

336427



**UNIVERSIDAD DEL
VALLE DE MEXICO**

CAMPUS CHAPULTEPEC
ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
INCORPORADA A LA UNAM

“EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH):
INDUCTOR EN EL DESARROLLO DE CANCER
CERVICOUTERINO (REVISION BIBLIOGRAFICA
ACTUALIZADA)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

RUTH ALEJANDRA DÁVALOS ESPINOSA
DIRECTOR: Q. F. B. GERARDO GARCIA CAMACHO

MEXICO, D.F.

2004

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A MI BISABUELA PORQUE DIO EL PRIMER PASO PARA QUE YO ESTUVERA AQUI.

A MIS ABUELOS, CARMELA Y RAUL, QUE ME PUSIERON EL EJEMPLO DE COMO LUCHAR PARA MEJORAR.

A MIS PADRES QUE ME APOYARON EN TODO MOMENTO Y EN ESPECIAL A MI PAPA QUE SIEMPRE HA CREIDO EN MI.

A MIS HERMANOS, PAOLA Y OSCAR, PORQUE SIEMPRE HAN SIDO Y SEGUIRAN SIENDO MI APOYO.

A LIZ PORQUE ME FORTALECE CON LA GRAN AMISTAD QUE SIEMPRE HEMOS FORJADO. GRACIAS HERMANA.

A DIEGO, IVAN CRUZ, BEGOÑA, PILAR, MONSI, GONZALO, GERARDO Y BARBARA PORQUE HICIERON DE MI ESTANCIA EN LA UNAM, UNA GRAN EXPERIENCIA.

A MARISELA, SOCORRO, SANDRA, ERIKA PALMEROS Y CAROLINA POR HABERME BRINDADO SU AMISTAD.

A ERIKA SANCHEZ, ROSA, ANDREA Y GABY POR SER GRANDES AMIGAS.

A LA FAMILIA GARCIA CORONA PORQUE ME APOYARON Y CREYERON EN MI.

A LALO PORQUE SIEMPRE SERA MI AMIGO Y APOYO.

A IVAN PORQUE SIEMPRE ME HA AYUDADO A DESCUBRIR LO BUENO Y MALO DE MI.

A TODOS MIS TIOS, EN ESPECIAL A LULU, HUMBERTO, SONY Y VERO PORQUE ME APOYAN SIEMPRE.

A MIS PRIMOS QUE SON COMO MIS HERMANOS: EBE, ABI, CARO, VIVI, VANE, VALERIA, VITO, CESAR Y JORGE.

A TODOS LOS MAESTROS QUE ME AYUDARON A SABER LO QUE SE. EN ESPECIAL A MAGDALENA ACOSTA, RUTH MARTIN, ADRIANA MEJIA, GERARDO GARCIA CAMACHO Y JAVIER ARAIZA DE QUIEN ADMIRO SU PASION POR LO QUE HACE.

A ISRAEL, MARIANA, KARINA, PACO, HIROMI, GABY, SANDRA, ALEX, CECILIA Y LORENA POR COMPARTIR BUENOS MOMENTOS EN LA UVM.

INDICE

Indice.....	3
<u>Introducción</u>	6
<u>Objetivos</u>	8
<u>1. Características</u>	9
<u>1.1 Retrospectiva</u>	9
<u>1.2 Clasificación</u>	13
<u>1.3 Composición y propiedades generales</u>	14
<u>1.4 Tipos de VPH</u>	16
<u>1.5 Métodos de transmisión</u>	17
<u>1.6 Respuesta del sistema inmune</u>	18
<u>1.7 Efectos de agentes físicos y químicos</u>	20
<u>2. El VPH como factor predisponente para el cáncer cérvicouterino</u>	22
<u>2.1 Cáncer</u>	22
<u>2.2 Cáncer cérvicouterino y VPH</u>	28
<u>2.3 Factores de riesgo</u>	31
<u>2.4 Otras lesiones relacionadas con VPH</u>	32
<u>3. Manifestaciones clínicas</u>	37
<u>3.1 Citología del epitelio cervical</u>	37
<u>3.2 Patogenia</u>	40
<u>3.3 Patología</u>	47
<u>3.4 Oncogénesis</u>	51

