



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**PANEL VIRAL EN PTERIGIÓN UTILIZANDO TÉCNICAS DE BIOLOGÍA
MOLECULAR**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

JAVIER ACOSTA GONZÁLEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. HECTOR JAVIER PEREZ CANO

CIUDAD UNIVERSIDAD, CDMX, ENERO DEL 2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Mireya Rodríguez Penagos.

VOCAL: **Profesor:** Martha Patricia Coello Coutiño.

SECRETARIO: **Profesor:** Héctor Javier Pérez Cano.

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Aurora Lara Núñez.

2º SUPLENTE: **Profesor:** Rocío Gabriela Tirado Mendoza.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ.

ASESOR DEL TEMA:

HÉCTOR JAVIER PÉREZ CANO.

FIRMA:

SUSTENTANTE:

JAVIER ACOSTA GONZÁLEZ.

FIRMA:

Agradecimientos.

A mi madre Mónica:

Gracias por ayudarme a seguir mis sueños y sobre todo por apoyarme en todo momento.

A mis Padres:

Gracias por inculcarme los valores que día a día los ejerzo con mucho orgullo. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mi universidad:

Le agradezco por darme tantas oportunidades de estar en tu exclusiva filas como un gran universitario.

A mis amigos:

Gracias por toda su confianza y tolerancia sobre mí.

Al Doctor Héctor Javier Pérez Cano:

Mucha salud y paciencia a su persona.

¡Pobrecito del Diablo, qué lástima le tengo, porque nunca he oído jamás una palabra de compasión o de cariño así él!

José Rubén Romero (Pito Pérez)

Índice

Temas.	Página
Resumen.	1
Antecedentes.	2
1 Pterigi3n.	2
Morfolog3a.	2
Epidemiolog3a.	4
Clasificaci3n.	6
Cuadro cl3nico.	6
Diagn3stico diferencial.	7
Complicaci3n.	8
Criterios para una intervenci3n quir3rgica.	8
2 Factores de desarrollo del Pterigi3n.	9
Teor3a multifactorial en la generaci3n de Pterigi3n.	10
3 Virus oncog3nicos.	12
Clasificaci3n de los virus oncog3nicos.	13
4 Virus del Papiloma Humano (VPH).	14
Estructura y replicaci3n de los VPH.	14
Tratamiento para el VPH.	16
M3todos de detecci3n.	17
5 Herpes virus Humanos.	17
Caracter3sticas generales de los <i>herpesvirus</i> .	17
Clasificaci3n de los <i>herpesvirus</i> .	18
Replicaci3n e infecci3n de los <i>herpesvirus</i> .	20

Tratamiento general para los <i>herpesvirus</i> .	22
Métodos de detección de los herpes virus.	22
6 Planteamiento del problema.	23
7 Hipótesis.	23
8 Objetivos.	24
Objetivos particulares.	24
9 Materiales y métodos.	25
10 Resultados.	29
11 Discusión.	37
12 Conclusiones.	39
13 Referencias.	40
14 Glosario.	46
15 Anexo 1.	48

Índice de Tablas.

#	Temas.	Página
1	Clasificación de Pterigión.	6
2	Características generales de las principales familias de los virus oncogénicos del grupo de ADN.	13
3	Propiedades generales de los Herpes virus.	19
4	Secuencias de oligonucleótidos utilizados.	26
5	Volúmenes de los reactivos de la técnica de PCR.	27
6	T _m y ciclos utilizados para cada programa de la técnica de PCR.	29
7	Resultados obtenidos para la presencia de ADN-viral en Pterigión.	35

Índice de Figuras.

#	Temas.	Página
1	Representación visual de un Pterigión.	3
2	Mapa mundial que muestra la región en donde existe prevalencia de Pterigión.	5
3	Representación visual del diagnóstico diferencial del Pterigión.	8
4	Un modelo multi-paso propuesto por Chalkia <i>et al</i> para la patogénesis del Pterigión.	11
5	Mecanismo de acción del Aciclovir.	22
6	Gel de agarosa para detectar el producto de PCR para el VHS-1.	30
7	Gel de agarosa para detectar el producto de PCR para el VVZ se observan diferentes bandas que corresponde a productos inespecíficos.	30
8	Gel de agarosa para detectar el producto de PCR para el VVZ.	31
9	Gel de agarosa para detectar el producto de PCR para el VEB.	32
10	Gel de agarosa al 1.5% para visualizar el producto de PCR para VEB de pacientes con Pterigión que resultaron positivos en un primer PCR.	32
11	Gel de agarosa para detectar el producto de PCR para el VPH.	33
12	Gel de agarosa para detectar el producto de PCR para el CMV.	34
13	Detección de (A) VPH y (B) VEB en un grupo control y pacientes con Pterigión.	36

Abreviaturas.

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico.
CMV:	Citomegalovirus.
p53:	Gen supresor de apoptosis.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
TAE:	Tris Acetato EDTA.
UV:	Ultravioleta.
VEB:	Virus Epstein Barr.
VHS:	Virus del Herpes Simplex.
VPH:	Virus del Papiloma Humano.
VVZ:	Virus de la Varicela Zoster.

Resumen.

El Pterigión es una lesión fibrovascular que se origina en la conjuntiva y se extiende hasta la superficie corneal. Puede ser primario ó recurrente, también llamado recidivante. Los factores de riesgo de esta enfermedad involucran desde la exposición a los rayos UV hasta infecciones virales. La teoría multifactorial es la teoría más aceptada para el desarrollo de Pterigión donde están involucradas las infecciones virales de carácter oncogénico. El propósito de este trabajo fue determinar la presencia de ADN viral en el Pterigión utilizando técnicas de biología molecular. Determinar si los virus oncogénicos VPH, VHS-1, VVZ, CMV y VEB están implicados en el desarrollo de esta enfermedad. Con ello, implementar un panel viral el cual será una buena herramienta para la detección de ADN viral en esta enfermedad. En las muestras analizadas en este trabajo se detectó la presencia de ADN-VPH en 2 muestras (8%) y VEB en 7 (28%). Comparando los resultados con un grupo control, se encontró una diferencia significativa utilizando la prueba exacta de Fisher de Chi Cuadrada ($p=0.00119$ y 0.0001 respectivamente). Se implementaron las condiciones adecuadas para realizar un panel viral utilizando la reacción en cadena de la polimerasa que nos permita detectar la presencia de ADN viral en muestras de Pterigión, de tal forma que, es posible aplicar este panel viral como apoyo al diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

Antecedentes

1. Pterigi3n.

T3rmino que deriva del griego *Pteros* que significa alas, es una enfermedad ocular neopl3sica benigna, de etiopatolog3a desconocida, que se caracteriza por el crecimiento anormal de tejido fibrovascular de la conjuntiva bulbar que, en etapas avanzadas, invade la c3rnea. Cuando el padecimiento es diagnosticado se conoce como Pterigi3n primario. Si despu3s del tratamiento, que a menudo es quir3rgico, crece nuevamente este tejido, entonces se le conoce como Pterigi3n secundario, recurrente o recidivante.¹⁻³

Morfolog3a.

El Pterigi3n est3 dividido morfol3gicamente en 3 3reas: la cabeza, el cuello y el cuerpo. (Figura 1) La cabeza tiene un color gris3ceo; tiende a ser de forma plana y avascular situada en el 3pice (punta creciente del Pterigi3n).¹ En los bordes anteriores de la cabeza del Pterigi3n se distingue una l3nea de hierro pigmentada de epitelio conocido como l3nea de Stocker, el cuello conecta la cabeza y el cuerpo irrigados por nuevos vasos finos incipientes.¹⁻³

El cuerpo se localiza sobre la conjuntiva bulbar.¹ Contiene c3lulas de fibroblastos, vasos sangu3neos y se acompa3a de un infiltrado celular inflamatorio con una gran acumulaci3n de matriz extracelular anormal, compuesta de elastina y col3geno.²

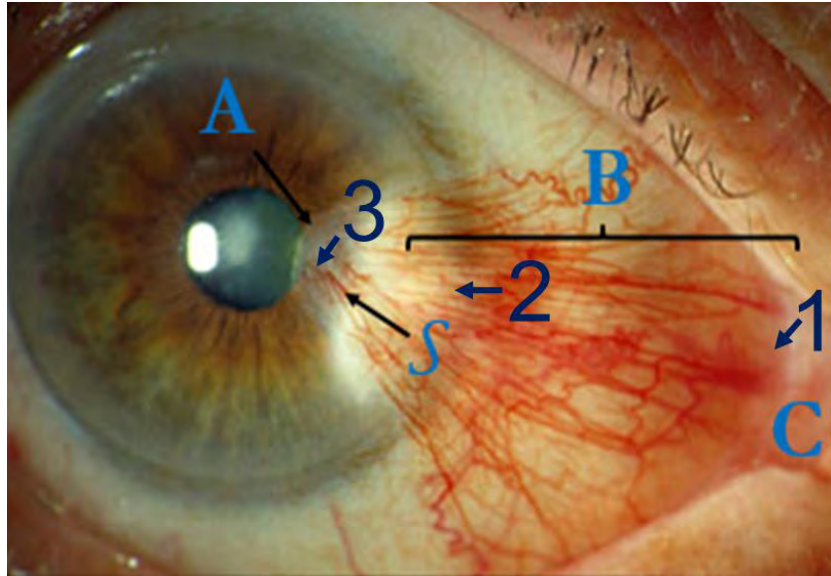


Figura 1. Representación visual de un Pterigi3n nasal con invasi3n hasta el 1rea pupilar. A: Cabeza, B: Cuello, C: Cuerpo. S: L3nea de Stroker. Crecimiento del Pterigi3n. 1: Punto de anclaje sobre la conjuntiva bulbar, 2: Crecimiento hasta la zona limbal, 3: Crecimiento en la zona corneal.

