



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA  
DE LA LUZ I.A.P.**

**BUSQUEDA DE ADN DE VPH  
EN CARCINOMA EPIDERMÓIDE  
DE CONJUNTIVA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANO OFTALMÓLOGO**

PRESENTA

**DR. EUGENIO TREVIÑO MENDOZA**

ASESORES

**DRA. MIRIAM GPE. TEJEDA ROJAS**

**DR. HUMBERTO LÓPEZ GARCÍA**

**DR. BONFILIO DOMÍNGUEZ CUEVAS**

**DR. LEONARDO VILLALVAZO CORDERO**

**DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS**



MEXICO. D. F.

2009



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.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al ser supremo, que, de una manera inexplicable favorece la existencia y la serie de eventos increíbles que nos tiene hoy por hoy en este mundo y que en lo personal tengo que agradecer, por darme la oportunidad de estar haciendo de mi vida y desarrollo personal algo muy satisfactorio.

A mis padres, hermanos y resto de la familia, por ser siempre *EL* ejemplo a seguir en lo prospero y adverso, siempre ocupan un gran espacio en mi mente y corazón. Son fuente de constante inspiración y apoyo; este proyecto, mi proyecto, nunca podría haberse llevado a cabo sin su vital sustento. Tíos gracias por su cariño y generosidad, nunca lo olvidare.

A Blanca Yamili y familia, gracias por permitirme entrar en sus vidas, me han marcado y cambiado la vida, he aprendido tanto de ustedes que jamás podré compensárselos; el amor, apoyo y comprensión que *TU* me das es irremplazable, gracias.

A todos mis maestros y amigos, que en cierto sentido, para mi, cumplen el mismo propósito, gracias por toda la enseñanza sin interés, el tiempo invertido, los consejos entregados y todo ese apoyo incondicional que me han dado. Espero no haber dado mucha lata y no decepcionar a ninguno.

## ÍNDICE.

MARCO TEÓRICO .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
HIPÓTESIS .....	25
OBJETIVOS .....	26
MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
RESULTADOS .....	29
DISCUSIÓN .....	32
CONCLUSIONES .....	35
BIBLIOGRAFIA .....	36

## MARCO TEÓRICO.

Existen descripciones de infecciones por poxvirus y virus herpéticos que se remontan a la antigüedad, pero fue *Ivanofsky* quien en 1892 descartó que el agente infeccioso de la enfermedad mosaico de la hoja del tabaco no era una bacteria, ya que atravesaba un filtro de porcelana, durante los siguientes 20 años se demostró que varios agentes causales eran filtrables iniciándose el uso de la palabra *virus*.

Entre las décadas de los años 20 y 50 se desarrollaron técnicas de cultivo de células y virus in Vitro que hicieron posible el estudio de las propiedades bioquímicas y genéticas de los virus.

Los virus están constituidos por un ácido nucleico rodeado por una o más proteínas, se diferencian de otros organismos replicantes en que no tienen ribosomas ni enzimas para la síntesis de grupos fosfato de alta energía destinada al metabolismo de las proteínas, hidratos de carbono y lípidos. <sup>(4)</sup>

Los virus son parásitos intracelulares obligados, es decir requieren células para poder replicarse. De forma característica, los ácidos nucleicos virales, codifican proteínas necesarias para la replicación y el empaquetamiento de los ácidos nucleicos en nuevas partículas virales.

Poseen cerca de 200 genes, pudiendo ser de ADN de 1 o 2 cadenas o de ARN de una cadena a favor, en contra del mensaje (traducción de proteínas) o anti sentido, o ARN

bicatenario segmentado; el ácido nucleico viral se encuentra rodeado por una envoltura proteica llamada cápside que a la vez están formada por capsómeros, que le confieren formas icosaédricas o helicoidales, la nucleocápside puede o no tener una cubierta de nucleoproteínas. <sup>(1,2)</sup>

La clasificación de los virus en órdenes y familias se basa en la composición de ácido nucléico, la simetría, el tamaño de la nucleocápside y la existencia o no de cubierta.

La propagación viral principalmente se lleva a cabo por inhalación de partículas en aerosol, ingestión de alimentos contaminados contacto directo o inoculación parenteral; posteriormente se desencadenan fases de la infección viral siendo la primera la interacción molecular de una proteína de superficie viral con una molécula de la membrana plasmática celular para penetrar o fusionarse a la membrana celular pudiendo perder la cubierta en este paso. <sup>(3)</sup> La célula suele percibir que el receptor ha encontrado su ligando normal, a continuación dentro del citoplasma se liberan los ácidos nucléicos virales y proteínas asociadas, los virus ARN replican sus ácidos nucléicos y se ensamblan completamente en el citoplasma, mientras que la mayoría de los virus ADN lo realizan en el núcleo utilizando la polimerasa de ARN II para su transcripción. Los retrovirus y los lentivirus se diferencian de los demás virus en que realizan su propia transcripción inversa en copias de ADN bicatenario parcialmente duplicado y posteriormente se integran de forma sistemática en el genoma del huésped como parte de su estrategia de replicación. El ensamblaje y la salida del virus infeccioso maduro marca el final de la fase de eclipse de la infección, pudiendo hacerlo por salida directa o depender de la muerte celular para ello. <sup>(1,4)</sup>

El carácter infeccioso de las verrugas humanas se sospechaba desde hace siglos, pero fue *Ciuffo*, en 1907, quien estableció por primera vez la naturaleza viral de estos tumores al demostrar su transmisión por medio de filtrados acelulares. En 1933 Richard *Shope* describió el primer *papilomavirus*, reconociéndolo como agente etiológico de la papilomatosis cutánea de conejo de cola de algodón, el CRPV (del inglés Cottontail Rabbit Papillomavirus). Este virus, que aparece habitualmente en los papilomas cutáneos de esta raza de conejos, producía lesiones análogas en el conejo doméstico que progresaban hacia la malignidad en la mayoría de los casos. Este fue el primer ejemplo experimental de la producción de cáncer en mamíferos por parte de un virus de ADN oncógeno. Además, a partir del estudio de Shope se dedujeron las propiedades más importantes de la acción de los virus ADN oncógenos. <sup>(2,3)</sup>

El análisis bioquímico e inmunológico de las proteínas virales llevó a pensar durante los años 60 que existía un único tipo de papilomavirus humano y que la morfología y el comportamiento del mismo dependían de la localización y del tipo de epitelio infectado.

Gracias al desarrollo de las técnicas de genética molecular el estudio de los papilomavirus experimentó un considerable avance a finales de los años 70. Los métodos de hibridación y clonaje de ácidos nucleicos permitían la hibridación de más de 60 grupos diferentes de virus del papiloma humano (VPH). Durante la década de los años 80 gracias a ensayos de transformación in Vitro se inició el estudio de las funciones virales implicadas en la inducción de la proliferación celular. <sup>(1,4)</sup>

En 1990 *Werness y Scheffner* demostraron in Vitro que el E6 del VPH se une y degrada el P53. En 1995 IARC propuso la clasificación de carcinogenicidad de este. <sup>(3)</sup>

Los papiloma virus humanos (VPH) son virus de DNA de doble cadena, no tienen cubierta son de pequeño diámetro (52 a 55 nm) con cápsides icosaédricas formadas por 72 unidades de capsómeros y en ella se distinguen al menos dos proteínas estructurales, denominadas *major* y *minor* según su proporción en el contenido proteico total de la partícula, contiene un genoma de ADN circular bicatenario con 7,900 pares de bases con un peso molecular de  $5.2 \times 10^6$  daltons, una longitud aproximada de 8.000 pb y un contenido medio de pares G:C del 42%. El material genético constituye aproximadamente el 12% del peso del virión. (Fotografía 1).