<u>4. Métodos de diagnóstico utilizados para la detección del VPH</u>	58
<u>4.1 Colpocitopatología</u>	58
<u>4.2 Histopatología</u>	64
<u>4.3 Inmunohistoquímica</u>	66
<u>4.4 Biología molecular</u>	69
<u>4.4.1 PCR</u>	70
<u>4.4.2 Hibridación molecular <i>in situ</i></u>	72
<u>4.4.3 Captura híbrida</u>	75
<u>4.4.4 Southern blot</u>	78
<u>4.4.5 Dot blot</u>	80
<u>4.5 Microscopía electrónica</u>	81
<u>5. Tratamiento y profilaxis</u>	83
<u>5.1 Tratamientos</u>	83
<u>5.1.1 Químicos</u>	84
<u>5.1.1.1 Ácido tricloroacético</u>	84
<u>5.1.1.2 5-Fluorouracil (5-FU)</u>	84
<u>5.1.1.3 Podofilina</u>	85
<u>5.1.1.4. Acido salicilico</u>	86
<u>5.1.1.5 Formalina y glutaraldehido</u>	86
<u>5.1.2 Quirúrgicos</u>	87
<u>5.1.2.1 Excisión con tijeras, bisturí y curetaje</u>	87
<u>5.1.2.2 Light Amplification by Stimulates Emission of Radiation (LASER)</u>	88
<u>5.1.2.3 Electrocirugía</u>	90

<u>5.1.2.4 Crioterapia</u>	92
<u>5.1.3 Estimuladores de la inmunidad</u>	92
<u>5.1.3.1 Imiquimod</u>	92
<u>5.1.3.2 Retinoides</u>	93
<u>5.1.3.3 Interleucina-2</u>	94
<u>5.1.3.4 Isoprinosine</u>	96
<u>5.1.3.5 Interferón</u>	96
<u>5.2 Vacunación</u>	98
<u>Apéndice 1: Diagrama de diagnóstico y tratamiento para infecciones por VPH</u>	101
<u>Discusión</u>	104
<u>Conclusiones</u>	106
<u>Bibliografía</u>	107

INTRODUCCION

Los papilomavirus se clasifican dentro del género *Papillomavirus* de la familia *Papovaviridae*. Este grupo de virus induce tumores en piel y mucosa, lo que explica su nombre que viene del Latín *papilla* que significa teta, pústula y del sufijo griego -*oma* que significa tumor. Lo más importante de este grupo es que un número importante de papilomavirus inducen tumores que eventualmente progresan a carcinomas.^{1,2,3}

Es de especial interés el Virus del Papiloma Humano (**VPH**) que ha sido aislado de lesiones tumorales como *Verruca vulgaris*, *Verruca plantaris*, Condilomas, Papiloma conjuntival, entre otros. Cuenta con al menos 80 tipos.^{4,5,6}

Antes de finales de los setentas, el mayor interés en las infecciones por **VPH** se enfocaba a las verrugas genitales o condiloma acuminado; posterior a estos años, y con la intervención de la microscopía, se describió la coilocitosis (efecto citopático del **VPH**, usualmente presente en los condilomas acuminados) en las lesiones planas epiteliales, uniendo al **VPH** con las lesiones precancerosas de cérvix y, en general, de la mucosa genital.

Además de ser considerada una enfermedad de transmisión sexual¹, las infecciones por **VPH** son de gran importancia, ya que tipos específicos de **VPH** genitales juegan un papel decisivo en la patogénesis de los cánceres epiteliales de los tractos genitales femeninos y masculinos. Los tipos de alto riesgo asociados con malignidad son el 16, 18, 45 y 56 mientras que los tipos 31, 33 y 35 son considerados de riesgo intermedio.

Con el paso del tiempo, desde su descubrimiento como factor de riesgo de carcinomas hasta el momento, la infección por **VPH** ha aumentado su incidencia y ha sido

asociada a otras infecciones como la producida por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Así, el cáncer cérvicouterino es una de las principales causas de mortalidad en la mujer en el mundo.