La conjuntiva bulbar se caracteriza por ser una membrana mucosa vascularizada y contiene un epitelio escamoso estratificado no queratinizado.² El estroma conjuntival est1 conformado por una capa externa linfoide y una capa interna fibrosa vascularizada en donde hay presencia de fibroblastos, quienes producen col1geno y elastina.² La tenon es una capa fibrosa de tejido el1stico y la epiesclera, un tejido laxo muy vascularizado.² El limbo o uni3n esclerocorneal es una zona circular, ligeramente sobreelevada, que corresponde a la l3nea de transici3n entre la c3rnea y la esclera.² Est1 compuesto predominantemente de epitelio en el que se encuentran principalmente las c3lulas madre que, como se sabe, son pluripotenciales y tienen la funci3n de mantener la integridad y normalidad del epitelio corneal.²

Estas zonas descritas previamente, pueden sufrir un daño físico, químico y/o biológico. Un posible factor dañino es la exposición crónica a la luz UV.² Esto da lugar a una proliferación masiva en el endotelio vascular, dando lugar a un engrosamiento aproximadamente de 50 a 100 veces su tamaño normal, donde se produce el metabolismo anormal de los fibroblastos que involucra el colágeno I, la elastina y una sobreproducción de metaloproteinasas.² En la década de los 80' se reportó la presencia viral en la conjuntiva bulbar del Pterigión destacando el virus del papiloma humano (VPH).^{3,4}

La génesis del Pterigión topográficamente se divide en tres zonas: la primera, el punto de anclaje de la conjuntiva, tenon y epiesclera a 3 mm del limbo; la segunda es el limbo y la tercera la córnea. Se inicia el Pterigión en el punto de anclaje y los tejidos que lo conforman.^{2,3} (Ver Figura 1)

Epidemiología.

El Pterigión está presente a nivel mundial, pero es más frecuente en los climas cálidos y secos, con predominio en países comprendidos entre los 37° de latitud norte y sur, con mayor frecuencia en zonas rurales que en las zonas urbanas y no hay predominio en un sexo u otro cuando las condiciones de vida son similares.⁵⁻⁷ La incidencia del Pterigión aumenta con la edad, siendo el grupo más afectado entre los 20 y los 50 años.^{5,6} La prevalencia en la población China de Singapur es del 7 %, ⁸ en la región de las montañas azules en Sidney (Australia) es del 7,3 %, ⁵ en

Victoria (Melbourne, Australia) es del 6,7 %, ⁵ y mucho más frecuente (alcanza un 56 %) en la población esquimal de Groenlandia. ⁵ En el hemisferio occidental, se observa una mayor frecuencia en América Central y en el Caribe. En Estados Unidos de Norteamérica los índices más elevados se dan en los estados del sur. ⁵ En un estudio realizado en Perú, se reporta una prevalencia del 31,0 %. ⁹ En Cuba, por su parte, ocupa el tercer lugar de prevalencia (17,3 %) ⁵ (Figura 2).



Figura 2. Mapa mundial que muestra la región en donde existe mayor prevalencia de Pterigi6n. México se encuentra dentro de esta zona de mayor prevalencia.

Clasificación.

Existen dos formas de clasificar al Pterigión, histológicamente y con base a su crecimiento. Con base a su histología, el Pterigión se clasifica en angiomatoso, fibroso y puede haber una combinación que se clasifica como mixto.¹ Con base a su crecimiento se estratifica en grados del I al IV.⁵ (Tabla 1)

Tabla 1. Clasificación del Pterigión.

Clasificación histológica del Pterigión			
Angiomatoso.	Fibroso.	Mixto.	
El estroma contiene un número significativo de canales vasculares con presencia de edema en espacio intervascular	El estroma presenta principalmente fibrosis con pocos elementos vasculares	Contiene características del Pterigión tanto angiomatoso como fibroso	
Clasificación del Pterigión con base a su crecimiento			
Grado I.	Grado II.	Grado III.	Grado IV.
Crecimiento hasta la zona limbo corneal	Crecimiento entre el limbo corneal y el área pupilar	Crecimiento hasta el área pupilar	Crecimiento que sobrepasa el área pupilar

Cuadro clínico.

En los casos leves, el Pterigión a menudo es asintomático;⁵ sin embargo, en los casos avanzados, la zona elevada puede causar queratopatía epitelial sintomática y provocar lagrimeo reflejo, fotofobia y sensación de

cuerpo extraño.⁴ Los estudios han corroborado que una longitud de 3 mm de Pterigión desde el limbo, es lo suficientemente importante como para provocar astigmatismo.⁵ También es posible que el Pterigión invada el eje visual y cause una pérdida visual grave.⁵ En el Pterigión recurrente o recidivante, después de cirugías múltiples, se han observado casos de visión doble (diplopía) debido a la adhesión entre la conjuntiva bulbar y el párpado (simbléfaron).^{5,10}

Diagnóstico diferencial.

El Pterigión puede confundirse con otras enfermedades relacionadas a la conjuntiva bulbar, entre estas podemos mencionar a la Pingüecula que es un depósito blanco-amarillento de la conjuntiva bulbar en su vertiente nasal ó temporal, con un crecimiento lento o inexistente.^{3,5} El Pseudopterigión que es la adherencia de un pliegue de conjuntiva a una úlcera corneal periférica o adelgazamiento corneal, libre en uno de sus extremos y unido en su vértice a la córnea. Un verdadero Pterigión está unido en toda su extensión a la conjuntiva bulbar subyacente.^{3,5} Quiste de retención conjuntival, una lesión frecuente, habitualmente asintomática que contiene líquido claro en su interior y la Epiescleritis, un trastorno común, benigno, autolimitado y recurrente que afecta a jóvenes y adultos.⁵ (Figura 3)

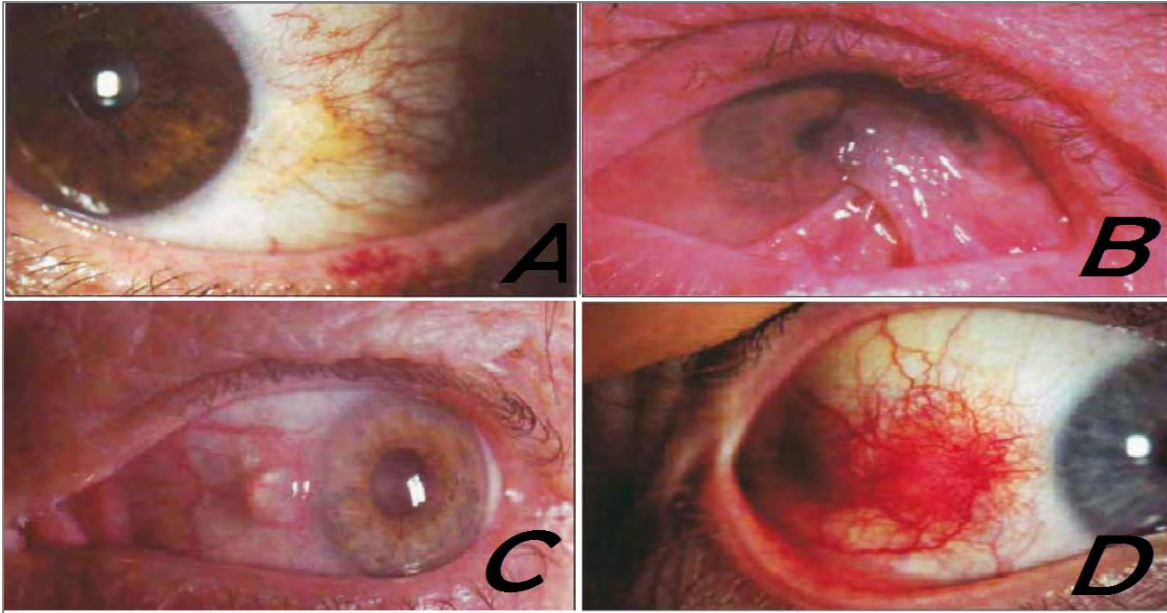


Figura 3. Representación visual del diagnóstico diferencial del pterigión. A: Pinguécula, B: Pseudopterigión, C: Quiste de retención conjuntival y D: Epiescleritis. (Imagen tomada de: Rojas, 2009).

Complicaciones.

Las complicaciones que pueden aparecer en la enfermedad por Pterigión son: irritación crónica, disminución de la visión debido a que afecta también al eje visual o astigmatismo inducido, la interrupción de la película lagrimal, así como la inflamación crónica del Pterigión.^{4,5}

Criterios para una intervención quirúrgica.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento generalmente es quirúrgico, sobre todo en los pacientes con grado II al IV, sin embargo, cuando se trata de un paciente con Pterigión grado I solo son candidatos a cirugía aquellos con relieve y síntomas como prurito, ardor, lagrimeo y sensación de arenilla.^{5,10}

2. Factores de desarrollo del Pterigi3n.

Los factores relacionados al desarrollo del Pterigi3n se dividen en tres grupos, estos son: factores f3sicos, biol3gicos y qu3micos; sin embargo, es dif3cil clasificarlos porque siempre hay una combinaci3n de ellos ya sea por causa o consecuencia.^{1,11}

Dentro de los factores f3sicos podemos mencionar la luz ultravioleta (UV), al mismo tiempo, puede presentarse un factor biol3gico al haber alteraciones gen3ticas, como la formaci3n de d3meros de pirimidinas, que puede afectar la expresi3n gen3tica. Un ejemplo de ello es la alteraci3n encontrada en el gen supresor de apoptosis (*p53*) en las c3lulas madre limbales,¹² seg3n propone MT Coroneo¹¹, son por una exposici3n cr3nica a la radiaci3n.^{3,13} En el caso del Pterigi3n, la exposici3n a la luz UV ocasiona el crecimiento del tejido fibroso de la conjuntiva bulbar invadiendo la conjuntiva del epitelio corneal.¹²

Un mecanismo biol3gico es el de tipo inmunol3gico, en el cu3l existe una reacci3n de hipersensibilidad tipo I, generada por factores f3sicos tales como elementos irritantes ex3genos, polvo, viento, micro lesiones, incluso pueden estar involucrados los factores qu3micos que pueden provocar una inflamaci3n local dando lugar a un incremento en la producci3n de IgE.^{1,5} Tambi3n se ha observado la presencia de una sobreproducci3n de ciertas metaloproteinasas de la matriz extracelular, debido a una estimulaci3n inflamatoria como las mediadas por las interleucinas y por factores de necrosis tumoral.^{11,13}

La presencia de virus oncogénicos en un sub grupo de pacientes mostró relación con el desarrollo del Pterigión, lo cual ha demostrado que las infecciones virales también tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.^{4,14} Los oncovirus presentan genes que codifican proteínas específicas cuya principal función es la alteración de la regulación del ciclo celular, afectando, por ejemplo, al gen *p53* que es un gen supresor de tumores.¹⁵

M T Coroneo¹¹ en 1993 menciona que al parecer existe una predisposición genética para desarrollar Pterigión, otros autores refieren una aparente transmisión a través de varias generaciones.^{3,16} También se han propuesto las anomalías de la función lagrimal como un factor desencadenante de la formación de Pterigión por las microlesiones generadas por una lubricación deficiente, provocando una inflamación crónica.¹³

Teoría multifactorial en la generación de Pterigión.