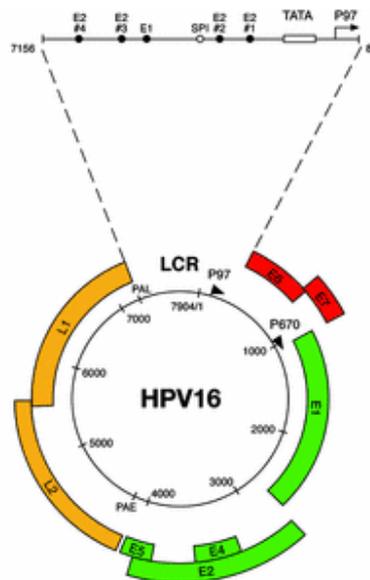
Fotografía 1. Microscopía Electrónica del VPH.

La organización del genoma consta de una región temprana (E), una tardía (L) y una región larga de control (LCR). La región E comprendida de 8 genes, aunque puede variar entre los papilomavirus, constituyen el 69% del genoma y se expresan pronto tras la

infección. La región L esta constituida por dos genes tardíos, L1 y L2 que codifican respectivamente las proteínas *major* y *minor* de la cápside y que solo se expresan en células infectadas productivamente. La región reguladora o no codificadora (LCR – long control region) cumple funciones de control de replicación y transcripción. (Esquema 2).

Hasta el momento se han identificado mas de 200 tipos de VPH pero no se descarta la existencia de muchos mas.<sup>(7, 6, 3)</sup> Los subtipos de variantes suelen diferir un 2-5% entre si. 85 han sido bien caracterizados y 120 parcialmente caracterizados. Actualmente se considera que nos encontramos ante un nuevo genotipo cuando este presenta una homología inferior al 90% en los genes E6 , E7 y L1. <sup>(4)</sup>

Esquema 2. Estructura Básica del VPH



El ADN de los papilomavirus puede aparecer en forma episómica o integrado al genoma de la célula infectada, existiendo dos tipos de replicación viral, la plasmídica, en la que el ADN viral episómico se encuentra en un alto número de copias; y una vegetativa, en la que solo se produce en células diferenciadas, en las que normalmente no hay síntesis de ADN, sin embargo la producción de genomas virales aumenta considerablemente sin que exista ningún tipo de regulación.

El proceso infeccioso del virus inicia cuando se abre acceso a las células del epitelio basal a través de defectos en el epitelio o por una zona de transformación. El virus se adhiere a la célula por una interacción de L1 con receptores celulares y es absorbida en forma de vesícula. Ciertas condiciones van a favorecer que L2 rompa la vesícula, rompiéndose la cápside se libera el genoma, el cual es transportado dentro del núcleo, donde secuestra los mecanismos celulares de transcripción para replicarse, expresándose las regiones tempranas E1 y E2, niveles bajos de E6 y E7 promueven proliferación celular al suprimir el gen p53 y el RB. El virus puede mantenerse latente entre las capas basales del epitelio, o en fase de producción infecciosa, replicarse el genoma en sintonía con la diferenciación del epitelio escamoso, así como la expresión de genes tardíos. El virus se asegura que su genoma este presente en cada célula hija. Finalmente partículas virales se ensamblan al núcleo y son liberadas cuando la célula es descamada, esto evita la inflamación y por lo tanto el riesgo de un ataque inmune y contribuye con el éxito de los papilomavirus. <sup>(3,4)</sup>

La mayoría de las infecciones por VPH se transmiten por vía sexual, fomites (vía familiar), fomites (vía nosocomial), intraparto y peripartocontacto, facilitando la inoculación pequeños traumatismos. <sup>(3)</sup>

Los virus del papiloma humano infectan selectivamente el epitelio de la piel y las mucosas, pudiendo ser asintomáticas, producir verrugas o asociarse a neoplasias benignas y malignas. <sup>(1)</sup>

Según su asociación clínica el VPH puede clasificarse en los siguientes tipos<sup>(3,1)</sup>:

- Mucosos.
- Cutáneos
- Cutáneos/ asociados a epidermodisplasia verruciforme
- Cutáneos y/ o mucosos.

Los VPH son capaces de producir verrugas con características histológicas de hiperqueratosis y papilomatosis, y en las mucosas o tejidos húmedos, vegetaciones las cuales son blandas, anfractuosas, friables y sólo presentan papilomatosis. <sup>(5)</sup>

Agrupación de los tipos de VPH<sup>(6)</sup>:

- Asociados con epidermodisplasia verruciforme cutánea. 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 50.
- Cutáneas. 1, 4, 41, 48, 60, 63, 65.
- Cutánea y/o mucosa. 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62, 72.
- Mucosas. 6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 73.

Los tipos 6 y 11 de VPH se han asociado a lesiones benignas y los tipos 16, 18, 31 y 33 con lesiones displásicas o carcinomas. <sup>(8, 9, 1)</sup>

Las manifestaciones del VPH se presentan en forma *clínica* cuando las imágenes clásicas son apreciables a simple vista, *subclínicas* cuando se requiere de magnificación de imágenes y/o aplicación de ácido acético para observar las lesiones y en forma *latente* cuando es solo demostrable por medio de pruebas de identificación de la presencia del virus. <sup>(3,4)</sup> Existe una interrelación de los cambios morfológicos que ocurren en el epitelio y que son visibles por microscopía con las alteraciones moleculares que sufren las células infectadas:

- 1) Crecimiento nuclear e hipercromasia como resultado directo de las síntesis del ADN del huésped mediada por la activación de los genes virales E6/E7.
- 2) Aumento en la relación núcleo-citoplasma a causa de una síntesis anormal del ADN del huésped mediante por E6/E7.
- 3) Halos perinucleares producidos por una forma anormal de citoqueratina regulada por la expresión del gen E4 del VPH 16.

