



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TÉCNICAS MOLECULARES COMO MÉTODO DE
IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
CAVIDAD ORAL.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ESTEFANI USCANGA PÉREZ

TUTORA: Mtra. CLAUDIA PATRICIA MEJÍA VELÁZQUEZ

ASESORA: Esp. ROSA ISELA LUPERCIO LUNA



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.

Agradezco y dedico principalmente este trabajo al pilar de mi vida, **mi madre Felicitas Pérez Hernández** quien me ha brindado todo el amor, la confianza y el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y en especial en mi formación académica, ya que sin su esfuerzo este logro no hubiera sido posible.

A mi hermana, M. en C. Norma Angélica Pérez Hernández quién es mi cómplice y mejor amiga que siempre ha estado en cada paso que doy alentándome para ser mejor ser humano.

Agradezco a mi titular la Mtra. Claudia Patricia Mejía Velázquez por el apoyo y dedicación para la realización de este trabajo.

Así mismo agradezco a todas las personas que formaron parte de este recorrido; profesores, amigos, familiares, pacientes todos aquellos que me motivaron a seguir adelante y luchar por mi sueño.

Para concluir agradezco a la UNAM la máxima casa de estudios que me ha acogido; brindándome las mejores experiencias de vida así como el camino para formarme como profesional.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
PROPÓSITO	5
OBJETIVO	6
CAPÍTULO 1 GENERALIDADES DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.	7
1.1 DEFINICIÓN	7
1.2 ANTECEDENTES.....	7
1.3 ESTRUCTURA VIRAL	8
1.4 CLASIFICACIÓN	10
1.5 FISIOPATOLOGÍA.....	12
1.6 EPIDEMIOLOGÍA	14
1.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN CAVIDAD ORAL.....	15
1.8 OTRAS MANIFESTACIONES	22
1.9 DIAGNÓSTICO	24
1.9.1 BIOPSIA	24
1.9.2 CITOLOGÍA EXFOLIATIVA	26
1.9.3 INMUNOHISTOQUÍMICA	27
CAPÍTULO 2 TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECCIÓN DEL VPH.	32
2.1 HIBRIDACIÓN IN SITU (HIS).....	32
2.2 SOUTHERN BLOT (SB).....	34
2.3 CAPTURA DE HÍBRIDOS (HC2)	36
2.4 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA)	37
2.4.1 PCR TIEMPO REAL	43
2.5 TÉCNICA INNO LIPA.....	48
2.6 OTRAS TÉCNICAS	52
CAPÍTULO 3 USO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA INVESTIGACIÓN.	55
3.1 ASPECTO GENERAL	55
3.2 APECTO ODONTOLÓGICO	56
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es un agente infeccioso; pertenece a la familia Papilomaviridae que afecta principalmente a las células epiteliales de piel y mucosa por lo que causa múltiples lesiones hiperplásicas, verrucosas y papilomatosas. También se asocia a lesiones neoplásicas, debido a que la región E6 y E7 de algunos tipos de virus que desactivan a las proteínas p53 y pRB que son las encargadas de verificar que no exista ningún tipo de alteración en el ciclo celular. Por lo tanto la presencia de VPH es un factor importante para el desarrollo de cáncer cervicouterino y de cavidad oral.

Actualmente se han identificado más de 240 tipos de virus, siendo los tipos 16, 18, 31, 33 y 35 los de alto riesgo oncogénico. Se ha identificado que los tipos 6 y 11 se encuentran principalmente en cavidad oral, los denominados 13 y 32 son exclusivos de esta zona.

Este virus (VPH) se transmite por contacto directo, las principales formas de contagio son: perinatal, transplacentaria, líquido amniótico, sangre, autoinoculación y la más frecuente es por medio de relaciones sexuales.

Dada la relación etiológica entre el virus y el cáncer cervicouterino se han llevado a cabo múltiples estudios en el desarrollo de técnicas para el diagnóstico oportuno de esta enfermedad; sin embargo, no sucede lo mismo para el área de la Odontología. Existe poca información de las técnicas de diagnóstico para las lesiones en cavidad oral y mucosa sana.

El virus de papiloma humano se ha asociado a cáncer oral y a pesar de ello, sigue siendo un tema poco investigado en el área odontológica

Este trabajo aborda las características generales del virus, las manifestaciones orales propias de la enfermedad así como las principales técnicas de diagnóstico para la detección del virus del papiloma humano en cavidad oral.

PROPÓSITO

El propósito de esta investigación es que el cirujano dentista conozca los diferentes estudios de laboratorio que se emplean actualmente en el diagnóstico del virus de papiloma humano en cavidad oral.

Poder elegir dentro de los descritos el que brinde mayor especificidad y sensibilidad a las muestras o bien utilizar varias de las técnicas para obtener un diagnóstico más preciso y así ofrecer al paciente el tratamiento adecuado dependiendo del tipo de virus que padezca.

OBJETIVO

Describir las principales técnicas moleculares para el diagnóstico del Virus del Papiloma Humano en cavidad oral.

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.

1.1 DEFINICIÓN

Los virus del papiloma humano (VPH), son pequeños agentes infecciosos con genoma de ADN que necesitan una célula hospedera para reproducirse y multiplicarse.^{1, 2} Produciendo así una infección vírica, crónica y con transformaciones papilares en el tejido de piel o mucosas.^{3,4}

1.2 ANTECEDENTES

Se dice que el VPH ha estado presente desde la evolución del hombre ya que las verrugas genitales y el cáncer cervical se han descrito desde la antigüedad. A continuación se enlistan algunos de los hechos más sobresalientes del hombre y su relación con el VPH. (Tabla 1)

Época	Evidencias	Autor
460-377 a. C.	Se describe la transmisión sexual de condilomas.	Hipócrates
1842	Mayor incidencia de neoplasias en prostitutas que en monjas.	Rigiioni-Stern
1892	Sospecha de la existencia de virus	Iwanowski
1898	Introducción del término virus	Beijerink
1907	Se descubre la naturaleza infecciosa de las verrugas	Ciuffo
1933	Primer virus Shope <i>pillomavirus</i> asociado a verrugas.	RicharShope

1949	Primer cultivo de un virus	Enders
1962	Se descubre a la familia de virus Papovaviridae	Nomenclatura
1974	Primera hibridación del VPH	ZurHausen
1980	Se descubre el VPH en condilomas y en verrugas	Gissmann
1981	Se logra la clonación y caracterización del VPH	De Villers
1983	Se descubre la secuenciación del VPH	Schwarz
1987	Se comprueba la transformación celular del VPH	Piris
1999	Se clasifica en una nueva familia debido a sus características. Papilomaviridae.	Nomenclatura
1995	Se descubre la relación del VPH con el cáncer	Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer. (IARC)

Tabla 1. Historia del Virus del Papiloma Humano.^{5, 6, 7, 8}

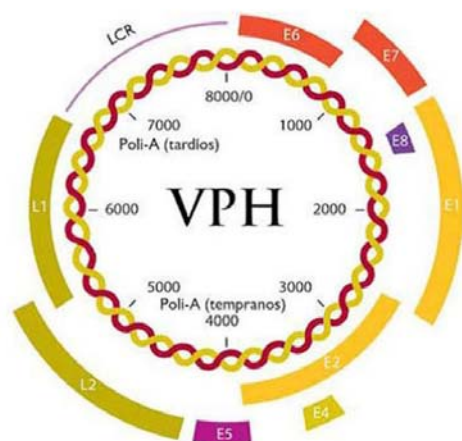
1.3 ESTRUCTURA VIRAL

Contienen una cubierta icosaédrica que les permite sobrevivir en el ambiente por largos periodos de tiempo inertes en el medio extracelular; tiene una cápside que presenta un tamaño aproximado de 50 nm de diámetro; formada por dos proteínas estructurales que forman 72 capsómeros. Su única molécula de ADN de doble cadena dispuesta de forma circular, contiene aproximadamente 8,000 pares bases, estimula la síntesis de ácido desoxirribonucleico y se replica lentamente dentro del núcleo; además posee un marcado epiteliotropismo, es decir, preferencia

por las mucosas y la piel, por lo general penetran en la capa basal de estos tejidos.^{9, 10, 11, 12}

El genoma del VPH está dividido en tres partes:

- Región temprana (E): Segmento largo de proteínas que contiene el 45% del genoma, codifica los genes E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 para la replicación viral y la transformación de la célula huésped. Los segmentos E1 y E2 dirigen la multiplicación de los virus dentro de la célula. Participa en la diferenciación de queratinocitos. El segmento E4 daña las proteínas que se encuentran en el citoplasma, produciendo cambios en la traducción celular. La función de E5 se ha relacionado con los receptores de factores de crecimiento celular además tiene la capacidad de evadir al sistema inmune. Las proteínas más estudiadas son E6 y E7 ya que están codificadas para tipos oncogénicos de VPH que afectan al ciclo celular mediante unión y desactivación de genes p53 y pRB supresores de tumores.
- Región tardía (L): Comprende alrededor del 40%; se encuentran genes virales que forman proteínas para la cápside L1 y L2. L1 es la proteína más grande y se conserva en los papilomas de distintas especies. L2 es la de menor tamaño y contrariamente muestra marcadas diferencias en la secuencia nucleotídica, inclusive entre los tipos que infectan a una misma especie.
- Región de control largo (LCR): Representa el 15% del genoma, regula la replicación viral y la expresión genética del virus a expensas de las funciones celulares. Dependiendo de la composición de estos segmentos, se identifican varios tipos de VPH con diferentes características patógenas.^{5, 8, 12, 13} (Fig. 1)



Región Temprana (E)	E1 y E2	Control, replicación y transcripción
	E6 y E7	Obstaculizan el control de transcripción celular (p53) y ciclo celular (pRb)
	E3, E5 y E4	Control, transcripción de genes tempranos
Región Media (L)	L1	Proteína estructural de la cápside (conservada)
	L2	Selecciona el ADN viral y lo ubica dentro de la cápside
Región de control (LCR)	Secuencias que promueven o reprimen la expresión o replicación viral	

Figura 1. Organización del genoma.¹⁴

1.4 CLASIFICACIÓN

Actualmente se han identificado más de 240 tipos de virus, de los cuales solo a 100 se les conoce secuencia genómica completa. Se habla de tipos y no de serotipos ya que la clasificación de estos se basa en la secuencia del gen estructural L2; cuando se tiene una diferencia más del 50% en esta estructura se dice que es un nuevo tipo.^{6, 9,13}

Se han clasificado en 16 géneros y dentro de ellos solo cinco infectan al ser humano (Alpha-papilomavirus, Beta-papilomavirus, Gamma-papilomavirus, Mupa-papilomavirus y Nupa-papilomavirus).^{2,9,15}

El género Alpha incluye el mayor número de tipos que infectan piel y el tracto anogenital. El Beta incluye pacientes inmunodeprimidos o que padecen Epidermodisplasia verruciformis y los demás géneros causan verrugas cutáneas.

Clínicamente se ha clasificado en función del tipo de tejido que infecta

- Cutáneos
- Mucosos

Finalmente los genotipos son clasificados como alto riesgo y bajo riesgo según su potencial de malignidad.^{3, 6, 7, 8} (Tabla 2)

Localización	Lesiones asociadas	Tipo de cáncer asociado	Tipos virales
Piel	Verruga		1,2,3,4,7,10,28,41,48,60,63,65
	Epidermodisplasia Verruciforme		3,5,8,12,14,15,17,19,25,36,37,38,46,47,49,50
		Cáncer escamoso	5,8,14,17,20,47
Tracto anogenital	Condiloma Acuminado		6,11,40,42,43,44,54,55,61,70,72,81.
	<ul style="list-style-type: none"> Bajo grado (LSIL)* 		6,11,16,18,31,32,33,35,39,40,42,43,44,45,51,52,53,54,55,56,58,59,61,66,68,70,72,73,81,82.
	<ul style="list-style-type: none"> Alto riesgo (HSIL)** 		16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,82
		Carcinoma escamoso	16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,82
		Adenocarcinoma	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58
Conjuntiva			6,11
Cavidad oral	Verrugas orales		2,5,4,7,6,40
	Papiloma oral		6,11
	Condiloma		6,11,42

	acuminado		
	Hiperplasia multifocal		11,12,16,32
	Leucoplasia Oral		16,18
		Carcinoma oral	16, 18
Amígdala		Carcinoma escamoso	16, 33
Laringe	Papiloma		6,11,16,18

Tabla 2. Tipos de VPH presentes en diferentes lesiones. (*)LSIL: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. / (**) HSIL: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. En negrita se describen los tipos más frecuentes. ⁶

1.5 FISIOPATOLOGÍA

El VPH inicia su ciclo reproductivo infectando a las células poco diferenciadas de la capa basal del epitelio; ingresando a ellas a través de microheridas o microabrasiones.

La interacción del virus y la célula comienza cuando la proteína viral L1 se une al receptor $\alpha 6/\beta$ o $\alpha 6/\beta 4$. Una vez que el virus interactúa con su receptor de forma específica, se inicia el proceso de endocitosis, con la formación de pequeñas vesículas que pueden estar cubiertas de una proteína denominada clatrina (VPH 16 y 68) o caveolina (VPH 31).

La penetración exitosa del virus a la célula requiere que el virus cruce la membrana plasmática y la membrana nuclear para poder replicarse, sin embargo, se desconoce este mecanismo así como el que remueve la cápside viral y el ingreso al núcleo celular.

En la fase temprana de la infección, cuando el genoma viral llega al núcleo celular, los primeros genes que se expresan son E1 Y E2. Específicamente cuando la proteína E2 se expresa, activa la expresión de

los oncogenes E6 y E7. El genoma viral se replica en sincronía con el genoma celular.