Chalkia *et al* en el año 2013 propuso el concepto de multi-pasos que abarca la participación de los tres factores mencionados anteriormente, la herencia genética, la radiación UV y la infección viral.^{3,4} Según esta hipótesis hay dos factores que disparan el inicio de la enfermedad, el primero es la predisposición genética y/o la exposición prolongada a factores ambientales que predispone a los individuos a esta enfermedad neoplásica benigna.^{3,14} El segundo factor es la presencia de virus

oncogénicos y/o la exposición adicional de radiación ultravioleta, esto añade más daños a un material genético ya susceptible, lo que puede ser el estímulo para el desarrollo o la repetición (recidiva) del Pterigión.^{3,4} (Figura 4).

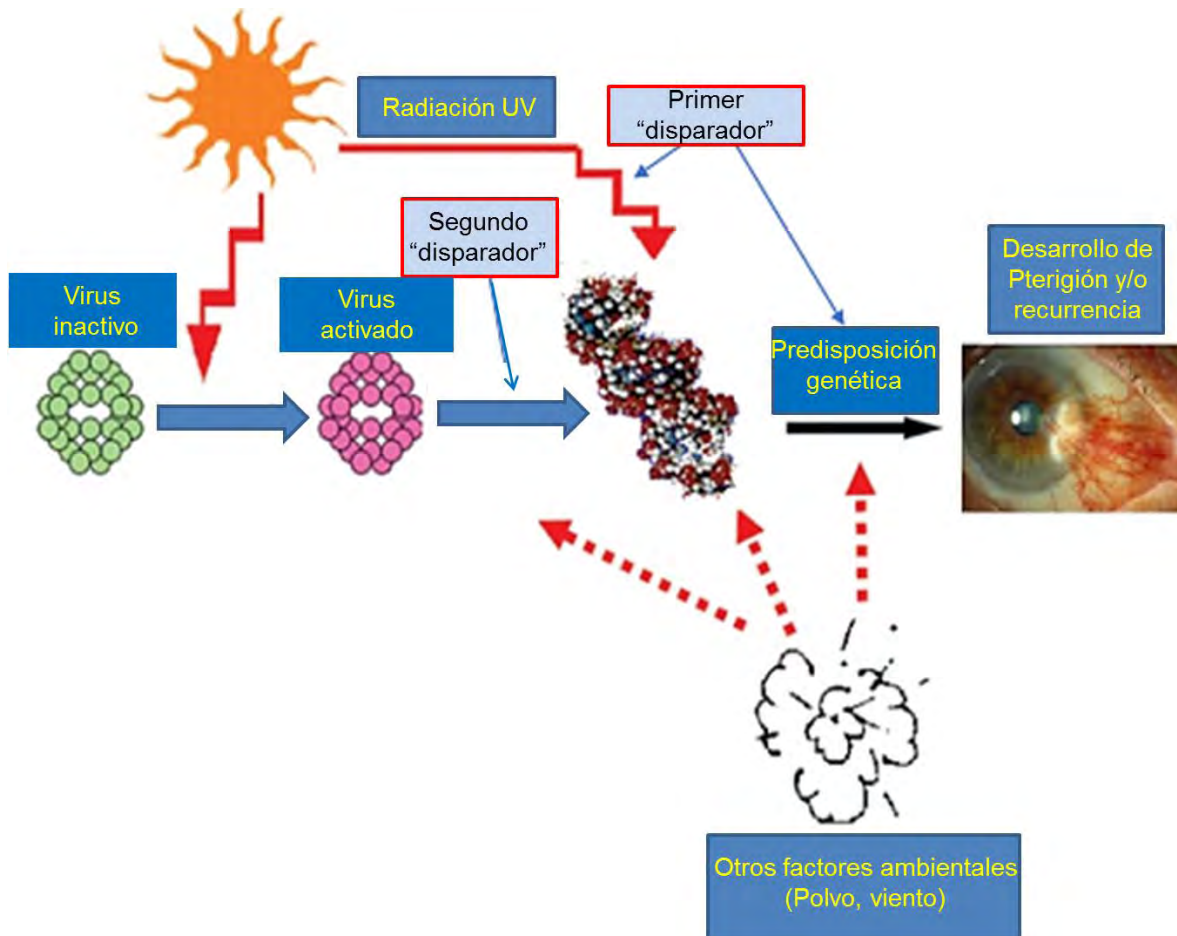


Figura 4. Modelo multi-paso propuesto por Chalkia *et al* para la patogénesis del Pterigión, en el cual la infección viral, la predisposición genética y los factores ambientales co-participan. El primer paso es la preexistencia de daño genético que puede estar dado por la exposición a la radiación ultravioleta o debido a predisposición genética. El segundo paso es el contacto con un virus oncogénico o bien la exposición a factores ambientales como el polvo, el viento que causa la evaporación de la lagrime dañando el epitelio conjuntival. (Imagen tomada de Chalkia⁴, 2013).

3. Virus oncogénicos.

Los virus oncogénicos u oncovirus son aquellos agentes etiológicos que en su proceso de infección provocan cambios en el material genómico de sus huéspedes y posiblemente generan células malignas.¹⁷ Históricamente a los primeros virus oncogénicos se les denominaban “agentes filtrables libres de células”.¹⁸ Los años 60’s y 70’s se caracterizaron por la búsqueda del "virus oncogénico humano". En el año de 1970, Howard Temin y David Baltimore demostraron que los principales oncovirus en realidad eran retrovirus, con el estudio de dichos agentes, se estableció el concepto de virus oncogénicos.^{17,18}

El mecanismo de acción de los virus oncogénicos está relacionado con la alteración del control del crecimiento celular y su regulación, dando así, cambios a la integridad del ADN que pueden causar un crecimiento anormal de la célula.¹⁷ Los oncovirus cuentan con genes que pueden ser activados por diferentes mecanismos moleculares que dan como resultado alteraciones en el material genético, como por ejemplo: mutaciones puntuales, inserciones de pequeños fragmentos de ADN, deleciones, translocaciones, amplificación génica y sobreexpresión de la proteína codificada del oncogen.¹⁷ En cuanto a los cambios producidos por los oncovirus en la célula huésped, podemos destacar las alteraciones en la regulación celular que se da por dos mecanismos y que pueden ocurrir simultáneamente, ya sea por inserción de genes transformantes y la transducción.^{17,18}

Clasificación de los virus oncogénicos.

Basado en la estructura del ácido nucleico, los virus oncogénicos se clasifican principalmente en dos grupos¹⁷, en el primer grupo se encuentran los virus con ADN, entre los que se incluyen miembros de las familias *Poxvirus*, *Herpesvirus*, *Adenovirus*, *Papovavirus* y *Hepadnavirus*.¹⁸ (Tabla 2) En el segundo grupo se encuentran los virus con ARN, entre que destacan los miembros de la familia *Retroviridae*.

Tabla 2. Características generales de las principales familias de los virus oncogénicos del grupo de ADN.¹⁷

Familia	Oncovirus	Enfermedades	Factor(es) viral(es)	Mecanismos
<i>Retroviridae</i>	Virus Linfotrópico T Humano tipo I y tipo II.	Linfoma de las células T del Adulto.	Proteína Tax (pTax). Factor nuclear NF-kappa-β.	Inhibe el control del ciclo celular. Inhibe la expresión de la Polimerasa-β.
<i>Hepadnaviridae</i>	Virus de la Hepatitis B.	Carcinoma hepatocelular.	Proteína viral HBx.	Afecta el gen promotor de la metiltransferasa, en los genes p53, Rb, ciclina D1 y p16.
<i>Flaviviridae</i>	Virus de la hepatitis C.	Hepato-carcinoma.	Proteína del núcleo. Glicoproteína E2.	Inhibe a los genes supresores de tumores: p53, p73 y Rb.
<i>Papovaviridae</i>	Virus del Papiloma Humano.	Cáncer cervical.	Proteína E6 y E7	Degradación de p53 e inactivación de p105RB.
<i>Herpesviridae</i>	Virus de Epstein-Barr.	Linfoma de Burkitt. Sarcoma de Kaposi.	La proteína LMP-1.	Transformación y regulación de varios factores celulares.

4. Virus del Papiloma Humano (VPH).

La infección más frecuente del VPH es por transmisión sexual, se estima que el 2% de las mujeres en edad fértil tiene presencia de VPH y de este grupo el 30% fue transmitido por actividad sexual. Hay una menor frecuencia de infección por VPH en la auto inoculación y en contacto con superficies inertes, como material quirúrgico, que actúan como fómites.^{19,20}

La clasificación genotípica de los VPH se basa en la homología de la secuencia del gen *L1*.^{21,22} Se han identificado por lo menos 100 genotipos los cuales forman 16 grupos (α a π).²³ También se pueden clasificar con base al tejido infectado como VPH cutáneos ó VPH mucosos.²⁴

Estructura y replicación de los VPH.

El VPH contiene una cápside en forma icosaédrica de diámetro entre 50 y 55 nm.²⁵ Está formada por dos tipos de proteínas estructurales, una de ellas es la proteína L1 de un peso molecular de 559 kDa que la contiene al 80% y L2 de 76 kDa al 20% que juntas forman 72 capsómeros.²⁵ El genoma del VPH es circular y tiene un tamaño aproximadamente de 7200 a 8.000 pares de bases, contiene de 9 a 10 regiones codificantes.^{26,27}

El genoma del VPH está dividido en tres regiones, la primera es la región E (Early) o temprana, la cual contiene de 7 a 8 genes codificantes de expresión temprana (*E1* a *E8*),²⁷ los genes *E1* y *E2* están involucrados en

la regulación y transcripción del ADN viral, *E1* a *E4* están implicados en el control de la transcripción, *E5* a *E8* son genes asociados a los procesos de transformación celular; dependiendo del genotipo del virus.²⁵ *E6* es un oncogén cuyo producto proteico se une a la proteína p53 y estimula su degradación; el producto proteico del oncogén *E7* se une a p105RB (producto génico *p105* del gen *retinoblastoma*) evitando la apoptosis.²⁵ La segunda región L (Late) o tardía, está formada por dos secuencias (*L1* y *L2*), responsables de la codificación de las proteínas de la cápside en la fase final de ensamblaje viral.²⁷ La tercera región denominada unidad reguladora no codificada (URR) o también unidad larga de control (LCR) contiene las secuencias de ADN que permite el control de la replicación y de la expresión del genoma viral.¹⁹

Por lo general el VPH ingresa a través de la capa de células basales, el virus se introduce por pequeñas fisuras localizadas en la piel.²⁷ Los genes vírales de expresión temprana son estimulados por la proliferación celular del huésped; la replicación del genoma vírico se lleva a cabo por la polimerasa de ADN de la célula hospedera.²⁵ Hay un aumento en el número de células hospederas por la infección, el virus induce un engrosamiento del estrato espinoso y de la capa celular basal; dando así origen a la verruga o papiloma.¹⁹ El virus aprovecha la maduración de las células en la piel para poder invadir las capas cutáneas y para desprenderse con las células muertas de la capa superior.²²

Los genotipos VPH-16 y VPH-18 originan papilomas cervicales y displasia, al menos un 85% de los carcinomas cervicales contiene ADN-VPH, de ellos el 50% corresponde al VPH-16 y un 20% corresponde al VPH-18.²⁷ Se ha demostrado también, la presencia viral del VPH en fase de latencia en la superficie ocular dando así un cuadro de enfermedades oftalmológicas que puede ir desde el Pterigión hasta el carcinoma de células escamosas de la conjuntiva.²⁸

Las proteínas E6 y E7 se han identificado como oncoproteínas debido a su capacidad de unirse e inactivar las proteínas supresoras del crecimiento celular, p53 y el producto del gen *retinoblastoma*.²⁵ En ausencia de estas barreras del crecimiento celular, la célula sería más vulnerable a la mutación, por tanto, daría lugar a una neoplasia.¹⁷

Tratamiento para el VPH.