En México, se ha observado un aumento en la detección de la infección por **VPH** y el cáncer cérvicouterino ocupa junto con el cáncer de seno, las tasas de mortalidad más altas por cáncer en la mujer.

Se ha observado que la implantación de programas de información y estudios preventivos, como la técnica de Papanicolaou, pueden frenar el desarrollo de lesiones precancerosas por medio del tratamiento oportuno como lo han demostrado algunos países nórdicos.^{7,8,9,10}

Hay factores socioeconómicos que deben de considerarse para la implementación de campañas de vacunación. La información es uno de los factores más importantes para que estas tengan éxito, sobre todo campañas dirigidas a madres y a sus hijas adolescentes brindando información acerca de la etiología y riesgo del cáncer.¹¹

La importancia de estos antecedentes justifican que realicemos una revisión bibliográfica de los avances médicos y científicos relacionados con la vacunación, patogénesis e implicación en el desarrollo de malignidades del **VPH**.⁶³

OBJETIVOS

a. General

- Recopilar información actualizada sobre el virus del papiloma humano (**VPH**) en México y el mundo.
- Documentar la asociación del **VPH** y el desarrollo de cáncer cérvicouterino.

b. Particulares

- Definir el estado epidemiológico actual del **VPH** en México y en el mundo por medio de la búsqueda de información en artículos y bases de datos.
- Precisar los avances en materia de profilaxis del **VPH** y el impacto que tienen sobre la población.
- Analizar y organizar la información obtenida para elaborar un manual de consulta para el uso del Químico Clínico y personas relacionadas con el área clínica.

1. Características del VPH

1.1 Retrospectiva

Las verrugas genitales ya eran conocidas y descritas por los griegos y romanos. La rápida diseminación de la sífilis en Europa durante finales del siglo XV, renovó el interés por las enfermedades venéreas, atribuyéndole entonces una etiología común: veneno venéreo. Estas verrugas se relacionaron con la sífilis, no distinguiendo el condiloma acuminado de la lesión pápulo verrucosa presente en la sífilis secundaria.

Posteriormente, las verrugas genitales pasaron a ser relacionadas con la gonorrea. Tal idea fue refutada por el hecho de que en pacientes sin historia de gonorrea había presencia de verrugas genitales. Además al aislar a *Neisseria gonorrhoeae*, se demostró que más de la mitad de los pacientes con verrugas genitales no estaban infectados por la bacteria.

En el siglo XIX, se creía que la razón de las lesiones era la irritación causada por flujos genitales, poco aseo u otro agente y ésto no pudo ser confirmado hasta principios el siglo XX.

La naturaleza viral de las verrugas humanas fue descubierta en 1907 por Ciuffo en su trabajo "Innesto positivo con filtrato di verruca volgare".^{12,13} Experimentalmente se inocularon extractos de verrugas en la piel de varias áreas del cuerpo, causando el desarrollo de verrugas planas o comunes.

En 1925, Hans Hinselmann desarrolló el primer colposcopio, siendo pionero en reconocer la importancia de este estudio en Alemania.

El primer papiloma virus fue aislado por Richard Shope en 1933.²

Independiente a estos hechos, el virus del papiloma humano (**VPH**) permaneció sin estudiarse hasta el desarrollo de la virología molecular en los años setentas. Esto se debe a que el **VPH** no prolifera fácilmente *in vitro*. Gran parte del conocimiento actual, acerca de este agente, se desarrolló a partir del virus del papiloma bovino (VPB).

La etiología viral de las verrugas no genitales fue demostrada por varios autores a partir de 1949, a través de la identificación, por medio de microscopía electrónica, de partículas esféricas virales intranucleares en las capas superficiales de la epidermis. Sin embargo, pocos estudios se habían realizado sobre las verrugas genitales. La información obtenida mediante la microscopía electrónica era confusa, siendo la etiología viral incierta.