Estudios sugieren que el VPH 6 y 11 están implicados en la patogénesis de papiloma conjuntival debido a la frecuencia con que se presentan los coilocitos en la lesión. El *coilocito* es una célula escamosa madura superficial o intermedia caracterizada por vacuolización perinuclear, tinción densa citoplásmica periférica y una membrana nuclear ondulante que tiñe rota con cromatina. Se ha encontrado antígeno de la cápside viral en los núcleos de los coilocitos. <sup>(11, 12, 7)</sup> La coilocitosis del tercio superior del epitelio se considera patognomónica de infección por VPH. Sin embargo como norma para el diagnóstico, deben estar presentes como mínimo dos características histológicas. En 1987, **Toki y**

*Yajima* propusieron un sistema de puntuación para el VPH a fin de clasificar el diagnóstico histológico mediante los siguientes parámetros: coilocitosis (4 puntos), bi o multinucleación (2 puntos), disqueratosis (1 punto), hiperplasia de las células basales (1 punto), asas capilares intraepiteliales (1 punto) y acantosis (1 punto). La infección se consideraba demostrada cuando se asignaba 6 o más puntos. <sup>(3,2)</sup>

El *papiloma conjuntival* es una proliferación vascularizada, benigna y común del epitelio escamoso estratificado de la conjuntiva, en casi un 100% es causado por el VPH <sup>(7,11, 10)</sup>; se demostró por primera vez la presencia del antígeno de la cápside del VPH en 1980 por medios inmunohistoquímicos, en años subsecuentes se identificó y tipificó el DNA del VPH en los papilomas por medio de hibridación molecular <sup>(8, 18)</sup>.

El patrón de crecimiento de estos papilomas puede ser exofítico (sesil o pediculado), mixto o inverso. La vía de transmisión del VPH a la conjuntiva aun no se ha clarificado, pudiendo ser por el conducto vaginal de madres con infección por el virus lo más probable, así como autoinoculación por lesiones preexistentes en tracto genital. <sup>(11)</sup>

Puede encontrarse en niños o adultos, pero son más comunes entre las edades de 20 a 39 años y en un 60% son masculinos. Los tipos de VPH 6 y 11 son los más comunes de encontrar en las muestras de papiloma conjuntival, aunque también se han encontrado los tipos 16 y 18, tanto en conjuntivas normales (32%) <sup>(7)</sup> como en displasia y carcinoma de células escamosas, aunque se ha estudiado la necesidad de asociación del virus con luz UV, HIV o procesos de inmunosupresión <sup>(8, 13)</sup>. Se ha encontrado también como asociación del VPH con otras patologías como con el pterigión <sup>(16)</sup>.

Son solitarios y tienen una configuración sésil o pedunculada, con color sonrosado y vasos muy finos que se ramifican a través del estroma bajo el epitelio de la superficie de la lesión. Su crecimiento es rápido. A veces las lesiones pueden llegar a ser confluentes, produciéndose una papilomatosis, más frecuente en niños y de color más rojo aunque de menor tamaño. Cuando se presentan en pacientes de edad avanzada suelen localizarse cerca del limbo y frecuentemente invaden la córnea. En los adultos pueden ser potencialmente malignos y convertirse en un carcinoma de células escamosas si destruyen la membrana basal, en ocasiones también puede presentar un patrón de crecimiento invertido en la cavidad nasal y en el saco lagrimal. En pacientes de piel oscura pueden aparecer pigmentados debido a un exceso de melanocitos y a veces con hiperqueratosis. <sup>(15)</sup>

El tratamiento puede ser conservador con esteroides tópicos en su fase inicial si el tamaño es pequeño. Cuando ya alcanzan una extensión importante está indicada la excisión quirúrgica, completándose con crioterapia asociada (nitrógeno líquido). Su modo de acción es doble, tanto destrucción por efecto térmico de las células alteradas como de la microcirculación, lo que entraña una anoxia de la lesión. En cerca de un 20% de los pacientes se presentan recurrencias que pueden llegar a ser múltiples en el tiempo, en especial en los niños en los que son más difusos, por lo que deben realizarse otros tipos de tratamientos añadidos<sup>(19)</sup> La mitomicina C local se ha usado intraoperatoriamente (0,3 mg/ml; 3'). Este antimetabolito inhibe la proliferación fibrovascular por inhibición de la síntesis del RNA, DNA dependiente. En niños se puede usar la cimetidina oral en las verrugas virales, su acción se basa en el aumento del sistema inmune por inhibición de la función T celular supresora y aumento de la respuesta de hipersensibilidad tardía. <sup>(17)</sup>

También se ha sugerido el uso de interferón, basado igualmente en la importancia de la inmunomodulación.<sup>(15)</sup>

El mecanismo de *oncogénesis* que genera el VPH frecuentemente envuelve la pérdida del control de E2 sobre la expresión de E6 y E7, conocidos también como oncoproteínas, las cuales son capaces de antagonizar a dos antioncogenes fundamentales para la regulación del ciclo celular y la diferenciación, el p53 y el RB respectivamente.<sup>(22)</sup> La expresión de E6 y E7 es requerida para adquirir y mantener eficientemente un fenotipo transformado en un amplio espectro de tipos celulares. La interacción de la proteína E6 de VPH-16 con p53 resulta en degradación por la vía de la ubiquitina, llevando a un fenotipo equivalente al de un gen p53 mutante.<sup>(20,19)</sup> La asociación de E7 con RB impide la interacción de esta última con varias proteínas regulatorias resultando en la eficiente interrupción del ciclo celular. De esta forma, la acción combinada de E6 y E7 deja a la célula infectada con la imposibilidad de detener su crecimiento por la vía de p53 y produce una multiplicación descontrolada ante la inactivación funcional del RB. El efecto es immortalizar la célula e inducir proliferación, este grupo celular puede producir mayor daño genético y producir tumores invasivos; todo esto puede estar favorecido por co-factores, como infecciones concomitantes, fumar o el uso de corticoesteroides.<sup>(19,9)</sup>

El *carcinoma epidermoide de la conjuntiva (de células escamosas)* fue descrito por *von Graefe* bajo el nombre de epitelioma en 1860. Es la neoplasia maligna más común en los Estados Unidos; después del melanoma y el linfoma, en los adultos, es la tercera causa de tumoración ocular; representa a la vez el 14% de todos los tumores oculo-orbitarios.<sup>(19)</sup> Tiene una incidencia que varía geográficamente de 0.002 a 3.5 por 100,000. Se ha

encontrado un predominio en la raza caucásica variando del 90 al 100%, aunque se ha observado que en poblaciones de piel más oscura que habitan en climas tropicales con cercanía al ecuador (latitud 30°) pueden manifestar la patología a edades más tempranas, por lo tanto pacientes caucásicos que habiten cercanos a estas latitudes tendrían mayor riesgo de presentar esta neoplasia. Se manifiesta principalmente en hombres (76%) con un promedio de edad de 56 años, aunque presenta un rango muy pronunciado que puede ser de los 4 hasta los 96 años. <sup>(19,20)</sup>

La etiología de esta neoplasia parece ser multifactorial, se propone la teoría de las células limbales ó zona de transición limbal, por ser células pluripotenciales en su origen con gran capacidad en su división clonagénica así como un alargado periodo de vida, estas características las convierten en una zona de transición muy semejante a la observada en el cérvix, modelo de estudio para el carcinoma de células escamosas en el cuerpo humano,<sup>(19)</sup> *zur Hausen* propuso y después demostró que el VPH son los agentes infecciosos responsables de la transformación neoplásica del epitelio cervical en un 99.7%. Siendo los tipos 16 y 18 los responsables del 70% del cáncer cervical a nivel mundial y son reconocidos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como

carcinógenos, VPH16 es probablemente el mayor agente carcinógeno conocido para el humano. <sup>(22,23)</sup> Por lo que se piensa que la alteración directa sobre las células limbales facilitaría neovascularización, ruptura de la membrana basal e infiltrados inflamatorios celulares, todo esto dado como consecuencia un fenotipo anormal del epitelio corneal y conjuntival.<sup>(19)</sup> Estudios epidemiológicos han demostrado que la radiación ultravioleta tipo B (290-320nm) puede ser importante para producir mutaciones en el gen p53 por daño directo

al ADN y la formación de dímeros pirimidínicos, lo que se traduce como retraso en la reparación de las cadenas de ADN y la facilidad de producirse mutaciones y células cancerosas a la vez, como ocurre en los pacientes con xeroderma pigmentosa. <sup>(20,23)</sup>