En la actualidad no existe un fármaco de elección que sea específico en contra del VPH. Existen métodos terapéuticos que destruyen las células infectadas mediante métodos físicos, químicos y quirúrgicos. La mayoría de los tratamientos contra el VPH están enfocados en remover mecánicamente la lesión, entre los que destacan la crioterapia, el ácido salicílico y el ácido tricloro acético.²¹

En oftalmología, los fármacos más utilizados son los antimitóticos destacando la mitomicina C y el 5-flouracilo como tratamiento de elección en el carcinoma de células escamosas de la conjuntiva y en el Pterigión.³

Métodos de detección del VPH.

Los estudios de rutina para el diagnóstico del VPH están enfocados a detectar la presencia de ADN-VPH. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la más utilizada debido a su alta sensibilidad y especificidad, la fracción amplificada corresponde al gen *L1*.²⁹

5. Herpes virus humanos.

La mayoría de los virus del Herpes humano son responsables de los principales cuadros de afectación oro-facial, estos virus se contraen durante la infancia o en la adolescencia por medio del contacto de secreciones infectadas.^{30,31} Contienen una cadena de ADN cubierta por una cápside icosaédrica y ésta, a su vez, se rodea de un tegumento que contiene entre 15 y 20 proteínas y que está en contacto directo con una envoltura que contiene numerosas glicoproteínas.³²⁻³⁴

Características generales de los herpes virus.

La familia *Herpesviridae*, contiene únicamente el género *herpesvirus* que abarca más de 100 especies y de las cuales se reporta que solo 8 especies infectan al ser humano.³²

Estos virus que afectan a los seres humanos tienen en común, al menos tres características:

- Una cápsula icosaédrica de 162 capsómeros, recubiertos de una envoltura viral.³²

- Su genoma comprende una única molécula de ADN, aproximadamente de 120 a 250 kpb.³² La Tabla 3 muestra información a detalle del tamaño genómico de las 8 especies de *herpesvirus* humano con algunas propiedades generales.
- La infección viral tiende al tropismo, con una recurrencia alta en las superficies u órganos que infectan.^{30,32}

Clasificación de los herpes virus.

Los *herpesvirus* humanos se clasifican a su vez en tres subgrupos o subfamilias:

- El subgrupo alfa (α), conocido como la subfamilia *alphaherpesvirinae*, incluye los virus VHS-1, VHS-2 y VVZ (VHS-3).³⁰
- El grupo beta o subfamilia *betaherpesvirinae*, incluye CMV (VHS-5), el VHS-6 y VHS-7.³⁰
- La subfamilia *gammaherpesvirinae*, incluye el VEB (VHS-4) y el VHS-8 o Sarcoma de Kaposi.³⁰

Tabla 3. Propiedades generales de los Herpes virus.

Tipos de Herpes	Nombre	Tamaño del genoma	Enfermedades	Blanco de infección/ Latencia	Mecanismo de transmisión
1 ó VHS-1	Virus del Herpes Simplex tipo 1.	152 Kpb.	Herpes labial, herpes genital, queratoconjuntivitis y encefalitis.	Mucoepitelio/ Neuronal.	Contacto directo con secreciones, generalmente oral y genital.
2 ó VHS-2	Virus del Herpes Simplex tipo 2.	155 Kpb.	Herpes genital, rectal, labial y neonatal. Meningitis.	Mucoepitelio/ Neuronal.	Contacto directo con secreciones genitales.
3 ó VVZ	Virus Varicela Zoster.	125 Kpb.	Varicela Herpes Zoster.	Mucoepitelio/ Neuronal.	Por vía respiratoria Contacto con vesículas de piel o mucosas.
4 ó VEB	Virus Epstein Barr.	175 Kpb.	Linfoma no Hodgkin y de Burkitt. Mononucleosis infecciosa.	Linfocitos B, epitelio/Linfocito B.	Contacto con secreciones respiratorias y saliva.
5 ó CMV	Citomegalovirus.	>229 Kpb.	Retinitis, esofagitis y síndrome de mononucleosis incompleto.	Epitelio, monocitos y linfocitos/ monocitos y linfocitos.	Secreciones orofaríngeas, fluidos corporales y sangre.
6 ó VHS-6	Virus del Herpes Simplex 6.	159 Kpb.	Encefalitis. Exantema súbito.	Linfocitos T y otros/ Linfocitos T y otros.	Contacto principalmente por rutas respiratorias.
7 ó VHS-7	Virus del Herpes Simplex 7.	145 Kpb.	Encefalitis. Exantema súbito.	Linfocitos T y otros/ Linfocitos T y otros.	Desconocida.
8 ó VHS-8	Virus del Herpes Simplex 8.	160-170 Kpb.	Sarcoma de Kaposi.	Células endoteliales/ desconocido.	Fluidos corporales.

Replicación e infección de los herpes virus.

Los *herpesvirus* tienen varias regiones conservadas, hay genes homólogos que se han descrito en siete bloques de genes conservados que se localizan en el centro del genoma. La latencia es una característica que comparten todos los herpes virus.³⁰

La infección viral. De la información de los herpes virus recolectada, hasta el día de hoy, se puede dividir el ciclo viral en distintas fases:

- Fase de entrada

Consiste en 2 eventos principales; la unión del virus a la superficie celular y la fusión con la membrana plasmática.³⁰

La unión a la superficie celular se hace por medio de receptores celulares específicos, que son principalmente gB y gC. Posteriormente se fusiona la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula, con la participación de las glicoproteínas gB, gD, gH y gL.³⁴

- Expresión de los genes virales

Dentro de la célula infectada, la ARN polimerasa tipo III produce hasta 50 tipos diferentes de *mARN* que están organizados en 3 bloques: Inmediatamente tempranos (alfa), tempranos (beta) y tardíos (gamma):³⁴

Las proteínas tempranas del bloque alfa, son principalmente para la replicación genómica; de éstas, las reconocidas son las desoxipirimidin (timidin) cinasas, ADN polimerasas virales, ribonucleótido reductasas y exonucleasas.³⁴

Bloque beta y gamma. La proteína del tegumento viral VP16 está implicada en la trans-activación inicial de estos genes. Entre los

mensajeros del bloque Beta se encuentran la polimerasa viral y la timidina quinasa (UL23).³³ Los genes del bloque Gamma codifican para las glicoproteínas de la envoltura, proteínas de la cápside, tegumento (VP16), la vhs y la proteasa viral (VP22).³⁴

En las células huésped, específicamente en el núcleo, se realiza la síntesis de ADN en las siguientes 3 horas post-infección, que continúa por 12 horas.³³ Para ello, el ADN viral se vuelve circular y la replicación se lleva mediante el proceso del círculo rodante.³³ El genoma de los *herpesvirus* tiene 3 orígenes de replicación.³⁴ Uno de ellos podría estar implicado en la replicación del genoma de herpes durante la fase de latencia por parte de la ADN polimerasa celular del huésped.³² Con éste mecanismo de replicación, se forman grandes concatémeros (secuencias repetidas en tándem), los cuales son cortados para la encapsidación del virión. Sólo alrededor del 25% del ADN viral codifica para proteínas utilizadas en la síntesis de viriones. El resto se acumula dentro de la célula.³³

La infección por VHS en el ojo humano se da por tres posibles mecanismos: el primero es mediante el contacto de herpes-mano-ojo lo cual explica las enfermedades en la superficie ocular; en el segundo mecanismo, en situaciones de inmunosupresión y/o estrés, el VHS cumple su fase de latencia en las terminaciones nerviosas y puede migrar a cualquier estructura ocular y el último mecanismo implica el contacto directo con secreciones infectadas.³²

Tratamiento general para los Herpes virus humanos.

Hasta el momento, hay muchos intentos de encontrar un tratamiento efectivo en contra de las infecciones de herpes, pero no se ha encontrado una cura permanente.³⁴

Los más utilizados en oftalmología son las terapias con anti-virales, entre los que destacan el Aciclovir, Valtrex (Balaciclovir) y Famvir (Famciclovir) los cuales son análogos de la base nucleotídica de guanina (Figura 5) que es 10 veces más afín a la ADN polimerasa viral en comparación de la polimerasa humana, dando así, el truncamiento en la síntesis del ADN viral.³⁴

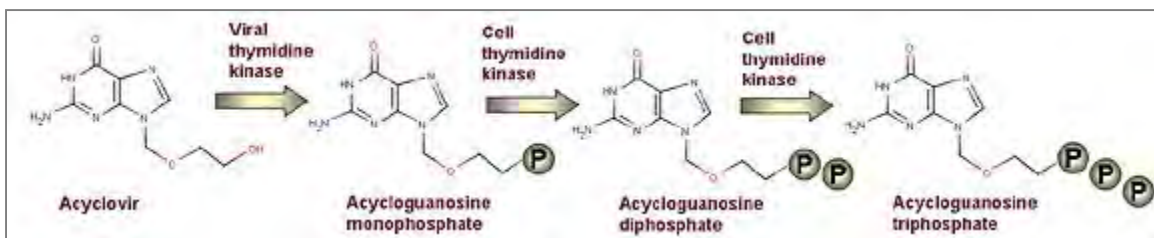


Figura 5. Mecanismo de acción del Aciclovir en el tratamiento de las infecciones causada por los herpes humanos.

Métodos de detección de VHS.