Una evidencia importante surge en 1954, a través del estudio de la alta frecuencia de verrugas en pene en soldados veteranos de la guerra de Corea y Japón que tuvieron relaciones sexuales con mujeres nativas. En un período de entre cuatro y seis semanas después del regreso de los soldados, sus parejas desarrollaron verrugas genitales. Teokharof y Oriel concluyeron en su estudio epidemiológico, que las verrugas genitales son una enfermedad venérea de etiología viral, independientes a las verrugas no genitales, corroborado por un estudio de Oriel, en el que hay una prevalencia semejante de las verrugas vulgares en un grupo de pacientes con verrugas genitales y en un grupo control.

Hasta 1970, Mirador y Almeida, identificaron partículas virales intranucleares, semejantes a las encontradas con las verrugas vulgares, en 13 de 25 verrugas genitales examinadas. Debido a la pequeña cantidad de virus obtenida, no era posible hacer los análisis necesarios, más el patrón de distribución intranuclear y el tamaño aproximado de las partículas sugería ser **VPH**.

Hasta 1978, se consiguió definir partículas morfológicamente idénticas al **VPH** en células infectadas, a partir del estudio de cortes histológicos de lesiones condilomatosas. La

confirmación de la presencia de **VPH** ocurrió en 1980 por la identificación de antígenos por la técnica peroxidasa-antiperoxidasa.

Aunque la etiología específica del condiloma se aclaró hace poco tiempo, el cuadro histopatológico fue descrito hace décadas, mostrando alteraciones estructurales y citológicas, estas últimas caracterizadas por la atipia coilocítica (vacuolización perinuclear, acompañada de hiperchromia y aumento de volumen nuclear). La vacuolización de las células epiteliales fue objeto de estudios, intentando relacionar la presencia o desarrollo de lesiones precancerosas o cancerosas.

Papanicolaou y Casas-Cordeiro y colaboradores, describieron en 1954, la presencia de halos perinucleares en lesiones del condiloma acuminado, resaltando que estas células podían ser confundidas con células malignas.¹⁴

En 1949, Ayre describió alteraciones celulares que llamaron "precancer cell complex". Según el autor, tal célula sería un intermediario entre el estado inflamatorio y el estado de malignidad. Tales alteraciones son las mismas que Koss y colaboradores observaron en 1956 y definieron como " atipia coilocítica", por considerar incorrecta la denominación de célula precancerosas, dado que en el estudio se observó la tendencia de regresión de algunas lesiones. El término coilocito, se origina del griego " *koilos* ", que significa cavidad.

En 1960, Ayre describió mejor las alteraciones celulares y fué el primero en mencionar la posibilidad de un efecto viral citopático en la transición de las células normales a células malignas o displásicas.

Girolami, Meisels, Casas-Cordeiro y colaboradores describieron el halo perinuclear como una alteración intranuclear, causada por la cervicitis crónica y aguda, especialmente por *Trichomonas vaginalis* y la atipia coilocítica como una alteración intracitoplasmática perinuclear de etiología probablemente viral como manifestación de marcada displasia.

Hasta antes de 1976, la infección por **VPH** era relacionada casi exclusivamente al condiloma acuminado, considerada una enfermedad genital externa y de la región perianal, observada raramente en el cérvix y no se relacionaba con los coilocitos. Meisels y colaboradores describieron los patrones citológicos de las lesiones condilomatosas del cérvix y vagina que incluía el aumento de volumen de los keranocitos con bi o multinucleación, hiperchromia y halo perinuclear, relacionándolos directamente con la atipia coilocítica del condiloma acuminado y, en consecuencia, con la infección por **VPH**.

En 1977, Meisels y colaboradores, al correlacionar los efectos citopatológicos, colposcópicos y los resultados histopatológicos de las lesiones condilomatosas cervicales y vaginales de pacientes con diagnóstico citopatológico previo de lesiones condilomatosas, observaron una discrepancia entre los resultados. En este trabajo, el autor describe la lesión subclínica para **VPH** clínicamente menos evidente que el condiloma acuminado y, por tanto, poco visible colposcópicamente pero, citológicamente, exhibía las mismas características de la lesión en la infección clínica.