Posteriormente en las células del estrato basal se incrementa la proteína E2 en una tasa moderada de copias; se dice que entre 50 y 400 copias por célula que pueden permanecer constante por muchas generaciones de células. A esta fase se le conoce como “mantenimiento plasmídico” Este tipo de replicación asegura una infección persistente en las células basales de la epidermis.

Posterior a la fase de mantenimiento algunas células infectadas migran a los estratos suprabasales y el VPH induce a éstas a un arresto en la fase S del ciclo celular, para permitir la replicación de su genoma.

En el estrato espinoso inicia la expresión de los genes E4 y E5, que participan en la liberación del virión; cuando estas células alcanzan el estrato granuloso se presentan células vacuoladas o “Coilocitos” que expresan abundantemente a la proteína E1 y E2 para mantener una tasa alta de la replicación del genoma viral, así mismo, se expresan los genes tardíos que codifican para las proteínas de la cápside.

En los coilocitos se lleva a cabo el ensamblaje de los viriones y cuando llegan al estrato córneo, por descamación se desprenden y se liberan los viriones con participación de la proteína E4.

La infección productiva se manifiesta morfológicamente con la aparición de signos citopáticos característicos (coilocitos, hiperplasia, acantosis, disqueratosis) y clínicamente con el desarrollo de lesiones proliferativas.^{6,7} (Fig. 2)

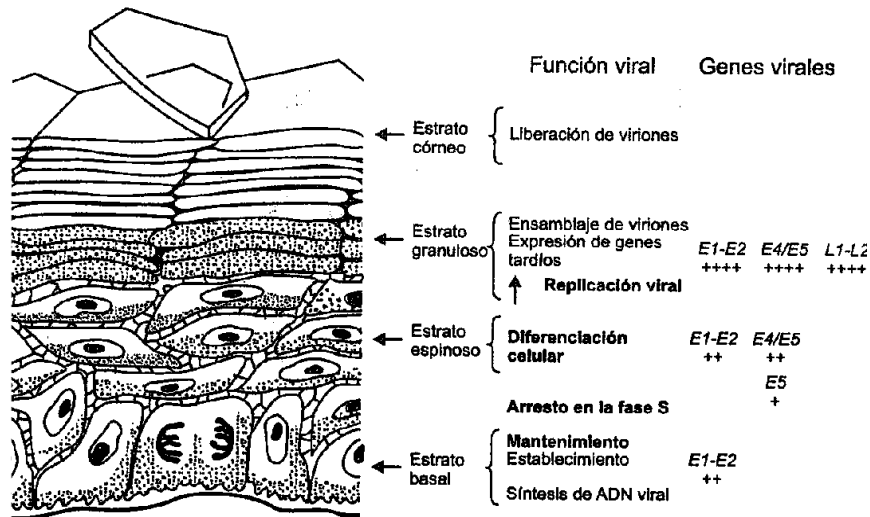


Figura 2. Ciclo de replicación del virus del VPH. ⁶

1.6 EPIDEMIOLOGÍA

Asimismo, la infección por VPH es una de las enfermedades virales más difundidas en la población mundial, ya que se transmite principalmente por contacto sexual por lo que actualmente es reconocida como “la principal infección de transmisión sexual”.^{10, 11}

Según algunos estudios, las personas pueden adquirir el virus por diversas vías entre las cuales figuran:

- Periodo perinatal por infección transplacentaria
- Líquido amniótico
- Sangre
- Auto-inoculación

Se sugiere que las infecciones orales por algunos tipos de VPH se transmiten por práctica sexual orogenital. En estudios experimentales se ha observado que el periodo de latencia tras el contagio es de 2 a 9 meses.^{9,16}

Dado que el VPH es el principal factor etiológico para el desarrollo de cáncer cervical y éste a su vez es la primer causa de muerte por cáncer en mujeres en la población mexicana se han llevado a cabo numerosas

investigaciones en el área, sin embargo, no pasa lo mismo en estomatología, pese a que los estudios previos muestran que el VPH se asocia a un 35% de los casos de cáncer oral de los cuales 70% de ellos son de alto riesgo, no se han realizado estudios necesarios.

En México, se tiene estimado que cerca del 43% de los hombres y del 17% de las mujeres, todos ellos sanos sexualmente activos tienen alguna infección por VPH. Se ha demostrado que el virus que infecta el área genital puede también infectar la cavidad oral (Sánchez-Vargas *et. al.* 2010).^{5,9}

1.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN CAVIDAD ORAL

Las lesiones producidas por este tipo de virus se pueden clasificar en dos grupos: benignas (papiloma bucal, verruga vulgar, condiloma acuminado, hiperplasia epitelial multifocal) y malignas (leucoplasia ideopática, carcinoma orofaríngeo).⁹

Las cuales se describen a continuación:

- Papiloma oral: lesión benigna que puede aparecer a cualquier edad sin diferencia de sexos. Se manifiesta clínicamente como un crecimiento rugoso parecido a una coliflor no suele pasar un centímetro de tamaño, su color depende del grado de queratinización puede ir de blanco a gris, son solitarias e indoloras. Su contagio es directo y los subtipos que se asocian son 6 y 11.^{9,17}



Figura 3. Papiloma oral en el margen lateral de la lengua. ⁹

Histológicamente el papiloma bucal se caracteriza por proyecciones delgadas en formas de dedos con una porción central fibrovascular cubierta por hiperqueratosis y un epitelio escamoso acantótico. El hecho que las células coilocíticas no son relativamente comunes lo distingue de las verrugas cutáneas.¹⁸ (Fig. 3)

- Verruga vulgar: lesión benigna con estructura vellosa, de consistencia firme, crece rápidamente hasta alcanzar un tamaño máximo de 5 a 6 mm, coloración de blanco a rosa, generalmente puede aparecer de forma solitaria o múltiple. Frecuentemente en lengua, paladar duro, paladar blando, labio y bermellón. Es más común en niños y adolescentes. El contagio es directo aunque se sugiere por autoinoculación, ya que por lo general se presenta en personas con verrugas en manos y dedos. Clínicamente son muy parecidos al papiloma. Se asocia con los subtipos de VPH 2, 4, 6, 40 y 57.^{9,17}

Histopatológicamente se caracteriza por una superficie papilomatosa con hiperqueratinización y acantosis. La capa granulosa es frecuentemente prominente entre las elevaciones papilomatosas, las cuales se forman alrededor de la papila de tejido conectivo. Los clavos epiteliales centrales son alargados y los laterales en la base de la lesión son convergentes.

Se observa la presencia de células coilocíticas, situadas en la capa superior de la capa espinosa y en la capa granulosa. Como en la verruga vulgar de la piel, la verruga vulgar oral está relacionada con los VPH. Los tipos de VPH relacionados con la mucosa (VPH 6, 11, 16) y los tipos de VPH cutáneos (VPH 1, 2, 4 y 7) han sido reportados en las lesiones de verruga vulgar oral. En los últimos

años, el VPH 2 y 4 (frecuentemente asociados a la verruga vulgar cutánea) han sido detectados en más del 55% de las lesiones bucales.¹⁸ (Fig. 4)

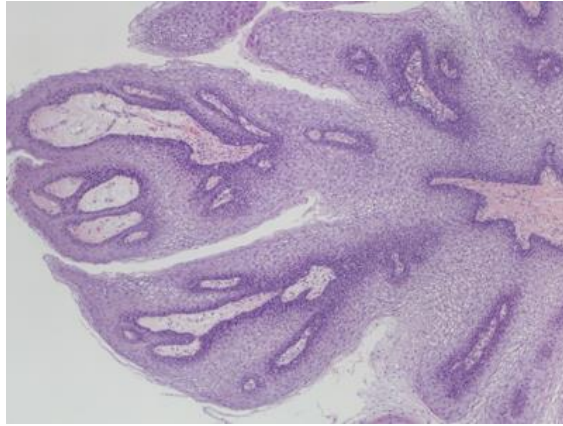


Figura 4. Tinción con hematoxilina-eosina del papiloma lingual. Se aprecian proyecciones papilares de un tallo fibrovascular.¹⁹

- Condiloma acuminado: aparece inicialmente como una agrupación de nódulos simples, de color rosado a marrón, que posteriormente crecen, desarrollan una masa papilar exofítica, blanda y sésil, parecida a una coliflor, su tamaño puede variar, su forma de contagio es por relaciones sexuales orogenitales o por autoinoculación, se presentan en mucosa oral y está inducido por los subtipos de VPH 6,11 y 42.^{4,9,17} (Fig. 5)



Figura 5. Condiloma en superficie ventral de la lengua.⁹

Histológicamente las lesiones se caracterizan por la presencia de un epitelio escamoso estratificado, presentando una marcada acantosis, escasa paraqueratosis con clavos epiteliales gruesos y elongados. Las células coilocíticas son comunes en la capa superior (córnea) e intermedia (espinosa) del epitelio.¹⁸ (Fig. 6)

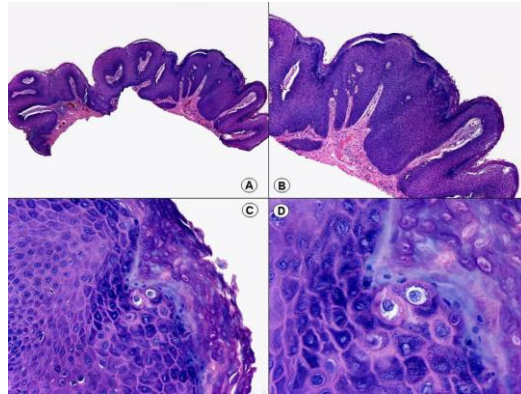


Figura 6. Condiloma acuminado que muestra un epitelio más basófilo que el de otras verrugas vulgares y escasos coilocitos. (Hematoxilina-eosina, A x10, B x40, C x200, D x400).²⁰

- Hiperplasia multifocal: también llamada enfermedad de Heck, es una patología benigna asintomática. Aparece como pápulas bien definidas, de un tamaño aproximado de 5mm en el labio inferior mayormente, aunque pueden afectar labios, margen lateral de la lengua así como otras partes de la mucosa. Su crecimiento es lento y lo padecen principalmente niños de ambos sexos. El subtipo que se asocia de VPH es el 12 y 32. Aunque estudios han demostrado que existe presencia de 11 y 16.^{9, 21} (Fig. 7)



Figura 7. Lesiones de Hiperplasia epitelial multifocal en la mucosa del labio inferior.⁹

Histológicamente se caracteriza por hiperplasia epitelial con moderada hiperparaqueratosis, acantosis, elongación y anastomosis de los clavos epiteliales, los cambios citológicos incluyen células epiteliales mostrando degeneración nuclear, células vacuoladas con núcleo picnótico y células mostrando degeneración en forma de globo. La coilocitosis, la cual es comúnmente relacionada como el efecto citopático del VPH, está constantemente presente en estas lesiones. Las partículas virales y los antígenos de VPH han sido reportados en pacientes con HEF, sugiriendo una etiología viral.¹⁸ (Fig. 8)

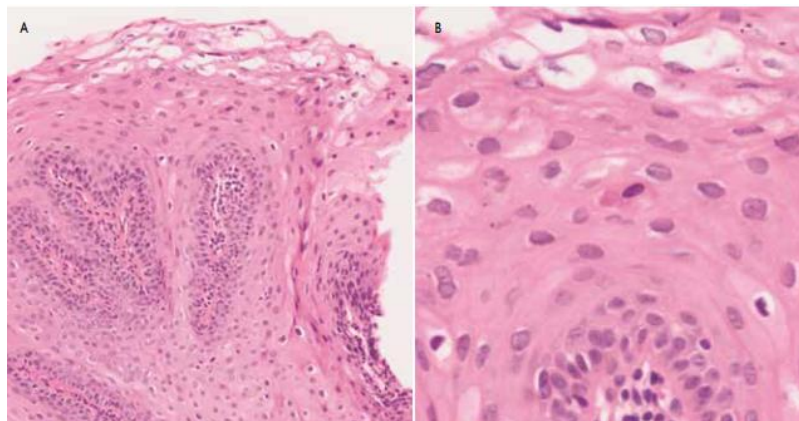


Figura 8. A) Hiperplasia epitelial, paraqueratosis, acantosis. Hematoxilina-eosina 100X. B) Coilocitos y células mitosoides.²²

- Leucoplasia oral: se caracteriza por ser una lesión blanca, firme en la mucosa oral, su tamaño puede variar milímetros hasta algunos centímetros, no puede desprenderse por el raspado. Clínicamente tiene dos modalidades de presentación, la forma homogénea y la forma no homogénea. La prevalencia oscila en un 0.5% a 3.46% y se establece que una leucoplasia se maligniza en un 0.7% a 2.9%. Las localizaciones más habituales en la cavidad oral son paladar duro, paladar blando y piso de boca. Los subtipos de VPH asociados a la leucoplasia son el 16 y 18.⁹ (Fig. 9)



Figura 9. Extensa lesión blanca, de superficie verrucosa, que no se desprende al raspado que compromete el borde y vientre de la lengua y piso de boca. ²³

Los cambios histopatológicos de las leucoplasias son muy diversos, pudiendo variar desde una hiperqueratosis sin displasia hasta diversos grados de displasia epitelial. El rasgo histopatológico más constante está dado por la presencia de hiperqueratosis. Ésta puede ser una ortoqueratosis o una paraqueratosis o incluso estar presente ambas formas de queratinización. En la mayoría de los casos se acompaña de una hiperplasia epitelial debida a un aumento en espesor del estrato espinoso (acantosis) y es frecuente la papilomatosis.