Existen diferentes tipos de técnicas para la detección de la infección por VHS, algunos detectan la presencia de anticuerpos dirigidos contra el virus y otros detectan ADN viral. Lo más recomendable es utilizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ya que esta técnica presenta alta sensibilidad y especificidad. El fragmento a amplificar para cada virus se muestran en la Tabla 4.³⁵

6. Planteamiento del Problema.

Los factores de riesgo para el desarrollo del Pterigión involucran desde la exposición a los rayos UV hasta infecciones virales. Existen reportes acerca del Pterigión en los cuales incluyen la búsqueda de virus oncogénicos incluyendo VPH, VHS, VZV, VEB o CMV. De aquí surge la necesidad de implementar un panel viral que ayude a la detección de estos virus en muestras tomadas de la lesión en pacientes con diagnóstico de Pterigión, esto podría servir como base para el desarrollo de protocolos de investigación para un mejor conocimiento de la enfermedad.

7. Hipótesis.

La implementación de un panel viral utilizando técnicas de biología molecular, será una buena herramienta para la detección de ADN viral en Pterigión.

8. Objetivo.

Desarrollar un panel viral, utilizando técnicas de biología molecular, para la detección de virus oncogénicos en Pterigión.

Objetivos particulares.

- Obtener muestras de Pterigión por cirugía o por raspado de la lesión.
- Realizar extracción de DNA de las muestras obtenidas.
- Establecer las condiciones de la técnica de PCR para la detección de cada uno de los virus a analizar.
- Realizar la PCR para las muestras obtenidas de pacientes con diagnóstico de Pterigión.

9. Material y métodos.

Se obtuvieron 25 muestras de pacientes, con diagnóstico de Pterigión, por cirugía colocando el tejido removido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL que contenía solución salina isotónica estéril y por raspado de la lesión, en pacientes con diagnóstico clínico de Pterigión grado I, utilizando un hisopo de rayón que posteriormente se colocó en un medio de transporte. Como sujetos control se obtuvieron 50 muestras de conjuntiva sana de sujetos sin antecedentes de Pterigión por raspado de la conjuntiva bulbar. Todos los participantes firmaron carta de consentimiento informado. (Anexo 1)

Como controles positivos para la realización de los PCRs de prueba para obtener las condiciones del método, se realizó la extracción de ADN de muestras de cultivos celulares los cuales fueron transfectados con VEB y VVZ. Para VPH se utilizó una muestra de cultivo de células HeLa. Estas muestras fueron obtenidas por donación de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana IAP.

Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó con el mini kit QIAamp (GIAGEN Sciences. Maryland, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. 200 µl de la muestra fueron incubados a 56°C/10 min, en buffer de extracción en presencia de proteinasa K (1 mg/ml). Se precipito con etanol al 100% y se pasó a una columna de QIAamp; se hicieron dos lavados con los

buffers correspondientes y se diluyó con buffer libre de ADNasas. Se realizó la cuantificación del ADN por nanoespectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop2000, ThermoScientific y el material genético fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

PCR específico para el VPH, VHS-1, VVZ, CMV y VEB.

Se realizó PCR para la detección de los virus oncogénicos elegidos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos, reportados en la literatura, para cada uno de los virus como lo muestran la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótidos	Secuencia	Gen	Tamaño del fragmento amplificado
VPH (F)	5'—CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC—3'	<i>L1</i>	450 pb
VPH (R)	5'—GCM CAG GGW ATA AYA ATG G—3'		
	<i>Donde M= A o C; R= A o G; W= A o T; Y= C o T</i>		
VHS-1 (F)	5'—CGG CCG TGT GAC ACT ATC G—3'	<i>US5</i>	128 pb
VHS-1 (R)	5'—ATC CGA ACA ACT CCC TAA CCC—3'		
VVZ (F)	5'—GGG CCA CAA TAA CAT AAG GGA TG—	<i>ORF28</i>	110pb
VVZ (R)	3' 5'—CGC CTA CAT AAA CCG TCG CTT—3'		
VEB (F)	5'—CGG TCT CGT AAA TGC TTC CCT—3'	<i>LMP1</i>	326 pb
VEB (R)	5'—CTA CCC ACA GAC CCA CG—3'		
CMV (F)	5'—CTT GCC CTG GAT GCG ATA CT—3'	<i>UL83</i>	326pb
CMV (R)	5'—ACG GCT TTA CGG TGT TGT CT —3'		

Cada reacción fue hecha en volumen total de 20 µl conteniendo 10 µl de la HotStar Taq Master Mix Polimerase (QIAGEN Sciences. Maryland, USA), con 2.5 U de Taq polimerasa, 1.5 nM de MgCl₂, 0.4nM de cada dNTP, 1X del buffer de reacción y un volumen de oligonucleótidos a una concentración tal como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Volúmenes de los reactivos de la técnica PCR.

Reactivo	VPH	VHS-1	VVZ	VEB	CMV
HS	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
F_(Conc.)	0.2 _(33 nM) µl	1.0 _(5 nM) µl	1.0 _(5 nM) µl	0.1 _(50 nM) µl	0.1 _(50 nM) µl
R_(Conc.)	0.2 _(33 nM) µl	1.0 _(5 nM) µl	1.0 _(5 nM) µl	0.1 _(50 nM) µl	0.1 _(50 nM) µl
DMSO	-	-	1.0 µl	-	-
H₂O	6.6 µl	6.0 µl	5.0 µl	7.8 µl	7.8 µl
ADN	5 a 10ng	5 a 10ng	5 a 10ng	5 a 10ng	5 a 10ng

HS: Hot Star Taq Master Mix. QIAGEN. DMSO: Dimetilsulfoxido. Los oligonucleótidos sin diluir se encuentran en una concentración de 100nM.

La amplificación se realizó utilizando el programa de un ciclo a 95°C por 15 min, seguido del programa 94°C durante 1 min, una T_m específica para una de los juegos de oligonucleótidos por 1 min y 72°C por 1 min seguido de una extensión a 72°C/10 min. El número de ciclos y la T_m se fueron variando hasta encontrar las mejores condiciones para la PCR como lo indica la Tabla 6. La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut).

Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5%.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Gel Red (1X) a 90V durante 40 minutos. Se utilizó como marcador de pesos moleculares el Ready-Load 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, L.T.). Para visualizar los productos de amplificación se utilizó el transiluminador UVP BioLite utilizando el software LAUNCH VISIONWORKSLS.

10. Resultados.

Después de realizar varias pruebas con diferente T_m para cada PCR, las condiciones óptimas de cada una de ellas fueron las que se mencionan en la Tabla 6.

Tabla 6. T_m y ciclos óptimos obtenidos para cada uno de los programas de la técnica de PCR.

Virus	T_m	Ciclos
VPH	55°C	35
VHS-1	46.3°C	35
VVZ	46.3°C	35
VEB	57.4°C	38
CMV	46.3°C	38

VHS-1. Para la PCR de VHS-1 se esperaba un producto de amplificación de 150pb, durante el trabajo no fue posible incluir una muestra perteneciente a ADN de VHS-1 como control positivo, sin embargo, al correr las muestras encontramos que una de ellas presentaba una banda apenas perceptible que se acercaba a 150pb, se realizó la PCR incrementando la cantidad de ADN genómico (5, 10 y 20ng), el resultado se repitió y fue con 20ng que se pudo visualizar mejor, no fue posible repetirlo debido a la cantidad de ADN genómico disponible, pero esto nos hace sospechar de la positividad de esta muestra. (Figura 6)

Muestras de pacientes con Pterigión

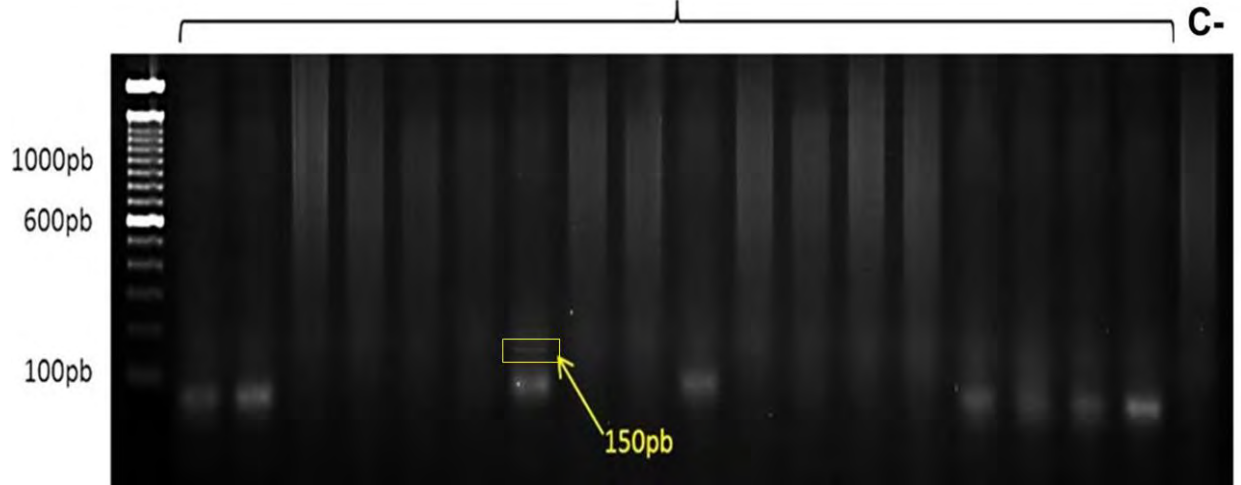


Figura 6. Gel de agarosa al 1.5% para detectar el producto de PCR para el VHS 1 (150pb). Se ve una tenue línea donde indica la flecha amarilla, que se cree que es una muestra positiva.

VVZ. Al realizar la PCR a diferentes condiciones para VVZ encontramos una cantidad de bandas de productos inespecíficos. (Figura 7)

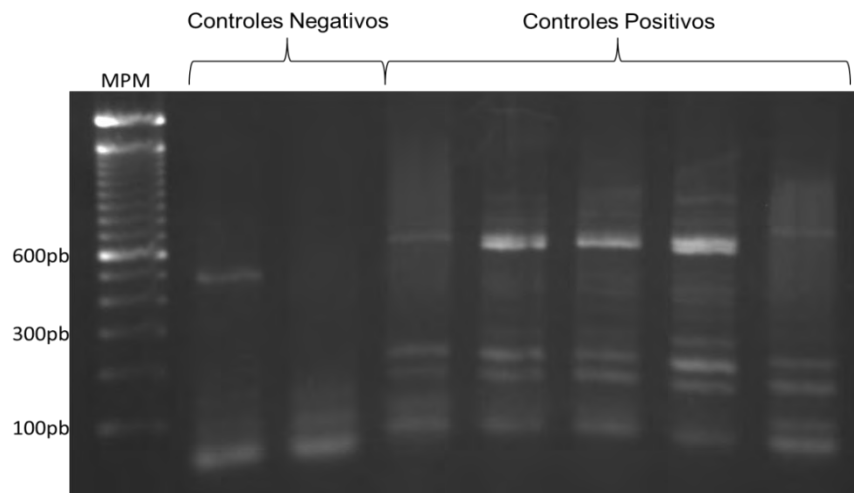


Figura 7. Gel de agarosa al 1.5% para detectar el producto de PCR de VVZ, utilizando diferentes condiciones, se observan diferentes bandas que corresponden a productos inespecíficos.