A partir de 1978, se estableció claramente la relación entre la infección de **VPH** y las lesiones genitales precancerosas como las neoplasias intraepiteliales de cérvix, vagina, vulva, ano y pene, además del carcinoma escamoso invasivo. ¹⁴

1.2 Clasificación

Los virus se clasifican de acuerdo a las características estructurales y bioquímicas como lo son el tipo de ácido nucleico, la configuración o simetría, la presencia o ausencia de envoltura lipídica, el tamaño del virión, la cantidad de capsómeros, la estabilidad del virión frente a los tratamientos químicos y físicos.

La clasificación se da de la siguiente manera:

- **Orden:** se designan por nombres con los sufijos – *virales*. Hay tres órdenes virales *Mononegavirales*, *Caudovirales* y *Nidovirales*.
- **Familia y subfamilia:** Las familias virales se designan por nombres con el sufijo – *viridae*. Las subfamilias se nombran con el nombre y el sufijo – *virinae*. Las subfamilias se crearon solo para algunas familias cuya taxonomía era muy compleja como lo es la familia *Herpesviridae* entre otras familias.
- **Género:** formado por especies de virus. El nombre se compone por un término seguido del sufijo – virus.
- **Especies**

El Virus del Papiloma Humano está clasificado dentro del género *Papillomavirus* de la familia *Papovaviridae*. Los virus del poliovirus forman el segundo género de la familia *Papovaviridae*, diferenciándose del papilomavirus por ser de cápsida más pequeña y DNA más corto.¹⁵

La familia *Papovaviridae* infecta a vertebrados. Son pequeños virus (45-55 nm), carentes de envoltura, termoestables, resistentes al éter y que muestran simetría cúbica con 72 capsómeros. El genoma es circular con DNA. Estos agentes presentan un ciclo de

crecimiento lento, estimulan la síntesis de DNA celular y se reproducen en el núcleo. Los papovavirus producen infección crónica y latente en huéspedes animales.¹⁶

Los papilomavirus son estrictamente específicos a la especie que infectan y se nombran de acuerdo a su hospedero.^{2,5,17,18}

Dentro de los papilomavirus se encuentran el Virus del papiloma humano, el papilomavirus del bovino, el papilomavirus de Shope de conejos, el papilomavirus oral de conejos, entre otros.¹⁹

1.3 Composición y propiedades generales del VPH

Los VPH son partículas icosaédricas desnudas de 55 nm de diámetro que contienen solo DNA y proteínas, mostrando una densidad de flotación en CsCl de 1.34 g/cm³.

Su peso molecular es de 5×10^6 daltons

El DNA es de doble cadena que, en sus extremos, está unido por enlaces covalentes, lo que le proporciona una forma circular y consta de aproximadamente 8000 pares de bases.⁵

Infecta al epitelio escamoso y columnar, sobre todo si hay alguna lesión traumática.^{4,13}

Las proteínas del virión representan el 88 % de la masa de la partícula.^{15,19} Está constituido por 2 proteínas tardías, L1 y L2 que juntas comprimen la cápside y 7 u 8 proteínas tempranas, E1 a E8.^{1,20}

La cápside está formada por 72 capsómeros distribuidos en forma icosaédrica.^{1,2}

El DNA vírico tiene 8 genes tempranos - E1-E8 - y 2 genes tardíos - L1 y L2 (**Fig. 1**). Los genes E1 al E8 dirigen la replicación viral. Son de especial atención los genes E6 y E7 que, en los tipos de VPH denominados de alto riesgo, juegan un rol crítico en el desarrollo del carcinoma cervical.^{2,13,18,21}

La proteína L1 es la proteína estructural en mayor proporción y puede ensamblarse en partículas parecidas a virus. La proteína L2 esta en menor proporción y tiene propiedades de unión a DNA necesaria para el ensamblaje de viriones infecciosos maduros. Se calcula que el radio de L1:L2 es aproximadamente de 30:1. ¹

