler E, Bergtresser PR. HIV- related skin diseases. Lancet 1996; 348: 659- 63.
- 6 Arany, I., A. Goel, and S. K. Tyring. Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions. AnticancerRes. 1995 15:2865–2869.
- 7 Scott M, Nakagawa M, et al. Cell- Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 209–220
- 8 Freedberg IM, Eisen AZ, et al. Fitzpatrick Dermatología en Medicina General. Panamericana; 5ª ed 2001: 2631 2645.
- 9 Harwood CA, Prett VL et al. Imiquimod cream 5% for recalcitrant cutaneous warts in immunosuppressed individuals. Br J Dermatol 2005; 152: 122- 129
- 10 Mc Kee PH. Essential Skin Pathology 1999. Ed. Mosby: 28- 29.
- 11 Sterling J, Handfield J, et al. Guidelines for the management of cutaneous warts. Br J Dermatol 2001; 144: 4-11.
- 12 Veien N, Madsen S, et al. The treatment of plantar warts with keratolytic agents and occlusion. J Dermatol Treat 1991; 2: 59- 61.
- 13 Bourke J, Berth- Jones J, et al. Cryotherapy of common viral warts at intervals of 1, 2 and 3 weeks. Br J Dermatol 1995; 132: 433- 6.
- 14 Sloan K, Haberman H, et al. Carbon dioxide laser treatment of resistant verrucae vulgaris: retrospective analysis. J Cutan Med Surg 1998;2; 142- 145.
- 15 Munn S, Higgins E, et al. A new method of intralesional bleomycin therapy in the treatment of recalcitrant warts. Br J Dermatol 1996; 135: 969-971.
- 16 Testerman T, Imberston L, et al. Cytokine induction by immunomodulators and S- 27609. J Interferon Cytokine Res 1995; 15: 537- 545.
- 17 Tyring S, Conant M, et al. Imiquimod; an international update on therapeutic uses in dermatology. Int J Dermatol 2002; 4: 810-816.
- 18 Hengge U, Esser S, et al. Self- administered topical 5% imiquimod for the treatment of common warts and molluscum contagiosum. Br J Dermatol 2000; 143: 1026-1031.

- 19 Sauder DN. Immunomodulatory and pharmacologic properties of Imiquimod. J Am Acad Dermatol 2000; 43; S6- S11
- 20 Grussendorf C, Jacobs S. Efficacy of Imiquimod 5% Cream in the Treatment of Recalcitrant Warts in Children. Ped Dermatol 2002; 19: 263-266.
- 21 Dahl MV. Imiquimod: A cytokine inducer. J Am Acad Dermatol 2002; 47: S 205- 208.
- 22 Tauszig S, Jouanguy E, et al. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:10520-10525.
- 23 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 1997; 388:394-397.
- 24 Warren S, et al. Toll- like receptors. Crit Care Med 2005; 33(12): S457- 59
- 25 Philbin V, Muhammad I, et al. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. Immunology 2005;114: 507- 521.
- 26 Kang SS, Kaulus L, et al. Toll-Like receptors : Applications to dermatologic disease. J Am Acad Dermatol 2006; 54: 951- 83.
- 27 McInturff JE; Modlin RL, et al. The Role of Toll- like Receptors in the pathogenesis and treatment of Dermatological Diseases.. J Am Acad Dermatol 2005;125: 1- 8.
- 28 Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR et al. Activation of toll- like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. J immunol 2002; 169: 1535- 1541.
- 29 Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Activation and regulation of Toll- like receptor 2 and 1 in human leprosy. Nat Med 2003;9: 525- 532.
- 30 Baker BS, Ovigne, JM et al Normal keratinocytes express Toll- like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: Modulation of TLR expresion in chronic plaque psoriasis.
- 31 Curry JL et a. Innate Immune-related receptors in normal and psoriatic skin. Arch Pathol Lab Med 2003; 127: 178- 186.
- 32 Bulut YF, Thomas LE et al. Cooperation of Toll- like receptor 2 y 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: Role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll- like receptor 2 signaling. J immunol 2001; 167: 987- 994.
- 33 Fragoso AS, Serrano JL, Eficacia de Imiquimod crema al 5% comparado con crioterapia en el tratamiento de verrugas vulgares 2005: 55-57.