Se realizó un gradiente de temperatura cambiando la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos (T_m), se realizó una curva de DMSO y finalmente encontramos las condiciones adecuadas para esta determinación, se obtuvo un producto de PCR con el tamaño esperado que es de 110pb y con estas condiciones se realizó la PCR-VVZ. (Figura 8)

El resultado fue negativo para VVZ en las muestras de Pterigión.

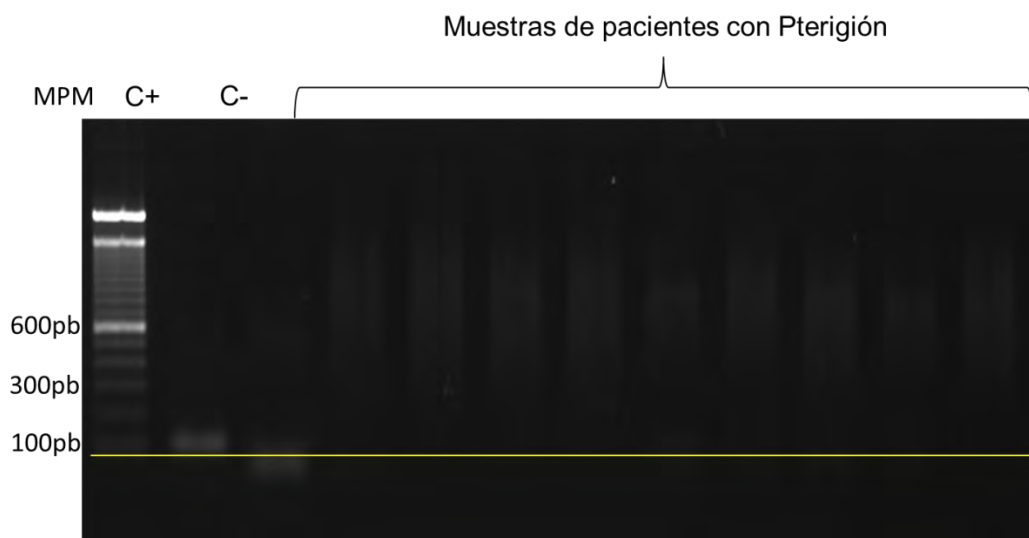


Figura 8. Gel de agarosa al 1.5% para detectar el producto de PCR para el VVZ (110pb). En el control negativo se aprecia una banda que se encuentra por debajo de las 100pb que corresponde a un producto inespecífico.

VEB. Con respecto al VEB, las mejores condiciones para la PCR nos permite obtener un producto de PCR mayor de 300pb, el producto esperado es de 326pb, en el control negativo se puede apreciar una banda muy tenue de casi 500pb que corresponden a un producto inespecífico. (Figura 9)

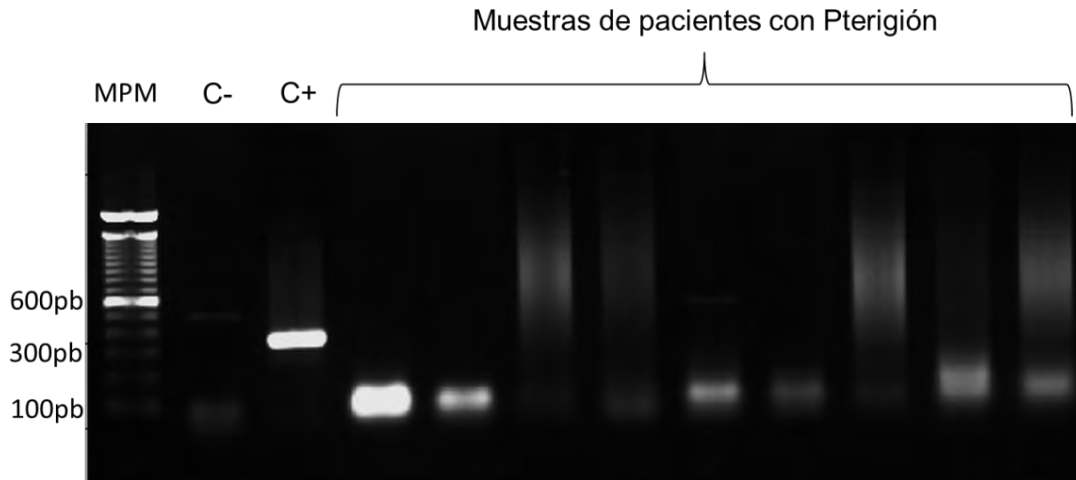


Figura 9. Gel de agarosa al 1.5% para detectar el producto de PCR para el Virus Epstein Barr (326pb). Las bandas localizadas en casi 500pb y menor de 100pb corresponden a productos inespecíficos.

Se realizó una repetición de la PCR para VEB, en aquellas muestras que resultaron positivas, para su comprobación (Figura 10). El resultado fue positivo para siete muestras en el Pterigión.

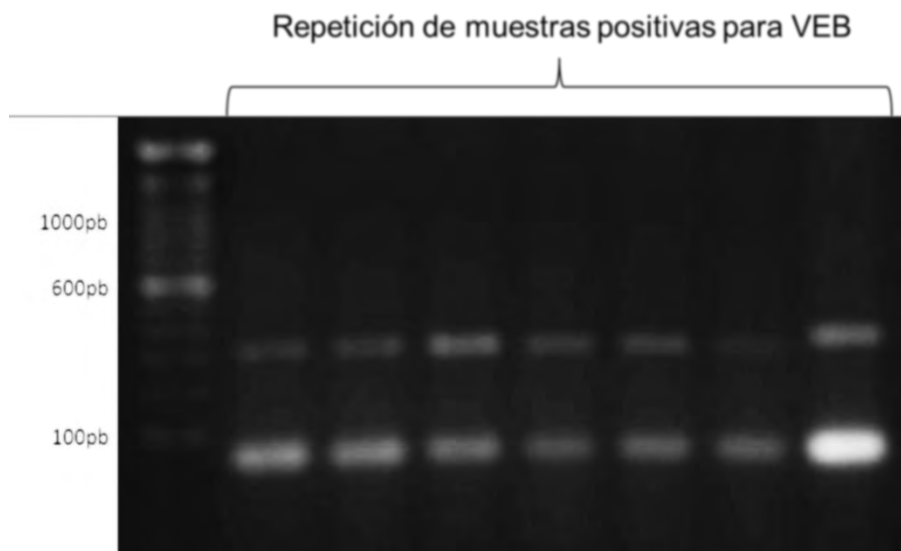


Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% para visualizar el producto de PCR para VEB de pacientes con Pterigión que resultaron positivos en un primer PCR.

VPH. Se realizó la PCR para VPH con las condiciones adecuadas, al realizar la electroforesis en gel de agarosa, se obtuvieron muestras positivas en las que la intensidad de la banda era muy baja, por lo que se procedió a realizar una segunda PCR aumentando la cantidad de ADN. (Figura 11)

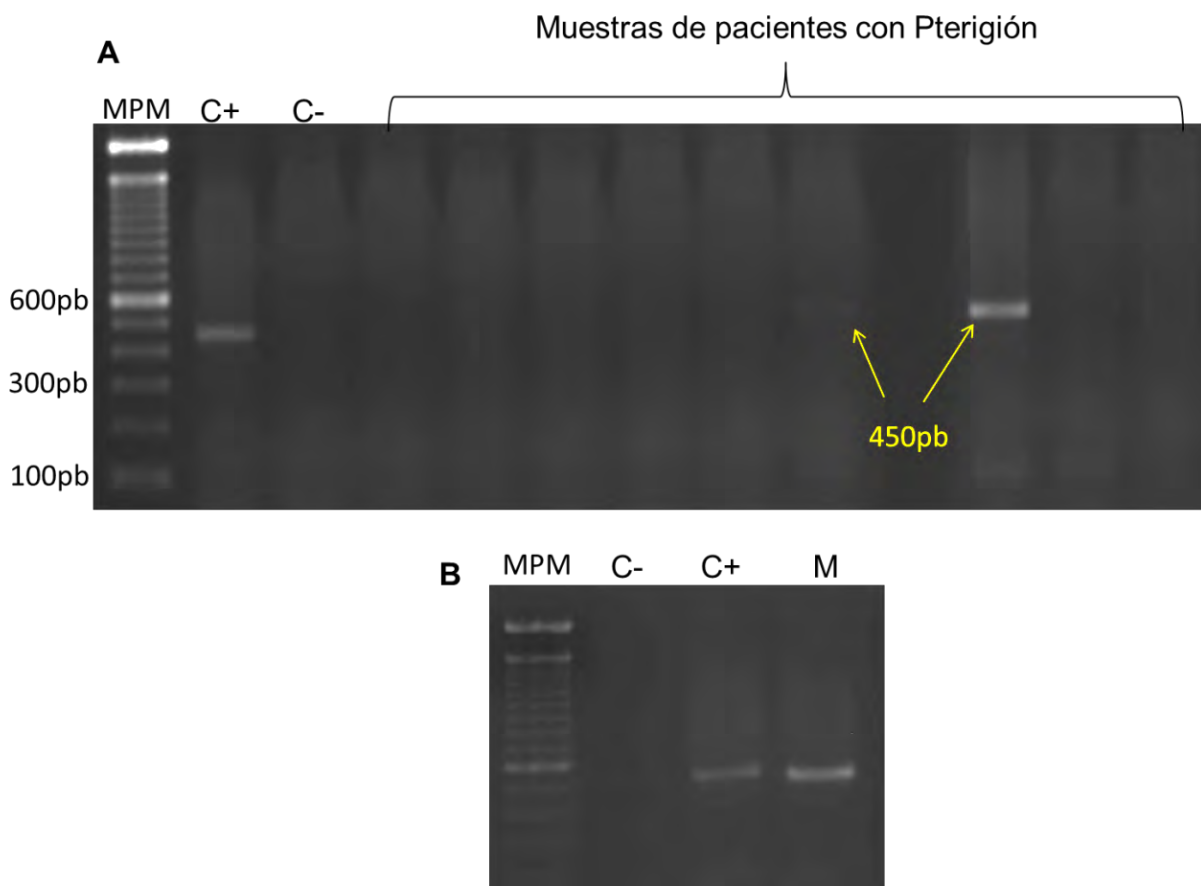


Figura 11. Gel de agarosa al 1.5% para detectar el producto de PCR para el VPH (450pb). En (A) Se observan dos bandas que pertenecen a muestra de pacientes, una de ellas apenas es perceptible, por lo que se procedió a repetir el análisis con una mayor concentración de ADN, el resultado se puede observar en (B).