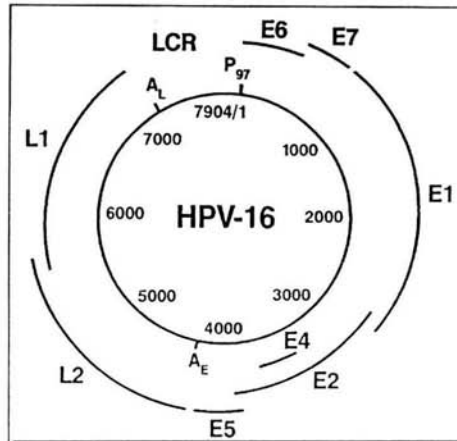


Fig. 1: Mapa genómico del **VPH 16**. Los genes son designados de E1 a E6 y L1 a L2 (Shan KV y Howley PM 1990)

El genoma del **VPH** también codifica para 7 u 8 proteínas tempranas no estructurales que se expresan en células epiteliales infectadas. Algunas de estas proteínas facilitan la replicación del episoma viral (E1 y E2), mientras que otras regulan la proliferación de las células infectadas. ^{2,17,20}

El **VPH** replica en el núcleo de las células que infecta produciendo dos efectos:

- una intensa acción lítica
- se integra al genoma celular, pudiendo originar mutaciones que posteriormente se traducirían en alteraciones fenotípicas y/o genotípicas.

Son parásitos estrictos de las células epiteliales . Estos agentes permanecen localizados y producen lesiones en el sitio de entrada ya que la capa epidérmica esta desprovista de vasos sanguíneos y fibras nerviosas. ^{5,16}

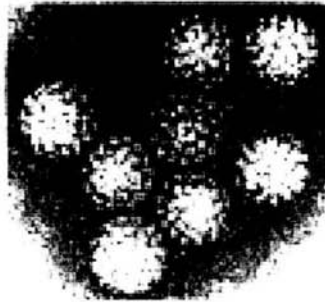


Fig. 2: Micrografía electrónica de una tinción negativa de una verruga común: partículas maduras de **VPH** de una verruga común (Schiller JT. 1999).

1.4 Tipos de VPH

El criterio previo para clasificar a dos tipos de **VPH** se basaba en la homología que comparten entre su DNA. Si el DNA de dos tipos de **VPH** demuestran menos del 50 % de homología, se clasifican como diferentes tipos. Si la homología del DNA es de más del 50% pero menos del 100 % se consideran como subtipos o variantes del mismo tipo de **VPH**. ⁴

Esto fué revisado a principios de los noventas, acordándose que la clasificación se base en la secuenciación directa de ciertas regiones del genoma viral como las secuencias de los genes E6, E7 o L1. ^{2,17,18,22,23}

Se han caracterizado más de 80 distintos tipos de **VPH** y varios subtipos de cada uno de éstos, por lo que el número se eleva a más de 95. ^{5,24}

Más de 30 tipos de **VPH** han sido reconocidos como agentes infectantes de la mucosa anogenital en ambos sexos. ^{22,25,10}

Los **VPH** se pueden dividir en tres grupos basados en su potencial oncogénico:

- Bajo o nulo potencial oncogénico: incluye a los tipos 6 y 11.^{23,26}
- Potencial oncogénico medio: incluye a los tipos 31,33,35,51 y 52.^{1,5,21,22,26,27}
- Alto potencial oncogénico: Incluye a los tipos 16, 18, 45 y 56.

El **VPH 16** es el genotipo que más se detecta en el cáncer de cérvix alrededor del mundo en un 50-70 %, seguido por el **VPH 18** en un 10-20 %.^{10,26}

Se ha encontrado una relación etiopatogénica definida de ciertas lesiones con tipos específicos de **VPH**, así las verrugas vulgares se han relacionado con los tipos 2, 4 y 7, las verrugas palmoplantares con los tipos 1, 2 y 4, las verrugas planas con el tipo 3, las verrugas anogenitales con los tipos 6 y 11, el tumor de Buschke-Löwenstein con el tipo 6, la enfermedad papulosa bowenoide con los tipos 16,18,31,33 y 51 y la epidermodisplasia verruciforme con los tipos 3,5,8,9,10,12,14,17-29,38 y 47.