La displasia epitelial (literalmente: crecimiento anormal) representa una combinación de las alteraciones celulares individuales (atipias) y de la estructuración normal del epitelio observadas en la transición gradual hacia la malignidad (pre malignidad). Entre las alteraciones celulares estarían las siguientes: aumento del tamaño de los nucléolos; hiper cromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear, aumento de la relación núcleo/citoplasma, aumento de la actividad mitótica, figuras mitóticas anormales y pleomorfismo celular. Los signos displásicos en relación a una desestructuración del epitelio serían: crestas epiteliales en forma de gota, hiperplasia del estrato basal hiper celularidad y un patrón alterado en la maduración de los queratinocitos (estratificación epitelial anormal, presencia de

mitosis en estratos superficiales, pérdida de adhesión intercelular, queratinización de células del estrato espinoso, etc.).²⁴ (Fig. 10)

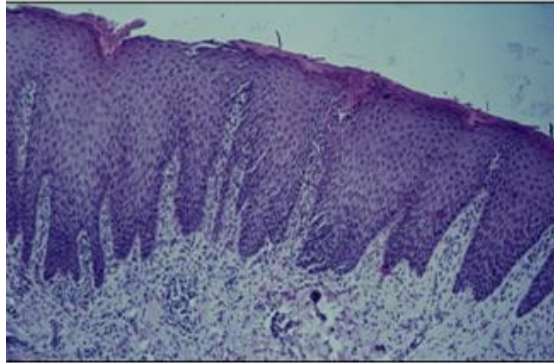


Figura 10. Histología de una lesión de leucoplasia. Obsérvese la hiperplasia epitelial con hiperqueratosis.²⁵

- Cáncer orofaríngeo: se estima que tiene una incidencia de 30 nuevos casos cada 100,000 habitantes por año. A nivel mundial se suponen 400,000 nuevos casos por año. Representa el 2% al 3% del total de los carcinomas del ser humano. Hasta 60% de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas (estadios III y IV). Según sexos, es más frecuente en hombres, representando del 66% al 95%.

Según la bibliografía internacional se distribuye aproximadamente así: cavidad oral 44%, laringe 31%, faringe 25%.

Aunque siguen siendo la exposición al tabaco y el alcohol las principales causas del cáncer orofaríngeo se ha encontrado el virus del papiloma humano asociado en la etiología del 20 al 25%.²⁶

Los subtipos de VPH 16 y 18 se encuentran en un 80% de los cánceres, mientras que los subtipos 31, 33 y 35 son menos frecuentes encontrándose solo un 3%.⁹ (Fig. 11)



Figura 11. Paciente con cáncer de células escamosas en la parte lateral de la lengua.²⁷

1.8 OTRAS MANIFESTACIONES

- Lesiones de manos y pies: la mayoría de las personas con una infección por el VPH presenta los tipos habituales del virus (VPH-1 a VPH-4), los cuales infectan las manos y los pies. La aparición de verrugas de morfología abovedada, plana o plantar dependen del tipo de VPH y el punto infectado. (Fig. 12)



Figura 12. Verrugas vulgares múltiples.⁴

- Papilomas laríngeos: también llamados papilomatosis respiratoria recurrente, son producidos por VPH-6 y VPH-11, son raros pero algunas veces obstruyen la laringe y deben ser extirpados en repetidas ocasiones. Esta infección se adquiere al atravesar el canal del parto en una mujer con verrugas genitales; por lo que son más frecuentes en niños. (Fig. 13)

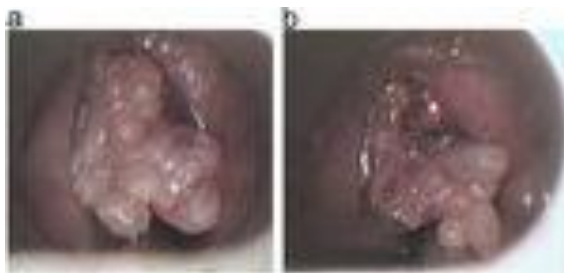


Figura 13. Papiloma laríngeo. ²⁸

- Lesiones anogenitales: aparecen casi exclusivamente en el epitelio de los genitales externos y la región perianal. Suele ser asintomática aunque a veces puede producir ligero prurito. Las verrugas genitales son blandas, del color de la piel, elevadas o planas y en ocasiones semejante a una coliflor. Alrededor del 90% de los casos se debe a una infección por VPH-6 Y VPH-11. Las lesiones anogenitales infectadas por estos tipos víricos pueden ser problemáticas pero rara vez malignizan.
- Lesiones cervicouterinas: se dividen por los subtipos de virus que las afectan, considerándose de bajo grado y alto grado. Llegando así al cáncer cervicouterino asociado a los subtipos VPH-16 y VPH-18. Estas lesiones solo se pueden apreciar a nivel celular gracias a la citología cervicovaginal que se realiza.^{3,6}
- Cáncer cervicouterino: es un tumor que en sus etapas tempranas generalmente cursa de forma asintomática, de hecho muchas de las lesiones solo se detectan cuando la mujer se somete a un examen pélvico o una prueba de Papanicolau. Los síntomas generalmente aparecen hasta que la lesión se vuelve cancerosa e invade el tejido cercano. Cuando esto sucede los síntomas más frecuentes son dolor pélvico y sangrado anormal, que puede comenzar y detenerse entre periodos menstruales regulares o después de relaciones sexuales. El sangrado después de la

menopausia o bien la secreción vaginal pueden ser síntomas de cáncer cervical. Los tipos de VPH asociados son el 16 y 18.⁷

1.9 DIAGNÓSTICO

Se ha detectado VPH en el 50% de los casos de carcinoma bucal así como en lesiones benignas de la mucosa bucal, donde se encontró VPH de bajo y alto riesgo oncogénico. Los hallazgos señalan que en muestras de mucosa bucal sana existe entre el 13 y el 40% de algún tipo de virus obtenido por biopsias, citología exfoliativa o por enjuague bucal.

Por lo que actualmente se sugiere que el 70% de la población sexualmente activa tiene al menos un tipo de virus. Asimismo, la persistencia de la infección, lesiones bucales y/o hábitos que puedan afectar la mucosa podrían potenciar cambios celulares en lesiones clínicamente benignas con transformación a premalignas y/o malignas.

A pesar de la importancia del diagnóstico precoz, existe poca información respecto a la prevalencia de VPH en la mucosa oral clínicamente sana.²⁹

Los métodos de diagnóstico más recurrentes que se realizan cuando se hallan este tipo de lesiones son las siguientes:

1.9.1 BIOPSIA

El término “biopsia” deriva del griego *bios*-vida y de *opsis*-vista o visión. La palabra fue introducida por Ernest Besnier (1831-1090), dermatólogo francés, para designar el examen de un tejido u órgano, mediante la toma de una muestra del mismo, en vida del sujeto. La biopsia consiste en la obtención de un fragmento de tejido vivo para su estudio tanto macro como microscópico. Es un procedimiento quirúrgico que se realiza para establecer el diagnóstico definitivo, conocer la evolución del proceso, el resultado de la terapéutica y fundamentar el pronóstico. ^{30, 31, 32}

Existen varias técnicas para realizar una biopsia, a continuación de presentan las de uso frecuente para las lesiones por el VPH.

- Biopsia excisional, consiste en la eliminación completa de la lesión incluyendo tejido normal adyacente a los bordes externos de la lesión, se realiza en lesiones pequeñas de hasta 2 cm de diámetro, por lo que esta técnica es la ideal para papilomas, verrugas, condiloma acuminado e hiperplasia multifocal. (Fig. 14)
- Biopsia incisional, consiste en la eliminación de una porción representativa para llegar a un diagnóstico definitivo y programar el tratamiento de toda la lesión. La muestra se toma del margen de ésta, incluyendo parte del tejido normal adyacente. Se realiza en lesiones mayores a 2 cm de diámetro razón por la cual esta técnica está indicada en leucoplasias orales y lesiones cancerígenas cuando hablamos de VPH.

Una vez obtenida la muestra se coloca en un frasco rotulado con nombre del paciente, sexo, edad, tipo de biopsia, región de donde se toma la muestra, diagnóstico presuntivo clínica; además debe contener una solución fijadora: formol al 10% (formalina), este líquido debe ser 10 a 20 veces más que el tamaño de la muestra. Debe ir acompañado con una solicitud de estudio histopatológico y un resumen de historia clínica.³²



Figura 14. Biopsia de papiloma oral.³³

1.9.2 CITOLOGÍA EXFOLIATIVA

La citología exfoliativa introducida por George Papanicolau en 1943, ha sido el pilar, en la prevención del cáncer cervical por más de 50 años. El examen es sencillo de procesar, de bajo costo y exento de riesgo.

Consiste en tomar una muestra de material desprendido espontáneamente o en forma inducida de las superficies de los órganos con un hisopo, cepillo o punción estéril. En la mayoría de los casos, la toma de la muestra se hace recogiendo material de un área amplia, sin visión directa de una zona sospechosa; se extiende sobre un portaobjetos y se fija en alcohol de 96%.³⁴

Los frotis o extendidos así preparados se colorean con el método de Papanicolaou o con hematoxilina-eosina y se envían al patólogo quien examina los elementos morfológicos basados en los caracteres microscópicos de las células y sus componentes extracelulares y así formular el diagnóstico citológico.

Sin embargo la citología exfoliativa no es una técnica diagnóstica, las evidencias científicas coinciden en que posee una sensibilidad y especificidad limitada 50 y 60%, debido a que únicamente reporta si hay algún cambio citopatológico en las células, pero no confirma si la anomalía citológica es provocada por la presencia de algún genotipo de VPH.³⁵ (Fig. 15)

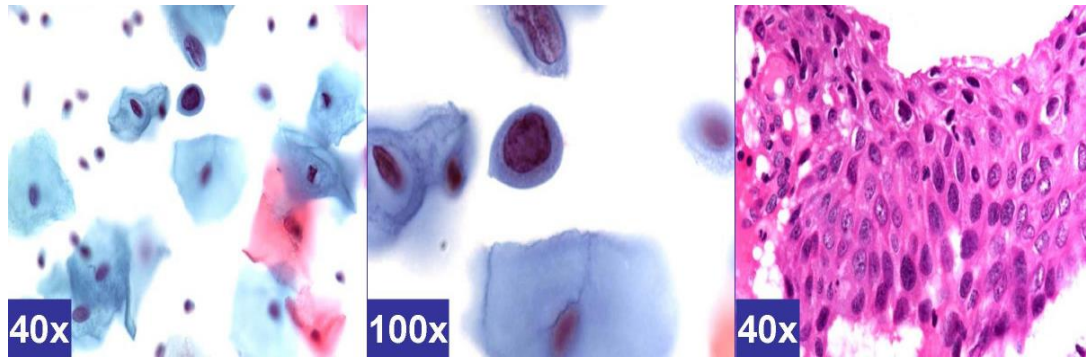


Figura 15. Citología exfoliativa cervical, teñida con hematoxilina-eosina. ³⁶

1.9.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Técnica mediante la cual se detecta la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido, utilizando un anticuerpo específico contra él. La técnica está basada en la reacción antígeno-anticuerpo.³⁷

Existen dos métodos de marcado con anticuerpo: directo e indirecto.

- Método directo: se incuban en una solución con anticuerpos previamente marcados, específicos para tal antígeno. El anticuerpo se une de manera directa al antígeno y el marcador aparece en el sitio antigénico. El anticuerpo que interactúa con el antígeno tisular se conoce como anticuerpo primario. El complejo antígeno-anticuerpo primario puede ser revelado por medio de marcadores especiales, tanto al microscopio fotónico como electrónico. Los anticuerpos pueden marcarse con colorantes fluorescentes o unirse a una enzima, o anticuerpos acoplados a ferritina. En general tienen baja sensibilidad lo cual dificulta la detección por tanto, en la actualidad se usan los métodos indirectos. (Fig. 16)

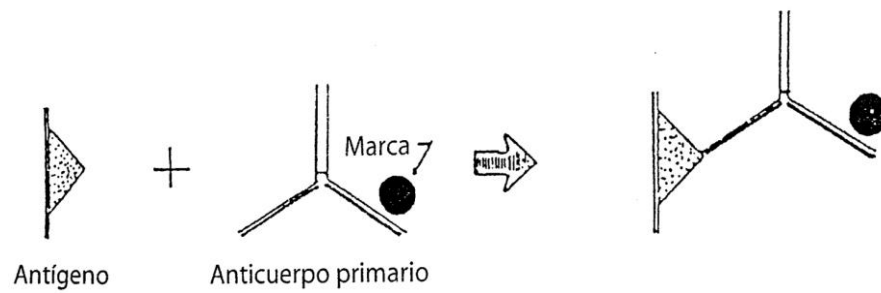


Figura 16. Método directo.³⁸

- Método indirecto: la interacción antígeno anticuerpo se amplifica mediante la introducción de un segundo anticuerpo marcado. El tejido contiene antígenos; se incubaba en una solución con anticuerpos no marcados. El anticuerpo primario que se une en forma directa al antígeno en el tejido, se le denomina según su clase y el animal que lo produce. Después, se incubaba el tejido con un anticuerpo secundario marcado (un anticuerpo contra el anticuerpo primario). Algunos de los anticuerpos secundarios marcados se unen a cada anticuerpo primario, de manera que pueden acumularse más marcadores en el sitio antigénico que con el método indirecto. Por lo tanto, el método indirecto es más sensible y evita el riesgo de alterar la especificidad de unión del anticuerpo primario mediante la adhesión de un marcador en forma directa. (Fig. 17)

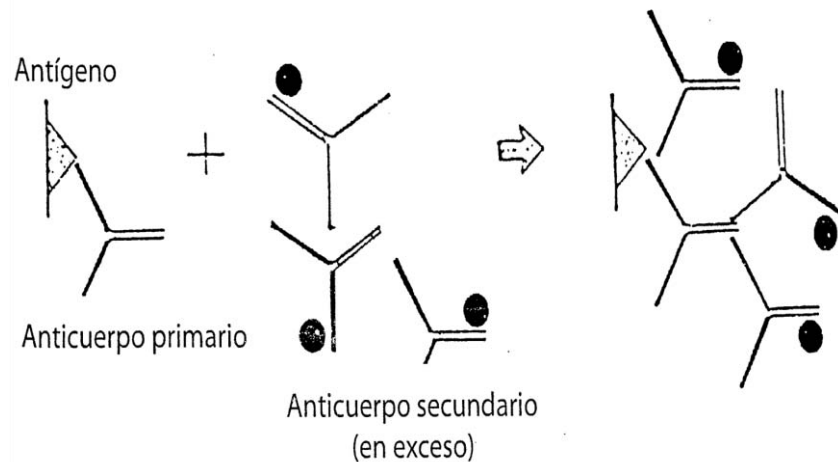


Figura 17. Método indirecto.³⁸

Dado que la reacción antígeno-anticuerpo no es visible mediante microscopía estándar, los anticuerpos se deben marcar de manera que no se interfiera con su especificidad de unión y que puedan ser detectables. Existen tres métodos para realizar dicho marcaje y dada la especificidad de los anticuerpos primarios, es preferible marcar el segundo anticuerpo.