La evidencia de la relación del VPH y enfermedad conjuntival, aún es controversial (Tabla 1). Han sido implicados en verrugas palpebrales, papilomas conjuntivales y de saco lagrimal, displasia conjuntival y corneal, así como carcinoma epidermoide y hasta pingüecula y pterigión; En su revisión, Kiire y Dhillon llegaron a la conclusión que el principal factor de riesgo es la exposición al sol, al VPH y al HIV. Admiten que es difícil aislar un solo factor en cualquier estudio y que otros factores pueden ser tabaquismo y susceptibilidad racial.

Tabla 2. Nivel de Evidencia del VPH y Carcinogénesis.

Nivel de evidencia	Tipo VPH	Sitio
Suficiente	16	Cérvix, vulva, vagina, pene, ano, cavidad oral, orofarínge
	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 66	Cérvix
	5, 8	Piel en pacientes con epidermodisplasia verruciforme
Limitada	16	Laringe, periungueal
	18	Vulva, vagina, pene, ano, cavidad oral y laringe
	6, 11	Laringe, vulva, pene, ano
	Grupo genus beta	Piel

	Todos los tipos	<b>Conjuntiva</b>
Inadecuada		Esófago, pulmón, colon, ovario, mama, próstata, vejiga, nariz y senos paranasales

La tabla 2 demuestra el estado de arte del VPH y carcinoma epidermoide de conjuntiva reportado en Medline de estudios realizados con PCR. Resultando 28 de 91 positivos para VPH tipo 16 y 18. La evidencia indica que el VPH está presente en un 30% de los carcinomas de células escamosas de conjuntiva, sugiriendo que el VPH probablemente no es el único factor envuelto en la carcinogénesis. <sup>(19,23,24)</sup>

Tabla 2. Revisión de publicaciones de VPH y CA epidermoide ocular (CCE).

REFERENCIA	PATOLOGÍA	Nº	VPH
Odrich et al	CCE	3/3	100 16
Saegusa et al	CCE	1/4	25 16
Nakamura	CCE	0/2	
Karcioglu	CCE	17/31	54 4-16 6-18 7-16/18
Dusku	CCE	0/4	
Palazzi	CCE	2/10	20 16
Toth	CCE	5/23	21 4-16 1-18
Eng	CCE	0/4	

Las presentaciones clínicas son muy variadas, (fotografía 2) siendo muy difícil de distinguir una displasia, de un carcinoma in situ o de un carcinoma invasor. Se pueden

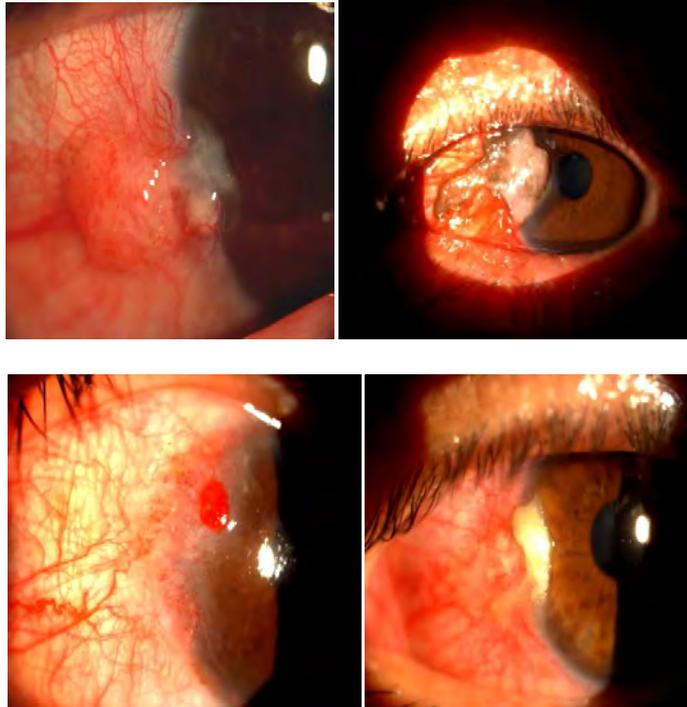
describir como ligeramente elevadas, de formas variadas, demarcadas relativamente del tejido normal circundante, acompañadas de vasos nutricios y con una coloración que puede ser desde aperlada hasta rojiza o grisácea, dependiendo de la vascularidad del tumor. Comúnmente inician en el limbo nasal o temporal en las zonas interpalpebrales. Jakobiec y Pizzarello describieron la apariencia clínica macroscópica como:

1. Gelatinosa
2. Aterciopelada
3. Papiliforme
4. Leucoplaquia
5. Nodular
6. Difusa

La forma difusa es la menos común y es difícil de diagnosticar en sus etapas tempranas, enmascarándose como conjuntivitis crónica.

Los síntomas del paciente son inespecíficos, con sensación de cuerpo extraño, ojo rojo e irritación que aumentan o varían en intensidad dependiendo de la extensión y características morfológicas de la tumoración. <sup>(19)</sup>

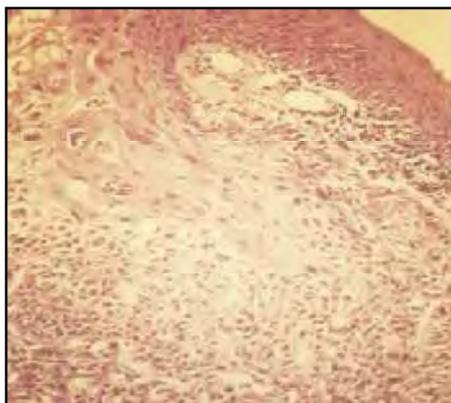
Fotografía 2. Diversas presentaciones Clínicas.



Se puede diagnosticar de diversas maneras siendo la citología el auxiliar diagnóstico menos invasivo y puede ser de tipo exfoliativa obteniendo células con un cytobrush, semejante al usado para tomar muestras cervicales y fijándolas en alcohol al 95% para después teñirlas usando la técnica de Papanicolaou,<sup>(25)</sup> y la citología de impresión en la cual se utiliza papel filtro de celulosa de acetato el cual se coloca delicadamente sobre la superficie a estudiar y al removerla las células adheridas pueden fijadas y teñidas de igual manera; ambas técnicas tienen una positividad relacionada con la histopatología del 70% y se puede analizar lesiones de tipo displásico, carcinoma in situ e invasor. (fotografía 3)

3) La histopatología es el método diagnóstico definitivo se puede clarificar de acuerdo a su tipo clínico patológico en in situ, micro invasor, invasor y con metástasis; así como el dar las características de bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado.