CMV. Para la PCR de CMV se esperaba un producto de amplificación de 326pb. Las muestras se corrieron y en ninguna se encontró producto de amplificación después de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Sin embargo no se contó con un control positivo. Con estos resultados no podemos decir que tuvimos las condiciones adecuadas para la PCR puesto que es necesario contar con un control positivo, el cuál no fue posible conseguirlo (Figura 12)

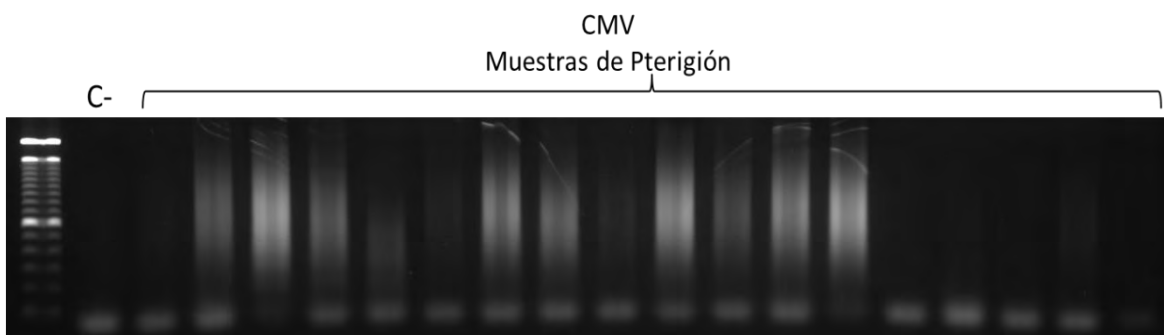


Figura 12. Gel de agarosa al 1.5% para detectar el producto de PCR para CMV. (326pb) Dentro de esta imagen no se contaba con un control positivo para el ADN de CMV.

En resumen, las muestras se agruparon en Pterigión primario y recurrente. En el grupo de Pterigión primario se sospecha de la presencia de VHS 1 en una muestra (9.1%), para el VEB se encontró resultado positivo en 7 muestras (63.6%), mientras que no se encontró presencia de VPH, VZV y CMV. En el grupo de Pterigión recurrente se encontró presencia de material genético de VPH en 2 muestras (18.2%) y también

se sospecha de una muestra positiva para VHS-1 (7.1%). Con respecto a los virus de VVZ, VEB y CMV, los resultados fueron negativos. Para las muestras de los sujetos control, los resultados fueron negativos excepto para VPH en las que se encontraron dos muestras positivas. (Tabla 7)

Tabla 7. Resultados obtenidos para la presencia de ADN-viral en Pterigión. Se analizaron 11 muestras de Pterigión primario y 14 de Pterigión recurrente.

Pterigión			
Virus	Primario	Recurrente	Controles
VPH	0% (0)	14.3% (2)	4% (2)
VHS-1	9.1% (1)*	7.1% (1)*	0% (0)
VVZ	0% (0)	0% (0)	0% (0)
VEB	63.6% (7)	0% (0)	0% (0)
CMV	0% (0)	0% (0)	0% (0)

(n) = número de muestras positivas

*Por confirmar

Al realizar la prueba exacta de Fisher de Chi Cuadrada para comparar los resultados del grupo de sujetos sanos con pacientes con Pterigión obtuvimos una diferencia estadísticamente significativa para VPH en Pterigión recurrente ($p= 0.0119$) y para VEB ($p= 0001$). (Figura 13)

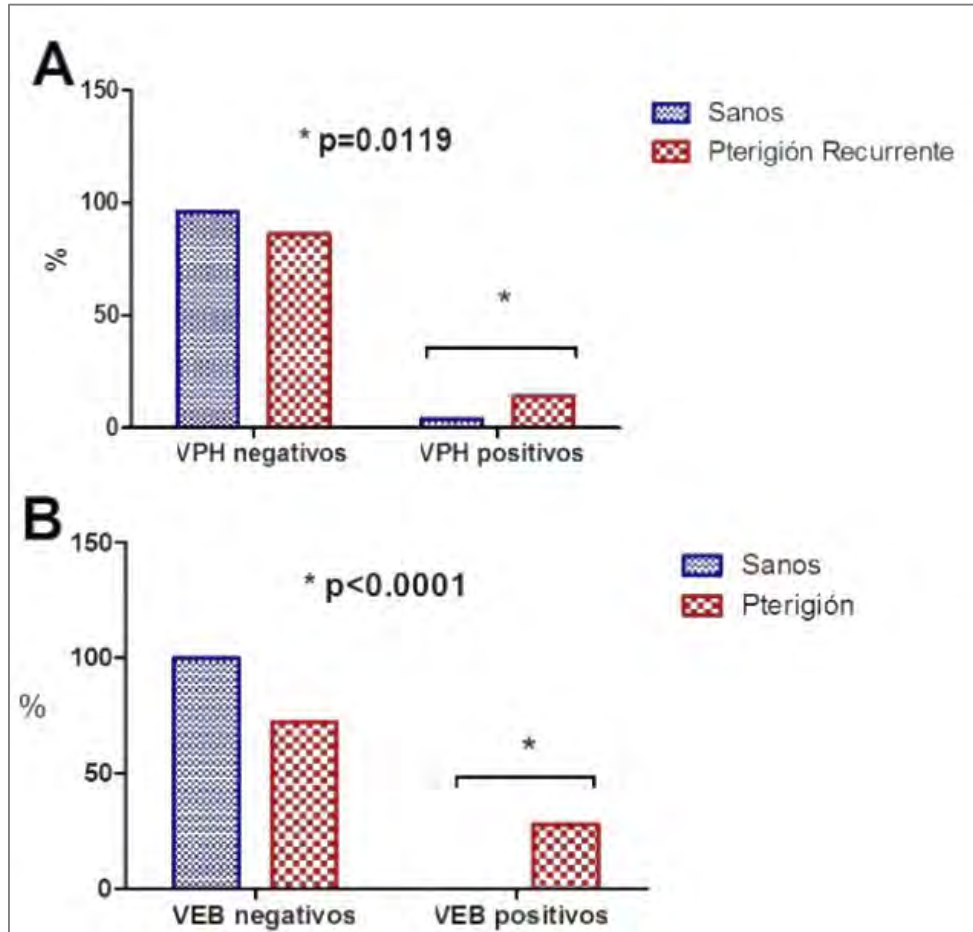


Figura 13. Comparación de resultados positivos y negativos entre pacientes y controles. Detección de VPH en Pterigión recurrente (A), detección de VEB en Pterigión total (B) (Se realizó prueba exacta de Fisher considerando un valor de significancia estadística de $p < 0.05$).

11. Discusión.

La etiopatogenia del Pterigión aún es desconocida, sin embargo, existen estudios en los que se reporta que las infecciones virales pueden estar implicadas en el desarrollo de esta enfermedad.³ Si las infecciones virales son parte de este proceso, tal como lo reporta Chalkia³ en su revisión, se debería tomar en cuenta para el tratamiento adecuado de la enfermedad y no solo en el Pterigión primario sino para evitar la recurrencia. Los reportes en la literatura sugieren que VPH es un virus asociado a Pterigión;^{36,37} sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el virus que podría estar relacionado con el desarrollo del Pterigión es el VEB. Para poder concluir esto, es necesario aumentar el número de muestra, para poder tener una estadística confiable. Durante el desarrollo del trabajo, otra limitante con respecto a los virus VHS-1 y CMV, es que no se contó con un control positivo para poder buscar las condiciones adecuadas para la PCR, porque a pesar de haber obtenido en una muestra una banda de peso molecular cercana al producto esperado para VHS-1, no es posible confirmar la presencia del ADN viral. La banda obtenida para VHS-1 fue apenas perceptible, aun repitiendo la PCR con una mayor concentración de ADN. Sospechamos la presencia de VHS-1 porque, además del producto de amplificación encontrado en este trabajo, en el 2001 Detorakis³⁷ reportó la presencia de VHS-1 en muestras de Pterigión primario. En ese reporte se observa bandas muy tenues con respecto al control positivo utilizado, lo que podría ser indicativo de que

la carga viral no es tan alta como para detectarlo fácilmente. En nuestro caso, algunas de las muestras podrían haber tenido ese problema.

Las infecciones virales juegan un papel importante en cualquier enfermedad y en el Pterigión, puede ser un factor detonante en el desarrollo de la enfermedad, por lo que, resulta de gran importancia el establecimiento de técnicas que permitan la detección viral. En este panel no fue posible incluir la detección de VHS-1 y CMV porque a pesar de haber obtenido una muestra presuntamente positiva para VHS-1, no contamos con ADN viral para utilizarlo como control positivo. Las muestras de los sujetos control fueron negativas para todas las determinaciones excepto VPH que se encontró en dos sujetos (4%). No existen reportes en la literatura que muestren la presencia de VPH en conjuntiva sana; sin embargo, existen otros estudios realizados en cavidad bucal en donde se reporta la presencia de VPH, en un estudio realizado en Yucatán en donde un 14% de mujeres sin enfermedad bucal tiene presencia de VPH (González-Losa³⁹). Nuestros resultados sugieren la presencia del virus en tejidos que desarrollado la enfermedad, pero tendrían que hacerse más estudios que determinen si esto constituye una causa ó un efecto. Además es importante captar un mayor número de pacientes con Pterigión para buscar esta asociación.

12. Conclusiones.

Se encontraron las condiciones adecuadas para realizar un panel viral utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa que nos permite detectar la presencia de ADN viral para VVZ, VPH y VEB en muestras de Pterigión, de tal forma que, es posible aplicar este panel viral en personas con diagnóstico de Pterigión primario y recurrente. Esto abre la posibilidad de aplicar estas técnicas para protocolos de investigación que busquen alternativas de tratamiento o prevención.