- A) Acoplamiento con compuestos fluorescentes; las moléculas de colorantes fluorescentes (fluorocromos) se unen químicamente a las moléculas de anticuerpos, lo cual hace posible observar los sitios de reacción con los antígenos en inmunofluorescencia.

- B) Acoplamiento de enzimas; los anticuerpos pueden tratarse con la enzima peroxidasa para identificar los complejos antígeno-anticuerpo con la determinación de histoquímica enzimática de la peroxidasa para lo cual puede usarse microscopio de luz como microscopio electrónico. Además de la peroxidasa, se emplean otras enzimas como: fosfatasa alcalina, β -galactosidasa entre otras.

- C) Acoplamiento con compuestos diseminados de electrones, estos compuestos son para utilizarse en microscopía electrónica (ferritina y oro coloidal). El anticuerpo se une con la proteína ferritina, que contiene hierro y es electrodensa, y así se identifica ultraestructuralmente.³⁸ (Fig. 18)

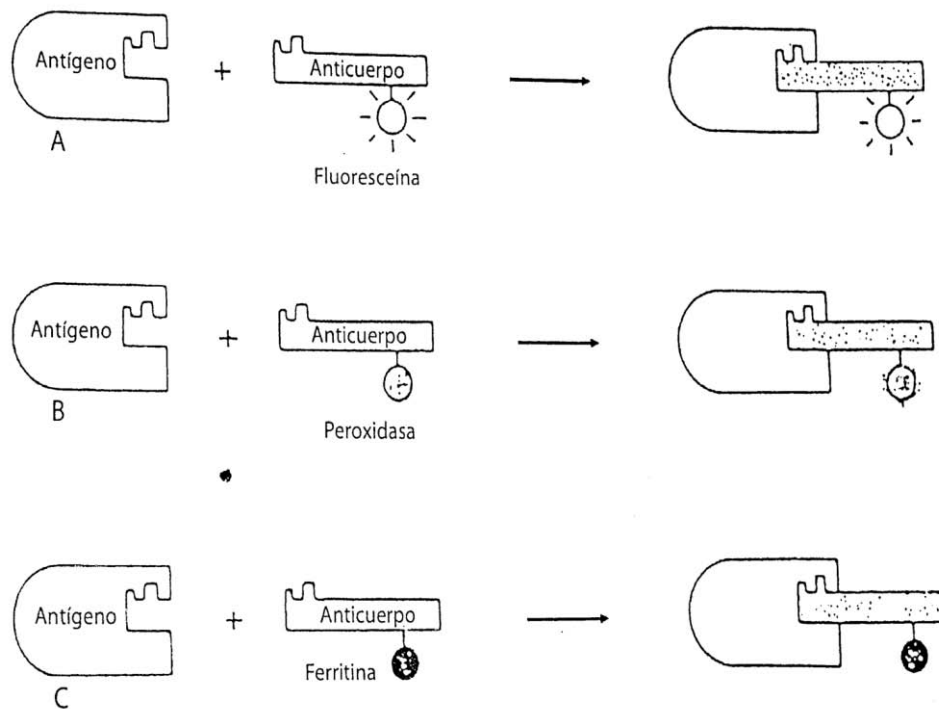


Figura 18. Esquema del principio de los tres métodos más empleados para la detección de proteínas específicas por medio de anticuerpos marcados. ³⁸

Para el diagnóstico de VPH se utiliza un marcador indirecto p16; cabe mencionar que la proteína inhibidora de Kinasa dependiente de ciclina p16INK4a desacelera el ciclo celular mediante inactivación de las kinasas dependientes de ciclina (CDK), que se encargan de desfosforilar a la pRB (proteína del retinoblastoma). En su estado hipofosforilado, la pRB forma un complejo con la proteína E2 del virus, con el efecto negativo sobre la p16. La pérdida funcional de pRB conduce a la sobreexpresión de la p16 y a la proliferación celular descontrolada. Por ello, la p16 es considerada un biomarcador con elevada sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo con expresión activa de oncogenes.³⁹

La detección de p16 se hace por medios indirectos. (Fig. 19)

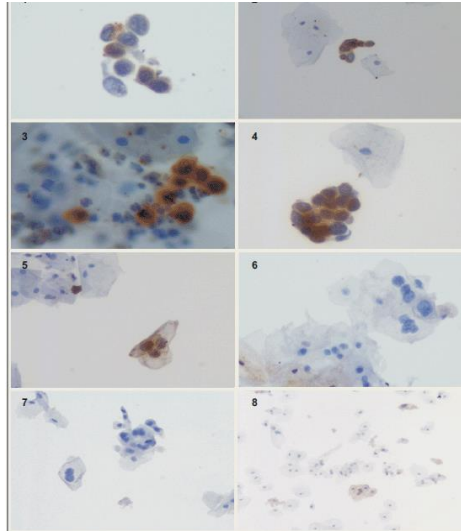


Figura 19. Inmunocitoquímica. Células inmaduras anormales (HSIL) con inmunorreactividad para p16INK4a (1-4), (40X). Dos casos de LSIL (5 y 8) y p16INK4 positivos (20X y 10X). El caso de células escamosas con atipias de significado indeterminado/ASC-US (6) fue negativo para p16INK4a. Una muestra LSIL (7) con coilocitos sin reacción para p16INK4a. Lesión cervical. ³⁹

CAPÍTULO 2. TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECCIÓN DEL VPH.

Los estudios señalan que el hallazgo del VPH en mucosa sana depende del método de estudio empleado. La infección por VPH puede diagnosticarse por diferentes métodos, pero no todos permiten detectar el genoma ni determinar el tipo viral involucrado. Si bien, las mejores pruebas diagnósticas son las moleculares, debe considerarse la prevalencia geográfica para los diferentes tipos de detección del virus en la elección del estudio específico para evitar conclusiones inexactas.

Los métodos moleculares de detección y/o identificación de ADN de VPH más empleadas son: Sistema de Captura de Híbridos y Reacción en Cadena de Polimerasa.²⁹

2.1 HIBRIDACIÓN IN SITU (HIS)

La técnica fue desarrollada en 1969 por Gall y Pardue quienes descubrieron una técnica formada por híbridos moleculares entre RNA y DNA en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Hibridación in situ es una técnica histoquímica basada en la detección y localización de cualquier gen de interés en tejidos o células en cultivo sin necesitar la extracción previa de este ácido nucleico. La principal ventaja es que se trabaja con el RNAm íntegro y se cuida la estructura morfológica del tejido donde se detecta.

Dicha técnica tiene como propósito la hibridación específica de dos secuencias de RNA en donde una de las cadenas de RNAm está marcada y formará un híbrido con la secuencia complementaria presente en las células en una preparación histológica. El híbrido formado puede observarse mediante autorradiografía, si la sonda está marcada

radioactivamente o con sistemas de anticuerpos que reconocen la zona marcada con alguna molécula no radiactiva.³⁸

A pesar de que actualmente existen variaciones de la técnica, la mayoría incluye los siguientes pasos:

A. Procesamiento de los tejidos.

Las células en cultivo o cortes de tejidos se fijan en paraformaldehído o parafina, posteriormente se cortan en un micrótopo y se colocan sobre laminillas limpias para poder desnaturalizarlas con calor o agentes desnaturalizantes.

B. Pretratamiento de los tejidos.

En este paso las muestras se deben tratar con soluciones para preparar el tejido y hacer más eficiente la hibridación.

C. Preparación de la sonda.

La sonda es una secuencia de nucleótidos complementarios al RNAm de interés, que se marca con isotopos radiactivos o con complejos enzimáticos.

D. Hibridación y lavados

En esta etapa se une la sonda con la secuencia de RNAm mediante incubación. A continuación se aplican soluciones para lavar la muestra y remover la sonda que no hibridó, así como preparar al tejido para que los híbridos sean detectados, ya sea por métodos radioactivos (autorradiografía) o no radiactivos.

E. Interpretación

El análisis de la hibridación consiste en realizar las observaciones de los cortes al microscopio, con el apoyo de un analizador de imágenes que permita determinar el número y la intensidad de las células marcadas.^{38, 40} (Fig. 20)

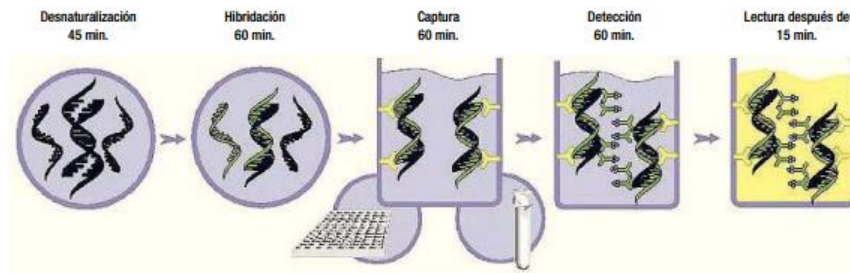


Figura 20. Fases de la captura de híbridos. De izquierda a derecha: Desnaturalización del ADN, Hibridación, Captura y Amplificación.⁴¹

2.2 SOUTHERN BLOT (SB)

Edwin Southern desarrolló esta técnica de transferencia para el ADN en 1973, creando así un elemento básico de los procedimientos de laboratorio de biología molecular.⁴²

Esta técnica es una variante de la Hibridación In Situ, es decir, tiene la misma metodología con las siguientes diferencias: el ADN que se pretende investigar, una vez aislado se hidroliza con enzimas de restricción y los fragmentos son separados según su tamaño por electroforesis en gel de agarosa. Luego se hace una réplica del gel en papel de nitrocelulosa o nylon, al que el ADN se adhiere firmemente, y se agrega una sonda radioactiva, que hibrida al ADN en el papel cuando encuentra una cadena complementaria. La sonda debe tener uno de los nucleótidos marcado mediante un isótopo radiactivo como el fósforo 32 (³²P) o mediante un compuesto como la biotina. Los fragmentos no hibridados se eliminan con una serie de lavados. Finalmente se expone el papel en nitrocelulosa a una película de rayos X. La película, al ser revelada, está expuesta en los lugares donde ha habido hibridación específica. El Southern Blot es una técnica de mucha sensibilidad mediante la cual se llegan a detectar cantidades de ADN que son separados por electroforesis. Es la técnica que se utiliza por excelencia

para caracterizar molecularmente a los virus. Sin embargo esta prueba requiere cantidades apreciables de ADN que a su vez requiere de alta integridad y alto grado de purificación, costo elevado y tiempo prolongado del análisis (aproximadamente una semana).⁴³ (Fig. 21)

Especialmente si las muestras tienen una alta carga viral, pueden ser analizadas en forma confiable por esta técnica, mientras los que tienen baja carga viral pueden ser analizados únicamente por técnicas muy sensibles.²⁹ (Fig. 22)