(26,26)



Fotografía 3. CCE de conjuntiva, tipo invasor.

La apariencia histológica de las células atípicas o los queratinocitos también se han clasificado en tipo espinosas, escamosas, claras, muco-epidermoide, de cels. pequeñas, linfoepitelial y pseudosarcomatoso, siendo el espinoso y el escamoso los más comunes. Otros métodos diagnósticos auxiliares son las diferentes técnicas de inmuno histoquímica así como de PCR. <sup>(19,9,10)</sup>

La escisión de la lesión es el método terapéutico más aceptado, disecando y retirando todo tejido anormal con un margen quirúrgico de 2 a 3 mm será suficiente para remover la neoplasia y a la vez analizar los bordes quirúrgicos, enucleación, o aun más raro, excenteración puede requerirse en caso de que el tumor tenga un desarrollo intraocular o infraorbitario. Los rangos de recurrencia después de la escisión van del 15 al 52%, con un promedio del 30%, aunque tumores con bordes quirúrgicos limpios o libres de células neoplásicas se reduce a un 5% de recurrencia y de hasta un 69% cuando hay bordes quirúrgicos afectados; Tumores parcialmente removidos tienden a recurrir de una manera más agresiva, pudiéndose explicar por la ruptura de la capa de Bowman y las lesiones

producidas en la esclera. Se ha descrito el uso de láser argón-fluorado de 193nm para la remoción de displasia corneal intraepitelial recurrente, dejando de lado las complicadas y traumáticas opciones de la queratoplastia lamelar o queratectomía, sin embargo no se puede realizar una exploración histológica del tejido fotoablado.

La radioterapia se ha descrito con un 18% de recurrencias, no se recomienda como terapia inicial, a menos que la tumoración se encuentre muy difusa o extensa. La crioterapia también se utiliza comúnmente después de la escisión quirúrgica y un cierre primario. Otras opciones de tratamiento como la inmunoterapia y la quimioterapia se utilizan, con fármacos como el dinitroclorobenceno, la urea, la mitomicina C al 0.02%, tretionina o tiotepa se han utilizado, encontrando bajo porcentaje de recidiva pero alto de efectos secundarios así como la necesidad de llevar un control más estricto en las revisiones clínicas y de laboratorio. <sup>(19,22)</sup>

El carcinoma epidermoide de conjuntiva se considera una neoplasia de bajo grado de malignidad, y se ha observado que muchas lesiones tienden a involucionar en los primeros dos años de aparición y aun hay reportes de lesiones que desaparecieron siete años después de su inicio. Cuando se presenta recurrencia del carcinoma y desarrolla metástasis se ha reportado de un 4 hasta un 8% de mortalidad aún cuando se les realice excenteración. Presentan un 2 a 8% de probabilidad de tener una invasión intraocular. <sup>(26)</sup>

La búsqueda del VPH se puede realizar por medio de tinción directa hematoxilina-eosina de las muestras fijadas con parafina y con tinción inmunohistoquímica mediada por anticuerpos específicos para antígenos estructurales del virus. <sup>(8,11)</sup>

La identificación directa del DNA del VPH constituye el método más fiable para identificar el virus, pudiendo realizarse por medio de técnicas de **hibridación** (southern blot, dot blot) donde el objetivo es extraer el DNA celular, **hibridación in situ** con el objetivo de los núcleos infectados por el VPH en un corte histológico fijado en parafina y la reacción en cadena de la polimerasa conocida, como **PCR** por sus siglas en inglés (**Polymerase Chain Reaction**), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis perteneciente a la Cetus Corporation en California SA, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. <sup>(29,10,11)</sup> Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus, bacterias o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado, entre ellas se incluyen la **clonación** de ADN para la **secuenciación**, la **filogenia** basada en ADN, el **análisis funcional de genes**, el diagnóstico de trastornos hereditarios y la identificación de **huellas genéticas** (usada en técnicas **forenses** y tests de paternidad). <sup>(30)</sup>

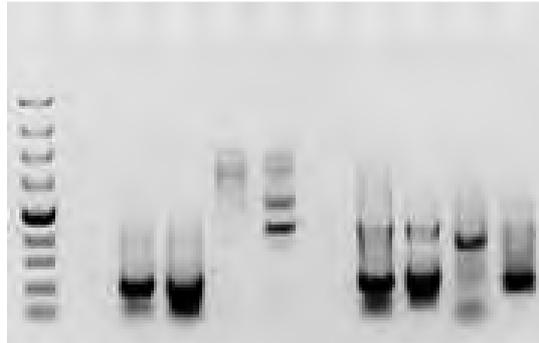
Se fundamenta en la propiedad natural de las **ADN polimerasas** para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas **temperaturas** alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de **replicación** y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado **termociclador** (fotografía 4), que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del **efecto Peltier**, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente

eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena [conductividad térmica](#), permitiendo que se alcance rápidamente el [equilibrio térmico](#).

Fotografía 4. Termociclador



Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de [electroforesis](#), que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la [electroforesis en gel de agarosa](#), para fragmentos grandes (fotografía 5); en acrilamida, para los más pequeños; y, de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente, la [electroforesis capilar](#). El/los tamaño/s de los productos de la PCR vienen determinados por un marcador de [peso molecular](#) de ADN, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido, y que se corre en el [gel](#) junto con los productos de PCR. <sup>(30,31,32)</sup>



Fotografía 5. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra varios productos de PCR obtenido mediante distintos primers o cebadores.

## JUSTIFICACIÓN.

El carcinoma epidermoide de la conjuntiva (CEC) representa la neoplasia maligna más frecuente de la superficie ocular, siendo a la vez el 14% de todos los tumores oculo-orbitarios en el ser humano. <sup>(19)</sup> Se ha encontrado DNA de virus del papiloma humano (VPH) en lesiones neoplásicas de la conjuntiva como verrugas palpebrales, papilomas conjuntivales y de saco lagrimal, displasia conjuntival y corneal, así como carcinoma de células escamosas y hasta pinguecula y pterigión.<sup>(10)</sup>

Zur Hausen propone y demuestra una relación casi directa (99.7%) entre la infección por VPH y el desarrollo del carcinoma cérvico uterino, siendo los tipos 16 y 18 los causantes de hasta un 70% de ellos. Medio millón de mujeres muere cada año como consecuencia de carcinomas cervicales, durante el 2000 la incidencia en México de CACU fue de 45.5 casos por 100,000 mujeres con una tasa de mortalidad de 12 mujeres por día. <sup>(25)</sup>

El potencial oncogénico de VPH de alto riesgo tiene un valor de evidencia suficiente en cuanto a su potencial de carcinogénesis en cérvix, vulva, vagina, pene, ano, cavidad oral y orofaringe; pero aún limitada en la conjuntiva.

Una asociación parecida a la observada en cérvix ha sido propuesta en la conjuntiva por más de dos décadas.

El estado de arte en carcinoma epidermoide de conjuntiva y VPH demuestra un 30% de pacientes con infección por VPH y desarrollo del cáncer conjuntival. <sup>(19,24)</sup>

No se encuentran estudios en México que busquen identificar DNA de VPH en conjuntiva con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿Existe una relación entre el VPH y el CEC en un grupo de pacientes de la FHNSL?