13. Referencias.

1. García-Carmona KP, Romero-Guadarrama MB., Rodríguez-Florida MA., Tenorio G. Correlación morfológica del Pterigión y su evolución clínica. *Rev Med Hosp General Mex.* 2006; 69(4):205-211.
2. De la Torre A, Toro L, Ximena-Nuñez M. Cirugía de Pterigio sin recurrencias. *Colomb Med.* 2004; 35(5):161-163.
3. Detorakis DT, Spandidos DA. Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic Pterygium: Trends and perspectives (review). *Int J Mol Med.* 2009; 29: 439-447.
4. Chalkia AK, Spandidos DA, Detorakis ET. Viral involvement in the pathogenesis and clinical features of ophthalmic pterygium (Review). *Int J Mol Med.* 2013; 32:539-543.
5. Rojas-Álvarez E. Aspectos básicos del Pterigion para médicos generales integrales (Trabajo de Revisión). *Rev Cubana Med G Integr.* 2009; 25(4):127-137.
6. Aragonés-Cruz B. Alemañy-Martorell J. Relación de la radiación ultravioleta y el Pterigión primario. *Rev Cubana Oftalmol.* 2009; 22(1); 1-9.
7. Ochoa-Tabares JC. Génesis del Pterigión. Una aproximación desde la biología molecular. *Rev Mex Oftalmol.* 2006; 80(6):318-324.

8. Chen T, Zhong Y, Ma J, Dong L, Ke L, Shan G. Prevalence and racial differences in Pterygium; A cross-sectional study in Han and Uygur adults in Xinjiang, China. *IOVS*. 2015; 56(2): 1109-1117.
9. Furuya-Kanamori L, Dulanto-Reinoso CM, Morroquín L, Stone JC, Dulanto-Reinoso VCh, Roca JA, Contreras F, Lee GA. Neoplasia de la superficie ocular en pacientes con Pterigión en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2014; 31(4):689-694.
10. Mohammed I. Treatment of pterygium. *Ann Afr Med*. 2011; 10:197-203.
11. Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis (Perspective). *Br J Ophthalmol*. 1993; 77:734-739.
12. Arias-Díaz A, Gómez-Cabrera C, Vigoa-Aranguren L, Bernal-Reyes N, Pons-Castro L. Comportamiento del Pterigion según la exposición a radiaciones ultravioletas y sus cambios histológicos de acuerdo con su severidad. *Rev Cubana Oftalmol*. 2009; 22(2): 51-58.
13. Detorakis DT, Drakonaki EE, Spandidos DA. Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium (Review). *Int J Mol Med*. 2000; 6: 35-41.
14. Kelishadi M, Moradi A, Javid N, Bazouri M, Tabarraei A, Kelishadi M. Human adenoviruses role in ophthalmic pterygium formation. *Jundishapur J Microbiol*. 2015; 8(4):1-4.

15. Tsai YY, Chang CC, Chou MC, Lee H, Chiang CC, Cheng TW, Yeh KT, Chen PL, Chang CH. HPV infection and p53 inactivation in pterygium. *Molecular vision*. 2009; 15:1092-1097.
16. Aguria P, Kitinya J, Ntuli S, Carmichel T. The role of heredity in pterygium development. *Int J Ophthalmol*. 2014; 27(3): 563-573.
17. Reyes-Bacardí K, Rabaina-Castellanos MS. Artículo de revisión “virus oncogénicos” *Revista Cubana Genet Comunit*. 2013; 7(2):4-11.
18. Renuto-Aguilar RE, Berumen-Campos J. Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatología Rev Mex*. 2009; 53(5): 234-242.
19. Ball E. Virus del Papiloma Humano. *Biología Molecular, Genética y Mecanismo Oncogénico. Parte I. Dermatología Venezolana*. 1998; 36(4): 136-141.
20. Vargas-Hernández VM. Virus del papiloma humano. Aspectos epidemiológicos, carcinogénicos, diagnósticos y terapéuticos. *Ginecol obstet Méx*. 1996; 64(9): 411-417.
21. Concha-Rogazy M. Diagnóstico y terapia del virus del papiloma humano. *Rev Chil Infect*. 2007; 24(3): 209-214.
22. Ponce-i-Sabastià. Cáncer de cérvix ¿Enfermedad oncológica o enfermedad infecciosa?. *Prog obstet ginecol*. 2001; 44: 285-323.

23. De Villiers EM, Bernand HU, Fauquet C, Broker TR, Hausen HZ. Classification of Papillomaviruses minireview. *Virology*. 2004; 324: 17-27.
24. De la Fuente-Villareal D, Guzmán-López S, Barboza-Quintana O, González-Ramírez RA. Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico, Artículo de revisión. *Medicina Universitaria*. 2010; 12(49): 231-238.
25. Lizano-Soberón M, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A, Infección por virus de papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis.
26. Ergazaki M, Xinarianos G, Gianniudis A, Markomichelakis N, Tsamparlakis J, Spandidos DA. Detection of HSV, CMV and EBV by the polymerase chain reaction technique in patients with inflammatory eye diseases. *Oncology Reports*. 1994; 1: 1207-1210.
27. Rivera-Z R, Delgado-D J, Painel-P V, Barrero-P R, Larraín-H A. Mecanismos de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil obstet ginecol*. 2006; 71(2): 135-140.
28. Piecyk-Sidor M, Zagórski Z, Zarnowski T, Polz-Dacewicz M. Occurrence of human papillomavirus in pterygia. *Acta Ophthalmol*. 2009; 87: 890-895.

29. Tamay de Dios L, Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad. 2013; 2: 70-78.
30. Pousa-Castro X, Bascones-Martínez A. Herpesvirus. Av Odontoestomatol. 2011; 27 (1) 11-24.
31. Sanchez-Navarro Palazuelos A, Suárez-Sánchez R, López-Revilla R, Cancino JC, Reyes-López MA. Detección del genoma y antígenos del Herpes Simplex Virus-1 en pacientes con queratitis herpética. Rev. Mex. Oftalmol. 2006; 80(1): 12-15.
32. Consultado el 14 de Julio de 2015 en la página <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/herpesvirus.pdf>
33. Mettenleiter TC, Muller F, Klupp BG, Granzow H. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. Cellular Microbiology. 2013; 15(2): 170-178.
34. Kukhanova MK, korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes implex virus: life cycle and development of inhibitors. Biochemistry. 2014; 79(13): 1635-1651.
35. Hong YJ, Park KU, Lim MS, Hwang SM, Song J, Kim TS, Kim ECh. Detection of herpes simplex and varicella-Zoster virus in clinical specimens by multiplex real-time PCR and melting curve analysis. Bio med Research Int. 2014: 1-5.

36. Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y. Detection of human papillomavirus in pterygium and conjunctival papilloma by hybrid capture II and PCR assays. *Eye*. 2008; 22: 1442-1445.
37. Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of Herpes Simplex Virus and Human Papilloma Virus in ophthalmic Pterygium. *Cornea*. 2001; 20(2): 164-167.
38. Otlu B, Emre S, Turkcuoglu P, Doganay S, Durmaz R. Investigation of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNAs in pterygium tissue. *Eur J Ophthalmol*. 2009; 19(2): 175-179.
39. Gonzalez-Losa MR, Herrera-Pech V, Conde-Ferrández L, Puerto-Solís M, Ayora-Talavera G, Soria-Barrera E. Epidemiology of oral HPV in the oral mucosa in women without signs of oral disease from Yucatan, Mexico. *Braz. J. Microbiol*. 2015; 46(1): 301-306.

14. Glosario.

Capsómero: Son las subunidades básicas de la cápside, una cubierta exterior de la proteína que protege el material genético de un virus.

Concatémeros: Molécula de ADN que contiene copias múltiples de una misma secuencia de nucleótidos dispuestas en serie, una tras otra, es decir, múltiples repeticiones en tándem.

Diplopia: Visión doble, la percepción de dos imágenes de un único objeto.

Epiesclera: Capa más externa de la esclerótica.

Inserción de genes transformantes virales: Incorporación del fragmento genómico de origen viral a la célula huésped, dando a lugar a las proteínas transformantes codificadas por los virus y que son la causa de la transformación cancerígena de la célula.

Línea de Strocker: Línea pigmentada ferrosa que se observa en la cabeza del Pterigión.

Mutación: Cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo, que produce una variación en las características de este y que pueda transmitirse a su descendencia.

Neoplasia: Formación anormal en alguna parte del cuerpo de un tejido nuevo de carácter tumoral, benigno o maligno.

Oncogénico: Que es capaz de producir un tumor, especialmente un tumor maligno

Recidiva ó recurrencia: Repetición de una enfermedad poco después de terminada la convalecencia.

Simbléfaron: Adhesión entre la conjuntiva bulbar y la del párpado en su cara interna que puede limitar la motilidad del globo ocular.

Transducción: Paso de ADN celular normal a un virus. Este virus al infectar a una segunda célula introduce este segmento de ADN y es transducido en el genoma de dicha célula, comportándose como un oncogén e induciendo la proliferación celular.

Tenon: Estructura que cubre la membrana más externa del ojo que es la esclerótica. Situada entre la esclerótica y la córnea que recubre toda la pared del ojo.

Tegumento: Revestimiento epitelial que cubre las superficies externas del organismo, separándolo y protegiéndolo del medio externo.

Virus oncogénico: Virus que poseen la propiedad de poder transformar la célula que infectan en una célula tumoral.

15. Anexo 1 Consentimiento informado.



FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA.
(CIB-HOL)



México, D. F., a ____ de _____ de 20 ____.

Consentimiento informado:

En la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz se lleva a cabo un estudio titulado **“DETECCIÓN DE ADN VIRAL EN PTERIGIÓN PRIMARIO Y RECIDIVANTE”** El cual se realiza en el Centro de Investigación Biomédica, este estudio está bajo responsabilidad del Dr. Héctor Javier Pérez Cano.

Se me ha informado que se requiere de una muestra tomada mediante raspado conjuntival del ojo afectado y/o muestra de tejido removido en el tratamiento por cirugía, esto no representa ningún riesgo para mi salud, y que los efectos adversos posibles, en el caso de raspado conjuntival, solo serán un ardor leve o sensación de cuerpo extraño, los cuales se quitarán al cabo de 5 minutos, y me será otorgada una muestra de lubricante para dichos síntomas. Se me ha explicado que el material genético obtenido de mi muestra se utilizará para fines de investigación y que, en caso de ser paciente del instituto, la toma de muestra **NO** modifica mi diagnóstico, mi tratamiento ni la atención recibida por parte del personal de la institución. También me ha sido señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en la investigación en el momento que yo lo desee y que todos los datos de mi expediente serán confidenciales y no se darán a terceros.

Es por eso que:

Yo _____ acepto participar en este estudio y autorizo que se obtenga una muestra de la conjuntiva de mis dos ojos.

Firma: _____ Teléfono _____

Responsable de toma de muestra: _____

Testigo: _____

Testigo: _____