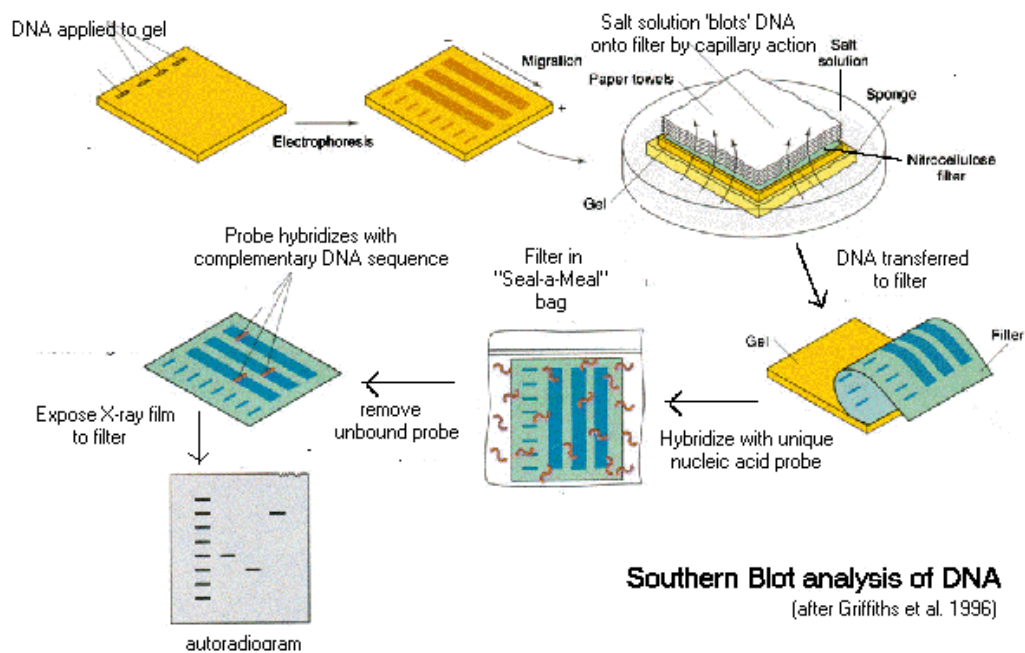


Figura 21. Análisis de DNA Southern Blot.⁴⁴

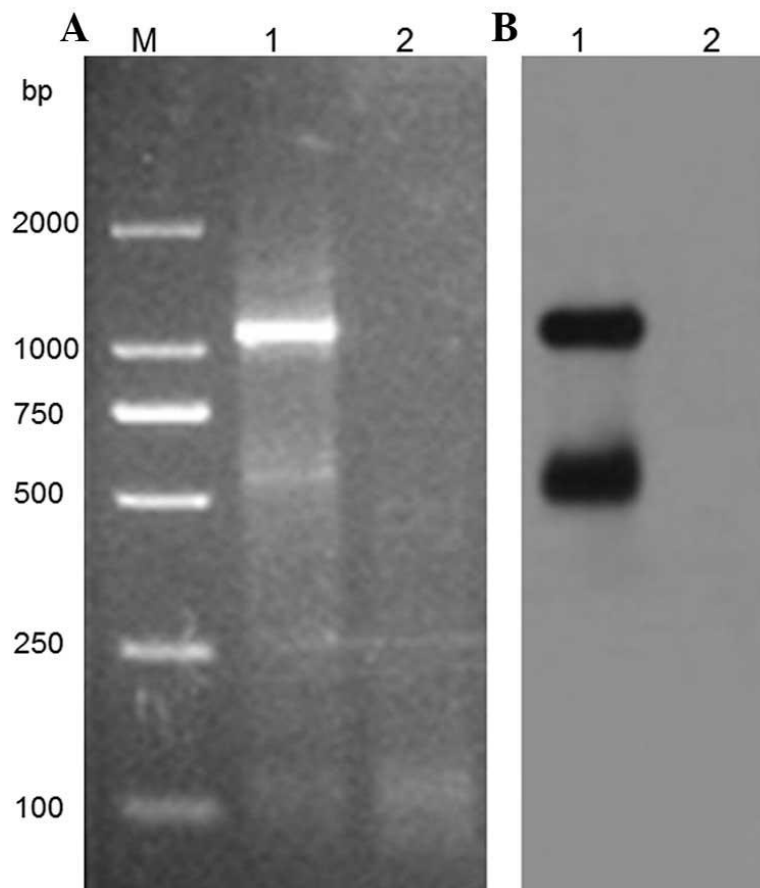


Figura 22. Análisis de especificidad de la amplificación del papilomavirus. (A) electroforesis en gel de agarosa al 2% y (B) sonda específica de E6 Southern Blot que demuestra la presencia de HPV-16; Carril 1, células Caski; Carril 2, tejido cervical normal.⁴⁵

2.3 CAPTURA DE HÍBRIDOS (HC2)

La técnica de Captura de Híbridos 2 (Hybrid Capture 2, HC2) fue desarrollada originalmente por Digene Corporation (EE.UU.) y actualmente por Qiagen (EE.UU.) y desde el año 2000 cuenta con la aprobación de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para uso rutinario en las actividades de detección temprana en combinación con la citología. En América Latina, ésta técnica ha sido aprobada en Colombia, Argentina y México.

Se basa en la Hibridación In Situ utilizando sondas de RNA, complementarias a una secuencia que es común a 13 de los VPH

considerados de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), la captura y detección del híbrido DNA del VPH-RNA de la sonda, se realiza con un anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, dichos anticuerpos están fijados a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Los híbridos inmovilizados se detectan con un sustrato que reacciona con la fosfatasa alcalina y produce fotones. La luz emitida se mide en un luminómetro y se expresa como unidad relativa de la luz. La lectura final de la señal de quimio-luminiscencia permite reportar la prueba como positiva cuando hay emisión de luz o negativa cuando no la hay. Una prueba positiva significa que ha sido infectada por alguno de los 13 tipos de VPH-AR. Esta prueba no permite identificar cuál de ellos es y tampoco si el paciente tiene uno o varios de estos tipos.^{46, 35}

La captura de híbridos es una técnica que puede aplicarse con facilidad en los laboratorios, ya que no requiere instalaciones especiales ni personal con amplia experiencia en técnicas moleculares. El método se limita a reportar con una sensibilidad de 96 a 98%, el resultado como positivo o negativo a VPH de alto riesgo. Diversos estudios han demostrado que con frecuencia pueden presentarse falsos negativos, entre 1 y 8%.³⁵

2.4 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA)

Este método se desarrolló a partir de 1985 por el equipo de Kary Mullis quien recibió el premio Nobel de Química en 1993 y se utilizó inicialmente para el diagnóstico prenatal de la anemia falsiforme. Esta técnica se ha convertido en una herramienta diagnóstica indudable con un sinnúmero de aplicaciones biológicas entre las que se encuentran enfermedades.

El equipo en el que se lleva a cabo la reacción se llama termociclador además se utilizan microtubos, placas de PCR, un juego de micropipetas y puntas para las micropipetas, hielo para mantener los reactivos a baja temperatura.⁴⁷ (Fig. 23)



Figura 23. Equipo y materiales para llevar a cabo una PCR: A. Termociclador. B. Puntas, placa de PCR, microtubos y juego de micropipetas.⁴⁷

La reacción en cadena de la polimerasa es un método enzimático capaz de copiar de forma exponencial (amplificación) un fragmento de DNA específico de un determinado microorganismo o de cualquier otro ser vivo. El resultado final de la acción de la enzima DNA polimerasa es la obtención de millones de copias del fragmento genómico problema. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.^{38, 48}

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o

también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa. A continuación se explicarán cada uno de los puntos mencionados.⁴⁸ (Fig. 24)

En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermusaquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg⁺, buffer y H₂O.⁴⁸

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «*forward*» o sentido y otra «*reward*» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa.⁴⁸

Por su parte, los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, así como solución amortiguadora o buffer.

El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.⁴⁸

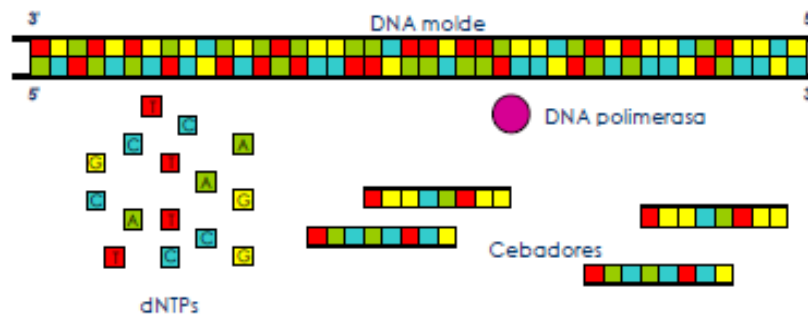


Figura 24. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR.⁴⁷

Principalmente cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión.

A continuación explicaremos qué sucede en cada una.

- Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 93° a 95°.⁴⁸
- Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (Tm) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C para obtener la estabilidad y especificidad del complejo.⁴⁸
- Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.⁴⁸ (Fig. 25)

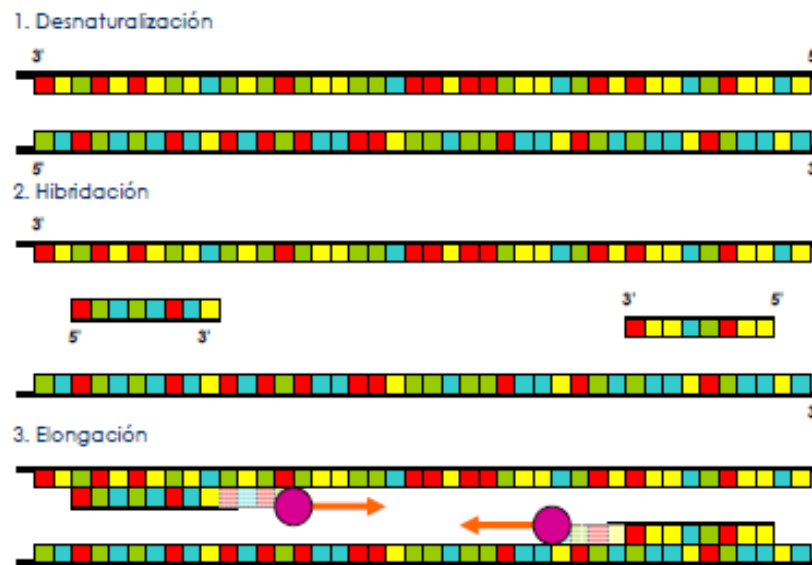


Figura 25. Fases de la PCR. ⁴⁷

Se repiten las etapas anteriormente descritas en cada ciclo, las cadenas de ADN se duplican. Así, 20 ciclos proporcionan un millón de amplificaciones.⁴⁷ (Fig. 26)

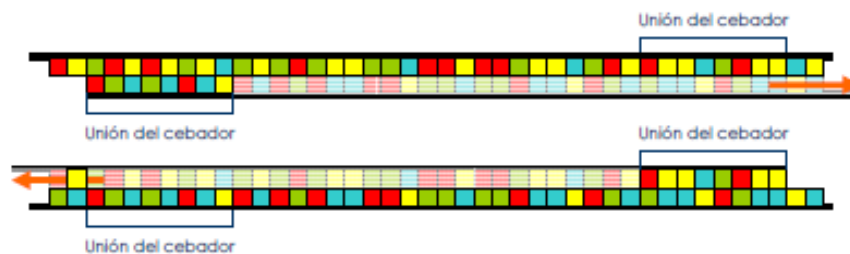


Figura 26. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (la cadena recién formada se representa de color más claro).⁴⁷

Finalmente, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica.⁴⁸ (Fig. 27)

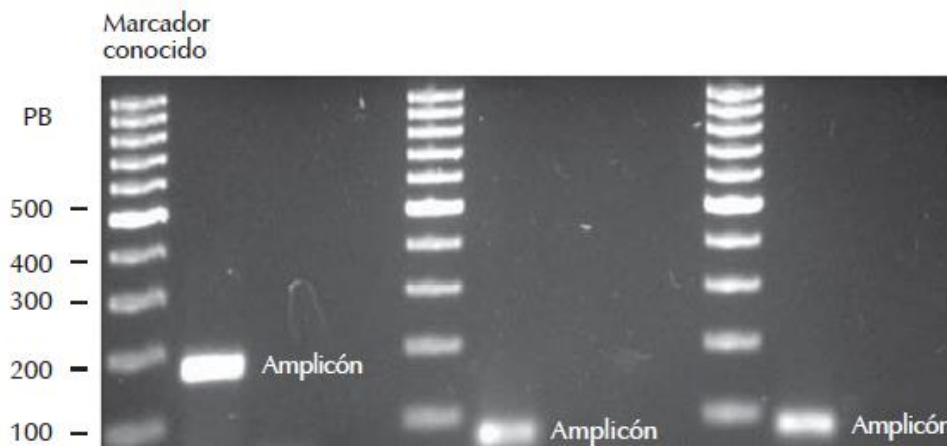


Figura 27. Gel de agarosa. Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción. PB = número de pares de bases.⁴⁸

Las técnicas de detección y genotipificación de VPH se basan en esta técnica, para posteriormente desarrollar un método complementario que permita discriminar, ya sea, los grupos de VPH de alto o bajo riesgo, o los genotipos individuales.⁴⁹

Los protocolos mayormente aceptados utilizan juegos de *primers* dirigidos a la región del gen L1 altamente conservada en los tipos virales, entre ellos destacan dos GP5+/6+ y los MY09/1.³⁵

Los resultados obtenidos con la PCR están sujetos al nivel de detección de la prueba molecular, pues la cantidad de ADN del virus en la muestra puede resultar insuficiente, tanto por una baja carga viral presente, como por el lugar de toma de muestra biológica, lo que no permitiría la detección del genoma viral mediante este método. Algunos autores señalan que el límite de sensibilidad de la PCR es de 10 copias del ADN viral entre un millón de células. Otros señalan que la distribución del ADN viral en las lesiones es focal, por lo que en células adyacentes que presentan los mismos cambios morfológicos, se pueden obtener resultados distintos en la detección de dicho ADN.

Todos los métodos basados en la PCR tienen limitaciones para la detección de infecciones múltiples debido al número de tipos de VPH detectables. Otro problema es la diferencia en la sensibilidad para distinguir tipos de VPH entre diferentes sistemas usados y la reproducibilidad de los diferentes métodos de VPH para la determinación del tipo exacto de VPH en la muestra.²⁹

Actualmente, el panorama de la PCR promete estar a la altura de los objetivos de los investigadores, tan es así que ahora la modalidad de la PCR en tiempo real ofrece la gran ventaja de usar un sistema cuantitativo.