Si existe relación entre el VPH y el CEC en ellos, ¿Qué tipos de VPH están presentes?

## **HIPÓTESIS.**

La identificación, por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR), del virus del papiloma humano en carcinoma de células escamosas de conjuntiva se espera encontrar en menos del 50% en una población de pacientes de la FHNSL.

## **OBJETIVO.**

Identificar ADN de virus del papiloma humano (VPH) por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en carcinoma epidermoide de la conjuntiva. Así como obtener los tipos de VPH presentes en los casos estudiados.

## **METODOLOGÍA.**

Se trata de un estudio retrospectivo, descriptivo, trasversal y observacional en el que se incluyó pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide de conjuntiva, encontrados en la libreta de patología de la FHNSL del periodo comprendido de 1992 al 2007, se incluyeron aquellos pacientes que contaban con el bloque de tejido fijado en parafina, a los cuales se les realizó detección de PCR para E6 de VPH 16 y a los negativos para dicha prueba, PCR para GPS en el resto de los tipos de VPH. Así como se estudiaron las variables de edad, sexo, tiempo de evolución y localización del CEC.

Se utilizaron oligonucleótidos para la amplificación del gene de la  $\beta$ -globina humana como control, para evaluar la efectividad en cuanto a la extracción, así como calidad del ADN utilizado, si fuera negativo se descartaba la muestra.

Para el análisis por PCR se tomaron los cortes histológicos de 10 $\mu$ m y se retiró la parafina con xilol, lavándose con etanol y puestos a secar. Colocando el tejido en tubos de eppendorf de 100  $\mu$ L, se utilizó 5 $\mu$ L de buffer (10X), para mantener el pH optimo para el funcionamiento del ADN polimerasa, y se termocicló a 94°C, utilizando un termociclador (Perkin Elmer Cetus, Wilton, CT, USA), se agregó cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 25mM de 3 $\mu$ L con condiciones de ciclado de 94°C por 30 segundos, se continuó con los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), para polimerizar nuevo ADN, de 10mM a una cantidad de 1 $\mu$ L y se termocicló a 55°C por 60 segundos de 35 a 40 ciclos, se agregaron los

oligonucleótidos (primers) E6+ a 50pmol, 0.5µL, se cicló a 72°C por 60 segundos y el E6- con las mismas características pero con un periodo de tiempo de termociclado de 7 minutos, con un ADN polimerasa tipo Taq de 5U/µL a 4°C; dando como volumen final 50µL.

Si resultaba negativo para la secuenciación del VPH 16, se iniciaba la PCR para GPS con los oligonucleótidos MY09 y MY11 en una cantidad de 0.5 µL a 50pmol a condiciones de termociclado de 72°C por 90 segundos y 4 minutos respectivamente. De esta manera se identificarían el resto de los tipos de VPH, ó ser un verdadero negativo. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis con un gel de agarosa al 4% GTG (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) y bromuro de etidio como tinción.

## RESULTADOS.

Se encontraron 93 pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide de conjuntiva en las libretas de patología de la FHNSL reportados en el periodo de tiempo de 1992 al 2007, de los cuales 19 contaban con su respectivo bloque de tejido fijado en parafina, al cual se le realizó PCR para identificación de ADN de VPH, así como la determinación del tipo de VPH. El cual se realizó en el laboratorio de oncología genómica, centro médico nacional siglo XXI del instituto mexicano del seguro social. Se estudiaron 14 pacientes masculinos y 5 femeninos, con un promedio de edad de 67 años (37 – 92años), con un tiempo de evolución de la neoplasia promedio de 27.3 meses (3 – 108 meses), con una localización predominante en el limbo nasal.

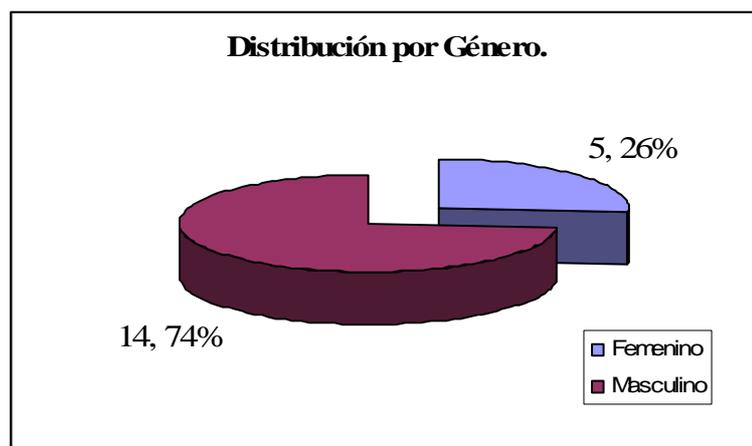


Grafico 1. Se muestra la cantidad y porcentaje del género de los pacientes estudiados.

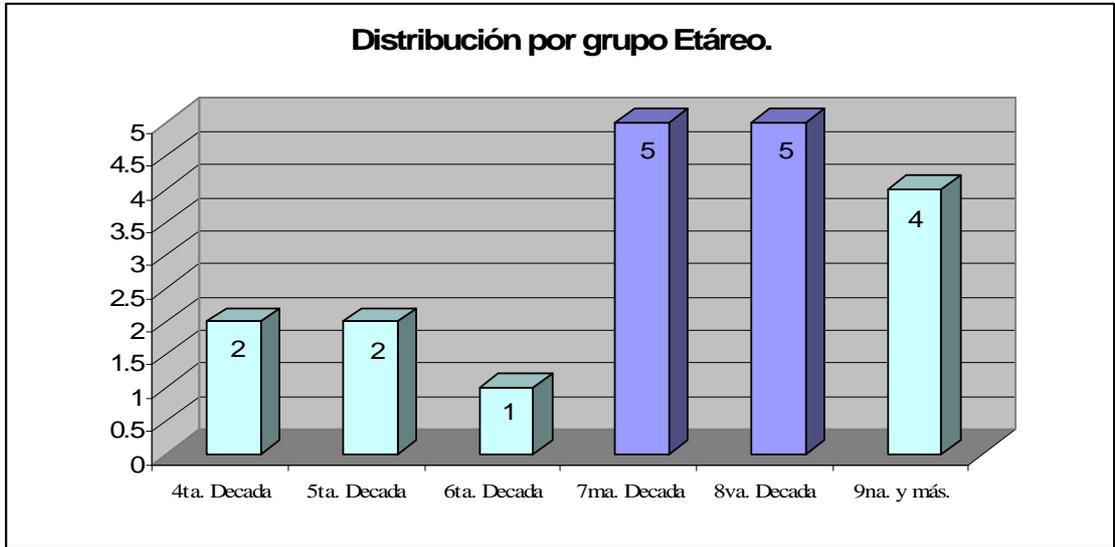
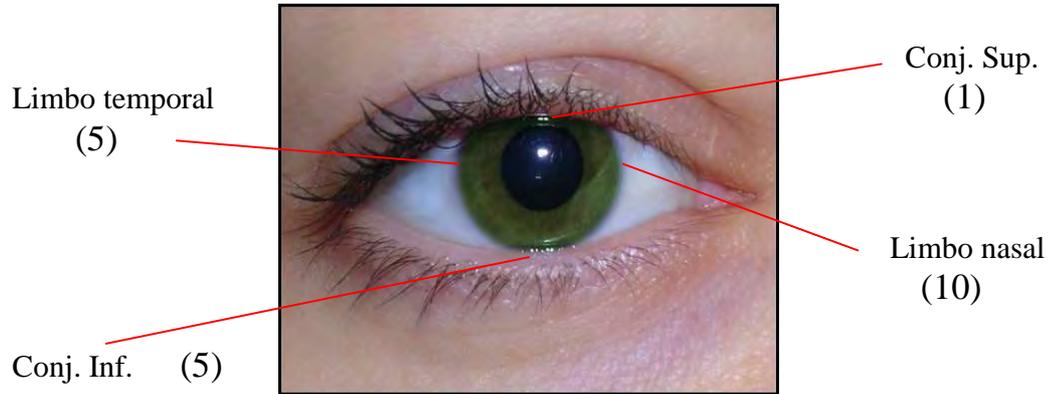
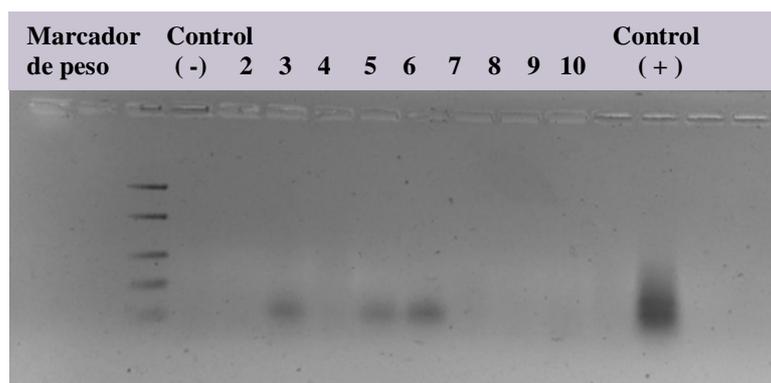