2.4.1 PCR TIEMPO REAL

El objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.⁴⁸

El principio de la técnica se basa en la PCR, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en “tiempo real” se refiere a la detección de los productos amplificados que suceden en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco.⁴⁸

Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR.⁴⁸

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR, que necesita una mayor concentración.⁴⁸

Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Master mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad.⁴⁸

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real, para ello la estrategia tecnológica que ha dado buenos resultados son los sistemas basados en reporteros fluorescentes. En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos.⁴⁸

- No específicos: se basan en el uso de moléculas que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines se llama SYBR Green. Este es uno de los reporteros fluorescentes más utilizados

por los investigadores debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primers.⁴⁸ (Fig. 28)

- Específicos: parten de principios distintos a diferencia de los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o «quencher».⁴⁸

Los métodos específicos son más costosos que los no específicos, pero son más eficientes al garantizar la especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos.⁴⁸ (Fig. 29)

Cualquiera que sea el método que se aplique, se pueden adquirir fácilmente, ya que la gama de sondas para desarrollar, tanto los métodos específicos como los no específicos, es amplia.⁴⁸

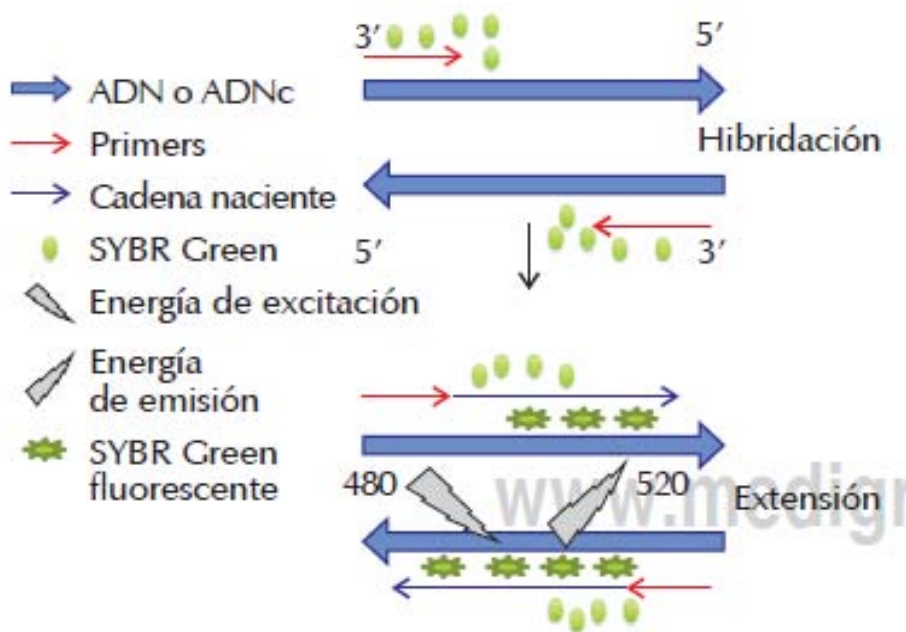


Figura 28. Método no específico. Cuando el SYBR Green está unido al ADN de doble cadena.⁴⁸

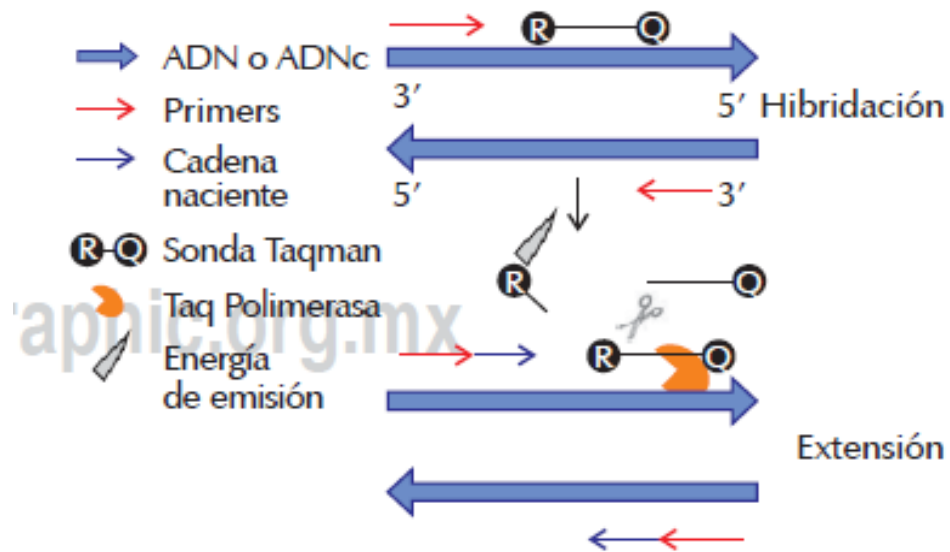


Figura 29. Método específico.⁴⁸

No es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra, el análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación génica. Para ello, los termocicladores están provistos de una PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación o curva "melting" que muestra información sobre la especificidad de la reacción.⁴⁸ (Fig. 30)

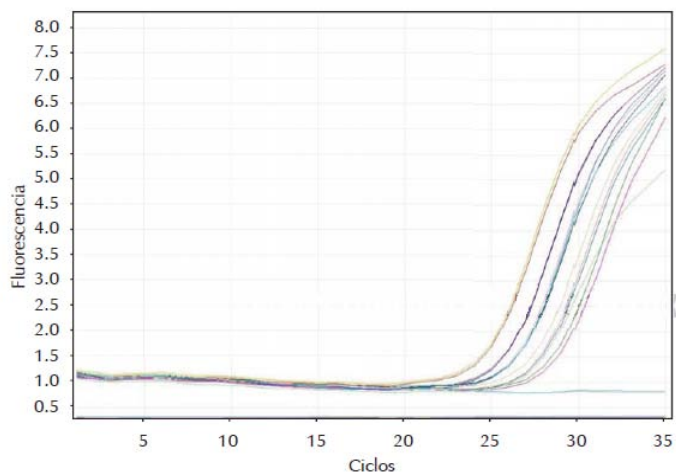


Figura 30. Curva de amplificación. En el eje «Y» se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje «X» los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN.⁴⁸

PCR en tiempo real ofrece varias ventajas técnicas, incluida el monitoreo en línea, sin necesidad de análisis post-tratamiento y por lo tanto reduce el riesgo de contaminación. Las señales fluorescentes se van monitoreando a medida que se generan.⁵⁰

Estudios han demostrado que esta técnica por su alta especificidad y sensibilidad nos permite diagnosticar no solo si se tiene VPH sino también nos señala el tipo de virus que se padece. Por lo que brinda un diagnóstico preciso respecto a la enfermedad. Además de la eficacia de este método, la identificación de muestras negativas para el VPH ofrece una ventaja económica considerable. De hecho, se considera una herramienta excelente para la detección del VPH en ensayos epidemiológicos de gran escala, así como en el monitoreo de la progresión de la curación del VPH o de la enfermedad persistente después de una infección aguda.⁵¹

Este enfoque determinaría fácilmente la prevalencia actual de genotipo de VPH circulante dentro de la población y facilitar así la evaluación del impacto de la vacunación contra el VPH en los genotipos.⁵¹

2.5 TÉCNICA INNO LIPA

LIPA es un ensayo de sondas en una tira de nitrocelulosa (Line Probe Assay), este estudio tiene como principio la hibridación reversa utilizando sondas de oligonucleótidos con una secuencia específica.

La prueba consiste en tres fases principales.⁵³ (Fig. 31)

- a) Extracción del ADN a partir de las muestras mediante PCR.
- b) Amplificación del ADN diana por los primers de consenso que tienen como objetivo a una región conservada del genoma de interés.
- c) Hibridación de los amplificados con sondas de nucleótidos específicos fijados en una tira de nitrocelulosa.

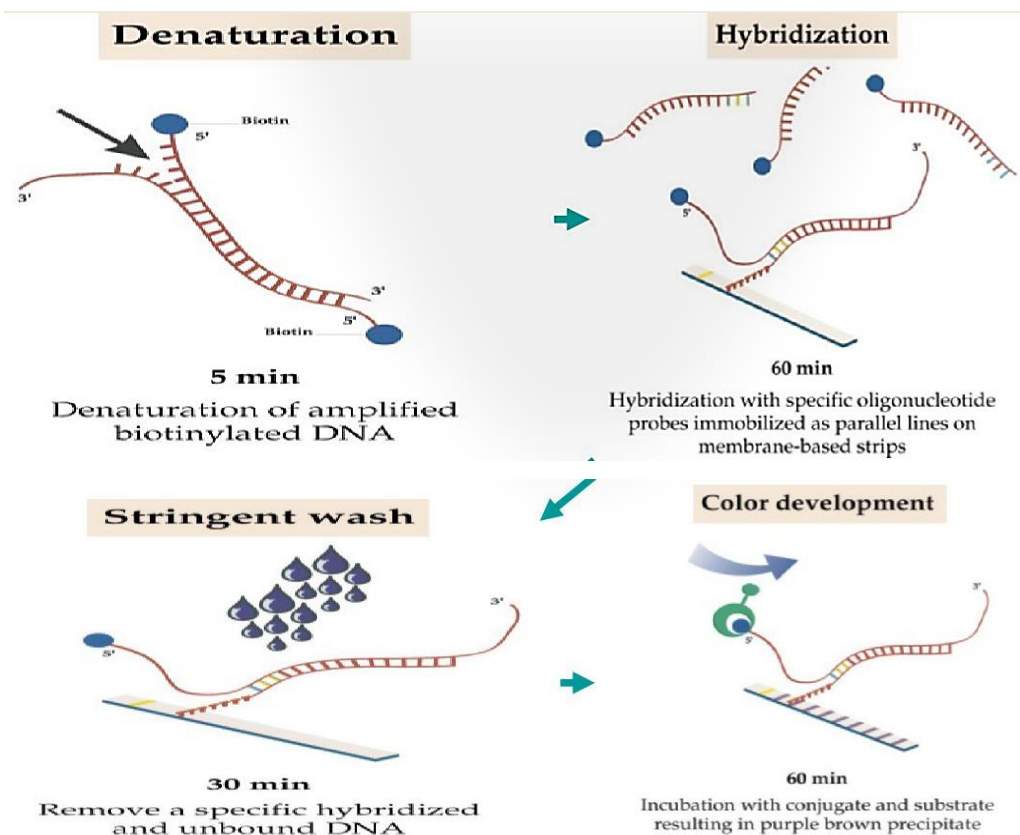


Figura 31. Fases de la técnica Inno Lipa.⁵²

Como se menciona es un ensayo de sonda lineal, para uso diagnóstico in vitro, por lo que el diseño para detección del VPH abarca la identificación de 28 genotipos diferentes del virus mediante la detección de secuencias específicas en la región L1 del genoma del VPH.⁵³

En este sistema, se amplifica parte de la región L1 del genoma de VPH y los amplificados biotinilados desnaturalizados son hibridados con sondas de oligonucleótidos específicas, las cuales se inmovilizan en tiras de membranas que contienen 28 secuencias específicas de VPH. Después de la hibridación y el lavado astringente, la estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina se agrega a los híbridos biotinilados formados previamente. La incubación con el cromógeno BCIP/NBT produce un precipitado púrpura y los resultados se pueden interpretar visualmente o mediante un software como se mencionó anteriormente.^{53, 54} (Fig. 32)

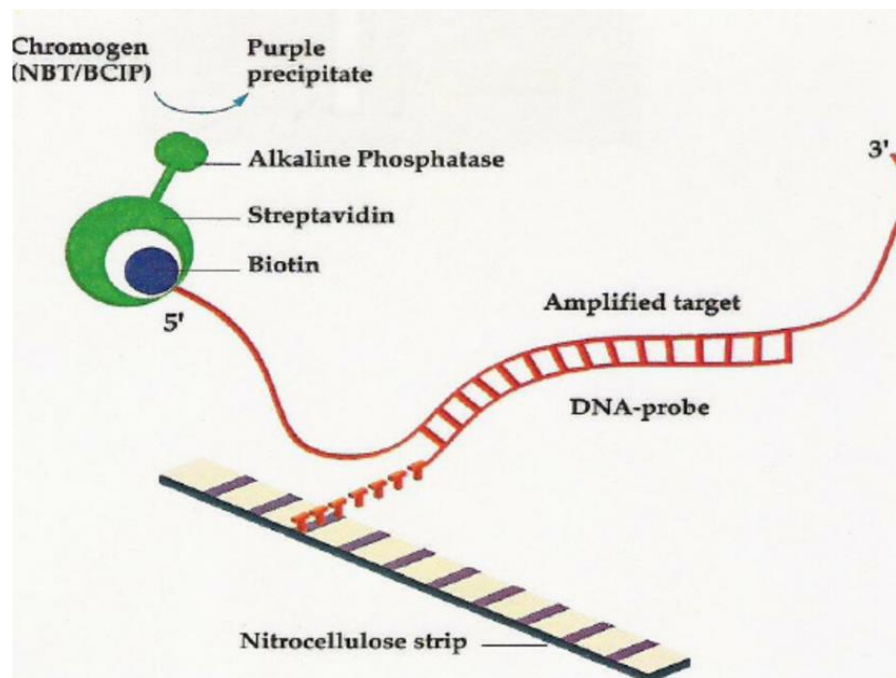


Figura 32. INNO-LiPA Principio de prueba de genotipado HPV, adaptado del folleto INNO-LiPA.⁵⁵

Para la obtención de los resultados las tiras de nitrocelulosa se eliminan por Auto-Lipa 48, se secan con papel absorbente y se colocan en tarjetas Lipa que son escaneadas y leídas, para después ser arrojados los datos por el software. (Fig. 33)



Figura 33. Máquina Auto-Lipa 48.⁵⁶

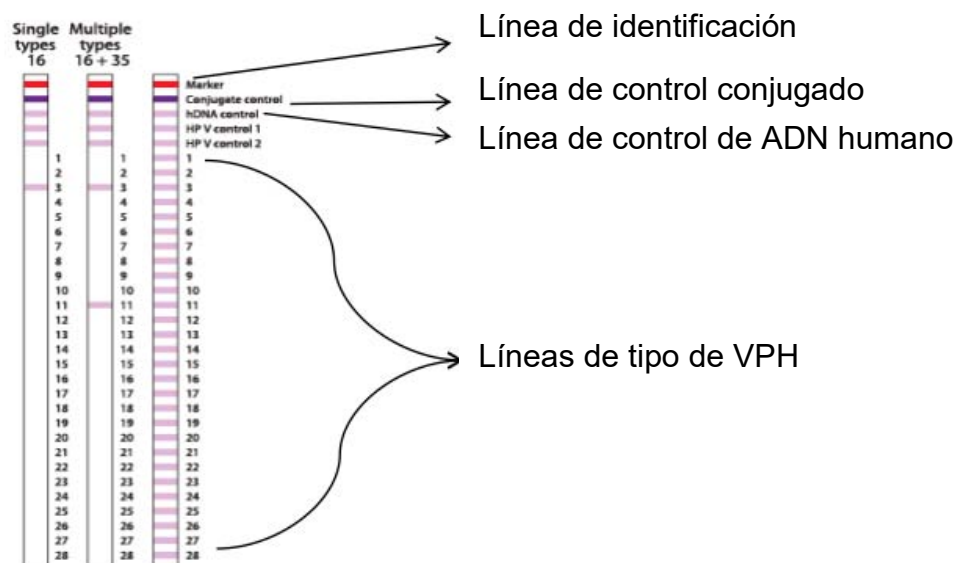


Figura 34. Interpretación de los resultados.⁵⁶

La prueba de genotipado VPH de INNO-LiPA (Innogenetics) es un ensayo de genotipificación permite identificar 28 tipos de HPV (HR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 71, 70 y 73 y LR: 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54 y 74). (Fig. 34)

Se considera que este método es más sensible para la detección viral debido a que amplifica un fragmento de menor tamaño y a diferencia de otros sistemas que se basan en la amplificación de señal, con esta metodología se pueden identificar específicamente los genotipos que se encuentran en una muestra determinada.⁵⁴ (Fig. 35)

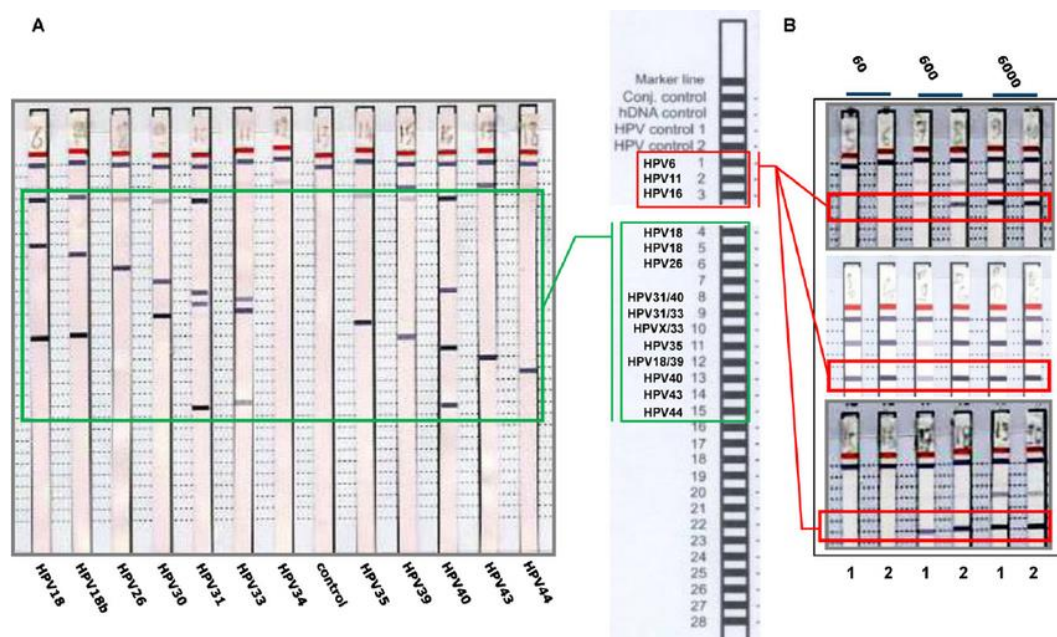


Figura 35. Hibridación inversa en tiras de LiPA para la identificación de los genotipos del plásmido L1 del VPH. A. Patrón del genotipo del VPH obtenido mediante el ensayo de hibridación de LiPA después de la amplificación de PCR en tiempo real con 13 de 32 genotipos de HPV ensayados a 6000 copias / reacción. Como se ilustra en el panel central, las bandas reactivas permitieron la confirmación de los genotipos de HPV probados (panel verde). B. Patrón de genotipo del VPH obtenido mediante ensayo de hibridación de LiPA después de PCRs convencionales (1) en tiempo real (2) de series de dilución de 10 veces (de 6000 a 60 copias / reacción de PCR) de HPV6 (exploración superior), 11 Scan) y 16 (escaneado inferior).⁵⁷

TECNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PCR	Alta sensibilidad. Amplifica fragmentos pequeños de DNA (menos de 1ug). El DNA puede estar parcialmente degradado. Se obtienen muchas copias en poco tiempo. Permite conocer el tipo específico y las infecciones múltiples.	Necesita instalaciones especiales y personal calificado. Fácil contaminación con producto amplificado.
SOUTHERN BLOT-DOT BLOT	Permite detectar y tipificar el VPH	Requiere grandes cantidades de DNA(más de 10ug). El DNA tiene que ser de alta calidad.
HIBRIDACION IN SITU	Proporciona la localización del virus en la célula. Permite identificar los tipos celulares infectados por el ADN viral. Identifica las regiones del tejido en las que la expresión del ADN es mayor.	Baja sensibilidad. Necesita una alta concentración viral en la célula (50 copias/célula)
PCR EN TIEMPO REAL	Permite cuantificar el DNA	Genera falsos positivos. Dificultad en la estandarización.
HIBRIDO DE CAPTURA 2	Sensibilidad de 95% para NIC I 92.8% -97.9% NIC II 78%-90% ASC-US No requiere instalaciones especializadas ni personal calificado. Menor riesgo de contaminación que la PCR.	Especificidad 57-89% No permite conocer el tipo específico de VPH. Solo puede identificar VPH de AR. Reacciones cruzadas.

Tabla 3. Tabla donde se resaltan algunas de las ventajas y desventajas de las principales pruebas moleculares implicadas en el diagnóstico y tipificación del VPH.²⁹

2.6 OTRAS TÉCNICAS

Existen múltiples estudios que reflejan la variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad de los distintos métodos empleados en la identificación de la infección. Por otra parte las ventajas, desventajas y/o limitaciones que presentan los procedimientos para la detección de VPH, han permitido que se desarrollen nuevas técnicas diagnósticas; ya sea combinándolas o con variantes pero siempre siguiendo el principio básico que las representa.²⁹

La mayoría de estas pruebas de laboratorio se enfocan a VPH cervicouterino dada la relación etiológica que existe entre el virus y el cáncer cervical, dejando a un lado la investigación en el campo de la infección encavidad oral a pesar de que los tumores de cabeza y cuello tienen una incidencia mundial de 460,000 casos al año, lo que provocó 228,000 muertes estimadas en 2014, siendo el VPH-16 responsable del 25% de todos los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y está presente en el 45-90% de todos los casos de tumores orofaríngeos y se estima que en 24% de los tumores de laringe y cavidad oral.⁵⁸

La literatura sugiere que algunos de los estudios de laboratorio que se han utilizado para la detección del VPH en cavidad oral que identifican los tipos 6 y 11 que se hallan normalmente en cavidad oral son:

- PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción). Técnica molecular que permite la identificación y tipificación del VPH con gran precisión y exactitud. Debido a esto, se ha sugerido como método de diagnóstico y seguimiento de la presencia y persistencia de VPH de alto riesgo. Así mismo, esta técnica puede identificar el VPH 11 que es comúnmente hallado en mucosa oral. Presenta mayor validez que los métodos morfológicos, mostrando una sensibilidad de 100%, una especificidad de 99% y un valor predictivo negativo de 100% respecto al diagnóstico histopatológico.^{29, 35, 49}
- AMPLICOR. La prueba AMPLICOR HPV Test (CE-IVD) es una prueba cualitativa in vitro para la detección del VPH en muestras clínicas. La prueba utiliza la amplificación de ADN objetivo mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) e hibridación de regiones amplificadas para la detección del ADN de 13 genotipos de VPH de alto riesgo (mismos genotipos detectados en CH2). En varios estudios, la prueba AMPLICOR, ha demostrado una alta sensibilidad.^{29, 35, 49}
- LINAER ARRAY. En la actualidad el sistema más sensible y específico para determinar la infección latente, subclínica y activa por VPH, es la prueba "LINEAR ARRAY Genotyping Test" basada en PCR para la amplificación de una secuencia específica de la región L1, utilizando un par de oligonucleótidos de amplio espectro, seguida de una hibridación con sondas específicas para tipificación individual 37 genotipos de alto y bajo riesgo: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66,

67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84. Entre los atributos de la prueba LA, se encuentran: su elevada sensibilidad 98% y especificidad 99%; además de incluir controles internos de amplificación, ausencia de reactividad cruzada y excelente reproducibilidad 99.8%.^{29, 35, 49}

En el caso de países en desarrollo como los países latinoamericanos, no solo preocupa la falta de información de los pacientes sobre la enfermedad, sino de los profesionales en cuanto a las técnicas de diagnóstico para VPH razón por la cual las técnicas moleculares tienen un costo elevado y no están al alcance de toda la población.

Cabe señalar que, a pesar de todos los inconvenientes antes mencionados, existen investigaciones de nuevos métodos que pueden estar al alcance de todas las poblaciones y así poder implementarlos clínicamente.^{29, 59}

CAPÍTULO 3. USO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA INVESTIGACIÓN.

3.1 ASPECTO GENERAL

La biología molecular es un área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico. La detección y cuantificación específica de material genético en una muestra biológica ha mostrado un impacto significativo en todas las áreas de la salud, sobre todo en las áreas de las enfermedades infecciosas y el cáncer. El desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas, ha transformado al diagnóstico molecular en una herramienta clave para el equipo clínico en beneficio directo del paciente ya que ofrecen mayor sensibilidad, especificidad y rapidez con requerimientos mínimos de muestra en comparación con las pruebas convencionales. Esto permite el inicio temprano del mejor esquema terapéutico, disminuyendo de esta manera la probabilidad de complicaciones.

Con el creciente desarrollo tecnológico en el área de la biomedicina, existen varias plataformas que han demostrado un gran impacto en la investigación biomolecular que lentamente se están incorporando a la práctica clínica.

El objetivo de estos nuevos estudios es poder llegar a una “medicina personalizada”, que consiste en entregar un tratamiento específico al paciente (genoma) adecuado, basado en que cada individuo presenta una genética diferente y única.^{60, 61}

A pesar de su valor, las técnicas moleculares aún deben ser más rápidas, automatizadas y de bajo costo para ser útiles en las poblaciones y países de bajos ingresos.⁶²

En el caso del virus del papiloma humano, con el avance de la biología molecular ha permitido ofrecer un mejor diagnóstico gracias a que brinda la tipificación del virus lo que permite conocer los tipos virales circundantes en la población, facilitando el desarrollo e implementación de programas de prevención y tratamiento de la enfermedad, por lo que, la identificación de VPH de alto riesgo oncogénico debería realizarse rutinariamente.^{29, 58, 63}

3.2 ASPECTO ODONTOLÓGICO.

A la velocidad con la que avanza el conocimiento y su acceso a través de las tecnologías de la información y comunicación, es indispensable que los profesionistas de la salud cuyo principal objetivo es la práctica clínica estén en contacto con los avances tecnológicos y científicos, para vincular este conocimiento con su aplicación en la clínica. Así mismo, las ciencias biomédicas y la tecnología son conceptos que están encaminados al mejoramiento de la salud. Son áreas del saber en las que trabajan muchos grupos de investigación; en particular, la genómica ha realizado grandes aportes en el estudio de los genes y en su papel en la salud y en la enfermedad.

El campo de la salud oral no es la excepción, y ahora es posible que el conocimiento que aportan la bioquímica y la biología molecular tenga una alta coincidencia con las actividades que realizan en la clínica. De esta forma, ha crecido la comprensión sobre los principales padecimientos en el ámbito odontológico, como la caries y la enfermedad periodontal, enfermedades cuya etiología ha sido ampliamente estudiada y que son producto de la conjunción entre los microorganismos, con factores genéticos y medioambientales. Por este motivo, diversas investigaciones se han abocado a correlacionar estas enfermedades dentales con otras

enfermedades sistémicas para llegar a la identificación de los factores de riesgo asociados al desarrollo de estas enfermedades.

Así mismo, la regeneración tisular ha emergido a partir de los diversos estudios realizados con células madre.

Por todo esto, es importante resaltar la importancia de implementar de manera más formal la instrucción de la Biología Molecular como una herramienta que permita comprender los aspectos fisiopatológicos de las enfermedades de la cavidad oral.^{64, 65}

Cuando de VPH oral se trata, la biología molecular nos ha ayudado a diagnosticar los tipos específicos de la enfermedad, algunos autores sugieren que debería de estudiarse la saliva, pues se han encontrado agentes antimicrobianos como IgA, citoquinas, lactoferrinas y lisozima cuya producción incrementa durante procesos infecciosos, tal como ha registrado en respuesta de micosis, estos agentes protegen contra la infección por VPH, pero aún no se han realizado estudios de laboratorio para una prueba específica en saliva que detecte el virus, por lo que algunos investigadores consideran que se debería estudiar más sobre el tema.⁶⁶

A pesar de todas las estadísticas sobre el virus del papiloma humano presente en cavidad oral y su relación con el cáncer de células escamosas no existen estudios sobre alguna técnica molecular específica para diagnosticar VPH de dicha parte del cuerpo humano. La literatura indica que esta área de la medicina aún se encuentra en vías de desarrollo.⁹

CONCLUSIONES

Hoy en día se asume que el virus del papiloma humano es la principal causa de la infección de transmisión sexual, así como uno de los factores de riesgo para desarrollar cáncer orofaríngeo y principalmente cáncer cervicouterino.