Grafico 2. Muestra la predominancia del grupo etéreo afectado por el CCE.



Esquema 1. Demuestra las localizaciones presentes en nuestra muestra de estudio.

De las 19 laminillas estudiadas por PCR todas resultaron positivas para el gene de la  $\beta$ -globina humana, se detectaron secuencia de ADN de VPH tipo 16 en 5 de las 19 muestras (26.3%), el resto se les realizó PCR con GPS resultando negativas.



Fotografía 1. Gel de agarosa en el que se observa la detección de ADN del VPH16 en los carriles 3,5 y 6.

Tabla 1. Variables estudiadas en los pacientes.

Paciente	Edad	Sexo	Localización	Evolución (meses)
1	40	Masc	Limbo nasal	8
2	45	Masc	Limbo nasal	60
3	60	Masc	Conjuntiva inf.	12
4	92	Masc	Limbo nasal	6
5	48	Fem	Conjuntiva inf.	12
6	73	Fem	Limbo temporal	15
7	74	Masc	Limbo nasal	12
8	77	Masc	Limbo nasal	7
9	84	Masc	Limbo nasal	96
10	85	Fem	Conjuntiva sup.	3
11	62	Masc	Limbo temporal	12
12	85	Fem	Limbo nasal	12
13	64	Fem	Limbo temporal	36
14	75	Masc	Limbo nasal	24
15	75	Masc	Limbo nasal	12
16	65	Masc	Limbo temporal	12
17	70	Masc	Limbo temporal	36
18	62	Masc	Limbo nasal	108
19	37	Masc	Conjuntiva inf.	24

## **DISCUSIÓN.**

El rol que tiene el VPH en el desarrollo, o en alguna etapa del proceso etiológico del carcinoma epidermoide de conjuntiva, aún no es claro. Así como en pacientes con lesiones cervicales, el VPH tipo 6 y 11 se ve asociado a condilomas, en la conjuntiva se ha demostrado que pueden llegar a producir papilomas, mientras que los tipos 16 y 18 se encuentran en más del 90% de cáncer cervical y se han encontrado en lesiones pre malignas y malignas de la conjuntiva.<sup>(24)</sup>

Estudios histopatológicos y epidemiológicos sugieren que la radiación ultravioleta es un factor crucial para el desarrollo de displasia y cambios neoplásicos en la conjuntiva y cornea; por si sola es muy raro encontrar el desarrollo de la patología en cuestión <sup>(19)</sup>. La interacción entre la luz UV y el VPH parece ser un estímulo oncogénico en la epidermodisplasia verruciforme, un desorden donde se genera múltiples lesiones verrugosas que generan carcinomas en sitios expuestos al sol, estas verrugas contienen diferentes tipos de VPH, lo que la convierte en el ejemplo de interacción entre dos estímulos oncogénicos (VPH y luz UV) <sup>(23,19)</sup>. Otro factor ha considerar en el desarrollo de neoplasia conjuntival seria la inflamación crónica debido a diversos factores o procesos infecciosos los cuales aun se están estudiando, como se ha encontrado en pacientes con diagnóstico de SIDA, donde algunos investigadores sugieren que hasta un 50% de los pacientes con menos de 50 años de edad y con una neoplasia conjuntival podría sospecharse en el SIDA.<sup>(28)</sup> Ninguno de

nuestros pacientes tenía especificado en la libreta de patología el diagnóstico antes mencionado, pero la sugerencia que realizan estos autores parece ser bien fundamentada.

Como en otras series <sup>(26,20)</sup>, observamos que la patología es más frecuente en adultos mayores (en nuestra serie, 67 años en promedio), con la mayoría de las lesiones afectando el limbo nasal. Ninguno de nuestros pacientes padecía alguna otra enfermedad sistémica como xeroderma pigmentosa o inmunodeficiencias, en los cuales se observa el desarrollo de la neoplasia en edades más tempranas y con localizaciones menos habituales.

De la misma manera, observamos una mayor frecuencia de casos en el género masculino (73.6%) tal vez debido a la línea de trabajo que frecuentan y que puede estar relacionada con la mayor exposición al sol a la que estarían expuestos

La evidencia que se tiene hasta el momento del rol que juega el VPH en la etiología del CEC es limitada, la diferencia de la participación en el desarrollo del papiloma conjuntival, donde se reporta hasta en un 80% de los casos así como en otros grados de displasia. Aunado al grado de evidencia demostrado en el desarrollo de neoplasia y malignidad en otras áreas se podría observar beneficio sistémico en la aplicación de las nuevas vacunas, en especial la tetravalente (6,11, 16 y 18) que cubre la mayoría de los virus involucrados en las neoplasias tanto benignas como malignas. Estudios en fase III con ambas vacunas indican un 98% de seroconversión tras la inmunización, y esto se ha traducido en casi un 100% de eficacia para la prevención de infección persistente de la enfermedad anogenital por VPH, en un periodo de seguimiento de 5 años en Inglaterra.