La introducción de vacunas para algunos tipos de virus y dependiendo del país determina qué tipo de VPH puede padecer una sociedad. Considerando los dos factores antes mencionados, es indispensable la búsqueda constante de nuevas estrategias tanto de diagnóstico como de prevención de la enfermedad, debido a que más de un tipo de virus entre ellos los tipos más agresivos pueden encontrarse en mucosa oral sana, por lo que deben reforzarse los puntos débiles de las pruebas, la sensibilidad y especificidad.

La detección precoz a través de programas de prevención sobre la enfermedad ha mostrado una reducción en el desarrollo de cáncer por VPH, por lo tanto, el odontólogo debe conocer las pruebas que se utilizan actualmente para poder diagnosticar oportunamente así como de informar a sus pacientes si se sospecha de malignidad o como medida alternativa para prevenir la enfermedad.

Finalmente la falta de investigación sobre el VPH oral apunta que no existen pruebas de laboratorio concisas para esta localización; dándole prioridad al VPH cervical. Basado en la búsqueda bibliográfica que se realizó para la elaboración del presente trabajo, se concluye que existe una necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección que incluyan a la cavidad oral, debido a que una de las principales formas de contagio es el contacto orogenital.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jiménez C, Correnti M, Salma N, Cavazza M, Perrone M. Detección del virus papiloma humano en entidades clínicas benignas de la cavidad bucal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación molecular. *Acta Odontol. Vene.* 2001;39 (2)
2. Brooks F. Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A. Jawetz, Melnick y Adelberg's. *Microbiología Médica.* 26ª ed. Cd. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2014 Pp.644-645
3. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. *Medical Microbiology.* 7ª ed. España: Editorial Elsevier, 2014. Pp. 445-450
4. Revenga F, Paricio J.F. Terapéutica tratamiento actual de las verrugas. *Rev. Med. Integral* 2001; 37 núm. 9: 395-402
5. Von Domarus A, Farreras V.P, Rozman C, Cardellach L. F. *Medicina interna,* 17ª ed. Vol. II España: Editorial Elsevier, 2012. Pp. 2236-2238
6. Carballal G, Oubiña J.R *Virología Médica,* 1ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Corpus, 2015. Pp. 581-598
7. Tay J, Trinidad Sánchez J, Becerril R, Mendiola J, Romero R. *Microbiología y Parasitología Humana.* 4ª ed. Cd. México: Editorial Méndez, 2012. Pp. 769-794
8. Molina J, González R. M., Cameros I.J. *Microbiología bucal.* 4ª Ed. Cd. México; Editorial Méndez, 2009. Pp. 205-220
9. Cháirez P, Vega M.E, Zambrano G, García A.G., Maya I.A., Cuevas J.C. Presencia del virus papiloma humano en la cavidad oral: Revisión y Actualización de la literatura. *Int. J. Odontostomat.* 2015; 9 (2): 233-238
10. Estrada G. A, Márquez M., González E, Nápoles M.M, Ramón R. Infección del virus del papiloma humano en la cavidad bucal. *Medisan* 2015; 19 (3):1-6

11. Estrada G. A, Márquez M, González E. Infección por virus de papiloma humano en pacientes con liquen plano bucal. *Medisan* 2013; 17 (5):784-791
12. Esquenazi D, Bussoloti I, Da Costa M.G., Souza F., The Frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2010; 76(1): 78-84
13. Negroni M, *Microbiología Estomatológica fundamentos y guía práctica.* 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 2009. Pp. 433-437
14. Prendiville W, Philip D, The health professional's HPV HANDBOOK. 1: Human papillomavirus and cervical cancer. The European Consortium for Cervical Cancer education. Taylor & Francis Group. 2004 Pp.15-18
15. Ruíz G., Ojeda P., Digiampietro L. Determinación del VPH en cavidad oral por técnica del hisopo. *Rev. Venez. Oncol.* 2009; 21(2):70-76
16. Estrada G.A, Márquez M, Hernández G, Oliveros S. Identificación del papilomavirus humano en leucoplasia bucal. *MEDISAN* 2013; 17(6):944-950
17. Pérez L, Bascones A. Tumores benignos de la mucosa oral. *Avances en Estomatología* 2010; 26(1):11-18
18. Muscio L, Oviedo J.M. Virus del papiloma humano y cáncer bucal. *Acta Odontol. Vene.* 2013; 51(1)
19. Merchena L, Fernández C, Osorio M. Pérez E. Detección de un papiloma lingual en la consulta de Odontología. Caso clínico. www.rodoo.com/ver.php?id=134 23/Marzo/2017 5:03pm
20. Requena L. Histopatología de las infecciones víricas cutáneas más frecuentes. *Actas Dermo-sifilográficas* 2010; 101 (3): 101: 201-216

21. Miranda H, Olano T.U, Zanelli A.G. Hiperplasia epitelial focal (enfermedad de Heck). Acta Méd. OrreguianaHampi Runa 2015; 15(1):131-137
22. Chanco G. Hiperplasia epitelial focal. Dermatol. Perú 2014; 24 (4): 235-238
23. Fernández A, Marshall M, Alfredo S. Leucoplasia verrucosa Proliferativa: A propósito de un caso clínico. Int. J. Odontostomat., 7(3):379-383, 2013.
24. Martínez-Sahuquillo A, Gallardo I, Cobos M.J, Caballero J, Bullón P. La leucoplasia oral. Su implicación como lesión precancerosa. Avances en Odontoestomatología 2008; 24 (1) 33-42
25. Escribano M., Bascones A. Leucoplasia Oral: Conceptos Actuales. Avances en Odontoestomatología 2009; 25(2): 83-93
26. Mazzei P, Juchli M, Ramírez Z, Marengo R, Moreno J, Barrios S, Adler I, García A, Muiño A, Cuello M, Avagnina A, Eloner B, Denninghoff V, Monge F. Lesiones por virus de papiloma humano de la vía aerodigestiva superior-incidencia de subtipos. Rev. Faso 2016; 2382): 5-12
27. Meza G, Muñoz J.J, Páez C, Cruz B, Aldape B. Carcinoma de células escamosas de cavidad bucal en un centro de tercer nivel de atención social en la ciudad de México. Experiencia de cinco años. Avances en Odontoestomatología 2009; 25(1): 1-19
28. Gutiérrez C, Monerris E, Duran M. D, Sancho M, Gras J. R, Papilomas y papilomatosis laríngea. Tratamiento con láser CO₂. Nuestra experiencia en 15 años. Acta Otorrinolaringol. Esp. 2010; 61(6):422-427
29. Medina M. L, Medina M. G, Merino L. A. Valoración diagnóstica de técnicas moleculares para detección de infección bucal por virus del papiloma humano. Rev. Costarr. Salud Pública 2012; 21:116-122
30. www.patologiabuca.com/pdf/biopsia01.pdf
27/Febrero/2017 7:00pm

31. Rivas Muñoz Ricardo. Diagnostico en endodoncia. www.iztacala.unam.mx/rivas/Notas5diagnostico/metbiopsia.html. 27/Febrero/2017 8:46pm
32. Hernández R. D, Solís M.A, Gálvez G, Ríos J, Gómez Y. Citología Exfoliativa y biopsia en cavidad oral. 1a. Ed. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 2000. Pp.49-86
33. Daniela Zapata <http://patobucal9.blogspot.mx/p/papilomas.html> 28/Febrero/2017 3:33am
34. Manual de Patología General Universidad Católica de Chile. http://publicacionesmedicina.uc.cl/PatologiaGeneral/Patol_128.html 20/Febrero/2017 10:47am
35. Gutiérrez R. Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención de cáncer cervicouterino AMATGI 2011; 5(3):16-23
36. Cyto Journal 2006 <https://www.biomedcentral.com/1742-6413/3/14/figure/F6?highres=y> 18/Febrero/2017 12:35pm
37. Vecino E, Técnica Inmunohistoquímica <https://campus.usal.es/~histologia/histotec/especial/espe18/espe18.htm> 20/Febrero 2017 4:52pm
38. González M.G. Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular. 1ª. Ed. CDMX: Editorial AGT, 2008. Pp. 204-371
39. Toro M, Ferrández A. Detección de virus de papiloma humano (HPV) a partir de muestras celulares del cuello uterino en case líquida. Correlación con la inmunorreactividad de la proteína p16INK4a. Invest, clín 2011;52(1):1-10
40. Junqueira L. C, Carneiro J. Histología Básica, 6a ed. Barcelona, España: Editorial Elsevier, 2005. Pp. 4-22
41. De la Fuente D, Guzmán S, Barboza–Quintana O, González R.A, Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico. Rev. Med. Univer 2010; 12 (49):231-238
42. Genomics, Society and Policy, 2006, 2(2): 50-61

43. García M. Hibridación de ácidos nucleicos: Fundamentos y Aplicaciones. Bol of Sanit. Panam. 1990; 109(3):244-256
44. School of Medecine
<http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/blotting.htm>
 22/Febrero/ 2017 4:47pm
45. Lin K, Lu X, Chen J, Zou R, Zhang L, Xue X. EG– associated trancriptionpaherns in human papiloma virus 16– positive cervical tissues 2014.
<https://www.spandidos-publications.com/ol/9/1/478>
 20/Febrero/2017 7:45pm
46. Gonzálo Claros M.
http://www.biorom.uma.es/contenido/av_bma/apuntes/T3/hibridac.htm
 20/Febrero/2017 1:42am
47. Pérez A. M. Reacción en cadena polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Universidad Politécnica de Valencia. 2001
<https://riunet.upv.es/handle/10251/10700>
48. De Dios T, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción de cadena de polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad, 2013; 2(2): 70-78
49. Astudillo B. Diagnóstico Molecular del virus del Papiloma humano 2014, 8(1):64-69
50. Weissenborn S, Wieland u, Junk M, Fister P, Quantification of beta human papiloma virus DNA by real—time PCR. Nature Protocols 2010, 5(1): 1-12
51. Moreau F, Fetouchi R, Micalessi I, Brejeon V, Bacon N, Jannes G, Le Pendeven C, Lekbaby B, Kremodorf D, Sainty J.L SOUSSAN P. Detection genotyping of human papiloma virus by real time PCR assay. Journal of Clinical Virology 2013; 56:244-249
52. Innogenetics <https://www.yumpu.com/es/document/view/14679431/inno-lipa-somiccam>
 15/Marzo/2017 11:02pm
53. Innogenetics Biotechnology for healthcare, 2010 Pp.1-16

54. Ávila M, Genatios U, Blanch R, De Guglielmo Z, Fernández A, Veitía D, Correnti M. Genotipificación de Virus de papiloma Humano en mujeres con lesiones de cuello uterino. *Rev. Venez. Oncol.* 2013; 25(3):157-165
55. https://www.researchgate.net/figure/221923009_fig7_Fig-7-INNO-LiPA-HPV-Genotyping-test-principle-adapted-from-INNO-LiPA-brochure
14/ Marzo/2017 7:40pm
56. Galastri S. Donatelli M. HPV Metodiche molecolari e considerazioni su una casistica eterogenea. AITIC
<http://www.telesa.org/sites/default/files/corsoaitic2012/GALASTRI.pdf>
14/Marzo/2017 2:35am
57. https://www.researchgate.net/figure/233772693_fig1_Fig-1-Reverse-hybridization-on-LiPA-strips-for-the-identification-of-the-HPV-L1-plasmid15/marzo/2017 12:30pm
58. Da Penha M, Busolotti F, Rossi L.M, Adreoli M.A, Oliveira N. Comparative Study between biopsy and brushing sampling methods for detection of human papillomavirus in oral and oropharyngeal cavity lesions. *Braz J. Othorinolaryngol* 2015; 81(6):598-603
59. Gómez S, Molina B, Nevarez-Rascon R.E, Rocha B.A. Prevalencia del VPH en el proceso de malignización de lesiones de vías aerodigestivas superiores. *Int J. Odontostomat* 2011; 5(1):5-12
60. Farfán J. Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. *Rev. Mes. Clin. Condes* 2013; 26(6):788-793
61. Rodríguez M. Diagnóstico molecular papilomavirus humano: nuevos desafíos en un escenario diferente. *Enferm. Infecc. Microbiolclin.* 2012; 30(5):223-224
62. Abreu A, Souza R, Giménes F, Consolaro M, A riview of methods for detect human papilomavirus infection. *Virology Journal* 2012; 9:262-268
63. Cortés E, Leal C, Papilomavirus humano. Biología molecular y patogénesis. <http://www.respyn.uanl.mx/ii/2/ensayos/papiloma.html>

23/Marzo/2017 7:34pm.

64. Gutiérrez G., Sánchez S., Golzarri A., Ramírez A., Hernández C. Evaluación de protocolos de biología molecular en la asignatura de bioquímica de la facultad de odontología, Universidad Nacional Autónoma de México. Rev. Odont. Méx. 2014; 18(2): 120-127
65. González A. J., Biología molecular y su aplicación en odontología. Acta bioclínica 2011; 1(2):1-2
66. De Guglielmo Z, Ávila M, Veitía D, Fernández A, Venegas, Correnti de plata M. Detección de VPH en boca y cervix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital. An. Sist. Sanit. Navar. 2012; 35(3): 445-454