Aunque la incidencia de esta patología es baja, se reporta como la neoplasia maligna más frecuente en la conjuntiva <sup>(19,20)</sup>, lo que justifica se continúen las diversas líneas de investigación del CEC. Este estudio confirma una asociación entre el CEC y el VPH, aun quedan muchas preguntas por contestarse como serian, ¿cual es su forma de trasmisión a la conjuntiva?, ¿cual es su potencial oncogénico real en la conjuntiva?, ¿el CEC es una neoplasia de tipo multifactorial?. Estudios posteriores estarían indicados para encontrar la relación entre la infección por VPH16 y otros factores o agentes carcinogénicos envueltos en el desarrollo de displasia o carcinoma epidermoide.

## CONCLUSIONES.

En el presente estudio se decidió realizar PCR en muestras de tejido fijado en parafina con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide de conjuntiva y se detectó DNA de VPH del tipo 16, el estudio de PCR es altamente sensible, pero con probabilidades de contaminación puede dar falsos positivos, por lo que se realizaron diferentes medidas de control, como la aplicación de la  $\beta$ -globina para confirmar la calidad del ADN extraído antes de iniciar el estudio, se detectó VPH en un 26.3% de nuestras muestras, aunque no se descarta la posibilidad de que el tejido se encontrara en mal estado por la antigüedad de este y que el porcentaje haya sido aun mayor. El VPH16 se ha propuesto como el agente infeccioso carcinogénico más importante a nivel mundial<sup>(22,23)</sup> y es por eso que en la búsqueda por medio de PCR del virus se utilizó una estrategia de identificación de la región E6 del VPH16 como primer paso, al resultar negativo se utilizó un GPS para el resto de los tipos de virus. Solo se detectó virus del tipo 16 en nuestras muestras, el cual esta presente en poco más del 50% de los CACU reportados a nivel mundial y que en la conjuntiva podría comportarse de la misma manera, es decir, representar el principal tipo de VPH presente en el carcinoma epidermoide de conjuntiva. A la vez es el tipo de VPH más identificado en los estudios de conjuntiva ya descritos. Podemos concluir con este trabajo que la relación entre el VPH y el CEC existe, que el comportamiento que se observa en tal relación en nuestra población es el mismo que se encuentra descrito en el estado de arte estudiado. Tanto en el porcentaje de relación VPH-CEC, como en la edad y el genero.

## REFERENCIAS.

1. Fauci A., Braunwald E., et al. eds. *Principios de medicina interna*. Madrid: McGraw-Hill, 1998: 1258-1260.
2. Shah K.V., Howley P.M. *Papillomaviruses*. New York: Virology Raven Press, 1990: 1651-1676.
3. De Palo G., Chanen W., Dexeus S. *Patología y tratamiento del tracto genital inferior*. Barcelona: Masson, 2001: 42-58.
4. Howley P.M. *Papilomavirinae and their replication*. New york: Virology Raven press, 1990: 1625-1650.
5. Saul A., Peniche J., Arellano I. *Lecciones de dermatología*. México: Méndez editores, 2001: 220-228.
6. Rosai J. *Ackermans surgical pathology*. St. Louis: Mosby, 1996: 1358.
7. Sjo NC, Heegaard S, Prause JU, von Buchwald C, Lindeberg H. Human papillomavirus in conjunctival papilloma. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 785-787.
8. Nakamura Y., Mashima Y., Kameyama K, et al. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumors of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase Chaín reaction. *Br J Ophtalmol* 1997; 81: 308-313.
9. Zeynel A, Tawfik M. Human papilloma virus in neoplastic and non-neoplastic conditions of the external eye. *Br J Ophthalmol* 1997; 81:595-598.
10. Amaral M., Erwenne C., Lina L. Detection of human papillomavirus in epithelial lesions of the conjunctiva. *Sao Paulo Med J*. 2000. Sep 7; 118(5):125-30.

11. McDonnell J., McDonnell P., Mounts P. Demonstration of Papillomavirus Capsid Antigen in Human Conjunctival Neoplasia. *Arch ophthalmol.* 1986; 104: 1801-1805.
12. Naghashfar Z., McDonnell P., McDonnell J. Genital Tract Papillomavirus Type 6 in Recurrent Conjunctival Papilloma. *Arch ophthalmol.* 1986; 104: 1814-1815.
13. Saegusa M., Takano Y., Hashimura M. et al. HPV type 16 in conjunctival and junctional papilloma, dysplasia, and squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 1995; 48: 1106-1110.
14. Poole TRG. Conjunctival squamous cell carcinoma in Tanzania. *Br J Ophthalmol.* 1999; 83:177-179.
15. Moreno LF., Reinoso C., Mencía E. Mitomicina C tópica como tratamiento coadyuvante en la papilomatosis conjuntival recurrente.
16. Gallagher MJ., Giannoudis A., Herrington CS. Human papillomavirus in pterygium. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85: 782-784.
17. Shields C., Lally M., Singh A. Oral Cimetidine (Tagamet) for Recalcitrant, Diffuse Conjunctival Papillomatosis. *Am J Ophthalmol* 1999; 128: 362-364.
18. Grove A., Papale J., Albert D. Detection of Human Papillomavirus DNA sequences in Conjunctival Papilloma. *Am J Ophthalmol* 1983; 96: 670-674.
19. Lee, Hirts. Ocular Surface Squamous Neoplasia. *Surv Ophthalmol* 39 (6) May-June 1995.
20. Kiire CA, Dhillon B. The aetiology and associations of the conjunctival intraepithelial neoplasia. *Br J Ophthalmol* 2006;90:109-13

21. Odrich MG, Jakobiec FA, Lancaster WI, et al. A spectrum of bilateral squamous conjunctival tumors associated with human papillomavirus type 16. *Ophthalmology*. 1991;98:628–35.
22. Hughes D, Powell N. Will vaccination against human papillomavirus prevent eye disease? A review of the evidence. *Br J Ophthalmol* 2008;92:460–465.
23. Tulvatana W, Bhattaekosol P. Risk factors for conjunctival squamous cell neoplasia: a matched case-control study. *Br J Ophthalmol* 2003;87:396–398.
24. Karcioglu Z. Human papilloma virus in neoplastic and non-neoplastic conditions of the external eye. *Br J Ophthalmol* 1997;81:595–598.
25. López R, Martínez L. Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infectious Agents and Cancer* 2008, 3:3.
26. McKelvie P, Daniell M. Squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *Br J Ophthalmol* 2002;86:168–173.
27. Basti S, Macsai M. Ocular Surface Squamous Neoplasia. *Cornea*. 2003; 22:687-704.
28. Tunc M, Char D. Intraepithelial and invasive squamous cell carcinoma of the conjunctiva: analysis of 60 cases. *Br J Ophthalmol* 1999;83:98–103.
29. [Bartlett, Stirling. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Methods Mol Biol. 2003; 226:3-6](#)

30. Griffiths, J.F. A. et al. (2002). *Genética. McGraw-Hill Interamericana*. ISBN 84-486-0368-0.
31. Coleman, WB y Tsongalis, GJ (2006). *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Humana Press. ISBN 1-58829-356-4.pgs. 47-56 y 65-74
32. Butler, JM (2005). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR*. Academic Press pgs 63-84. ISBN 0-12-147952-8.