Además se ha encontrado que en portadores del Virus de Inmunodeficiencia Humana, las verrugas planas generalizadas y lesiones similares a pitiriasis versicolor se han asociado con los tipos 5 y 8 y el carcinoma escamocelular anogenital con los tipos 6,11,16 y 18.²⁸

1.5 Métodos de transmisión

Las vías de transmisión del **VPH** se dividen en sexuales^{5,17} y no sexuales, siendo la primera la más común.¹

La transmisión sexual causa, primariamente, infección genital aunque también se ha asociado a infecciones anales y bucales.¹⁷

La transmisión no sexual se clasifica en transmisión familiar y nosocomial causadas por fomites (toallas, ropa íntima, etc.) y por instrumental ginecológico y quirúrgico.

Además el **VPH** puede transmitirse vía materno-fetal intra o periparto²⁸ pudiendo ser una ruta importante para la diseminación del virus.⁵ Este modo de transmisión podría explicar como el virus gana acceso en la mucosa oral así como a las vías respiratorias superiores, donde se ha hallado **DNA-VPH** en tumores benignos y malignos.²⁶

El **VPH** infecta células epiteliales escamosas y columnares. El virus parece ganar acceso a la porción baja del epitelio en áreas de trauma local y luego infecta a las células del epitelio basal. El trauma local también se asocia con el desarrollo de nuevas lesiones.

4,17,28

El cérvix es el sitio de infección genital más común pues hay una constante exposición de las células proliferativas de la zona escamocolumnar.¹⁷

1.6 Respuesta del sistema inmune

La respuesta clínica a la infección por **VPH** es una lesión que persiste mucho más de lo que le tomaría a un hospedero inmunocompetente montar una respuesta inmune a una infección viral sistémica.²⁹ Esto nos habla de que el virus posee características de evasión al sistema inmune.

El rango de mecanismos disponibles en un huésped mamífero para el reconocimiento y eliminación de los virus de DNA son considerablemente más limitados que aquellos disponibles para los virus de RNA, pues el proceso de replicación del genoma vírico asemeja al de la célula hospedera. Esto es cierto para los pequeños virus de DNA como los papilomavirus, los cuales utilizan factores de control de la transcripción del hospedero. Las defensas no específicas parecen tener una contribución mínima en la regulación de la infección por papilomavirus siendo las respuestas específicas las capaces de llevar a cabo un control del hospedero sobre la infección viral.

La extensión en la cual los pacientes desarrollan verrugas visibles es influencia de la respuesta inmune del hospedero hacia el virus. A pesar de que las infecciones por **VPH** ocurren en una gran proporción de la población, sólo una minoría tiene síntomas visibles, y un número más pequeño desarrolla una severa o recurrente enfermedad. La observación clínica de que las infecciones por **VPH** son muy comunes en pacientes inmunosuprimidos sugiere una base inmune para el control natural de estas infecciones.³⁰

El contacto sexual no produce verrugas genitales en todos los casos por lo que parece ser que la inmunidad celular u otros factores locales influyen decisivamente en la transmisión del virus; además, al no observarse estado de contención en individuos con deficiencia de linfocitos T, sugiere que la inmunidad celular desempeña un papel importante en la defensa del hospedero contra **VPH**. La respuesta humoral verificada en algunos pacientes con regresión de verrugas sugiere que los linfocitos B también ejercen influencia en el proceso de combate a la infección, pero con menor importancia.¹⁰

La expresión viral activa puede inducir la producción de factores supresivos que retardan la respuesta inmune. Una de las posibles explicaciones para esto, parte de que la oncoproteína viral codificada por el gen E7, presente en el interior de las células infectadas, es capaz de reducir la expresión de los antígenos de histocompatibilidad (HLA), localizados en la superficie celular.

Las evidencias de la importancia de la inmunidad celular en el control de las infecciones por **VPH** son:

- aumento de incidencia durante la gravidez.
- aumento de frecuencia en trasplantes e inmunocompromiso.
- aumento de frecuencia y de gravedad así como las recidivas en individuos HIV positivos.²⁸

Las infecciones con casi todos los genotipos de papilomavirus inducen una respuesta de anticuerpos específicos a la cápside viral, medidas como anticuerpos contra epítopes conformacionales presentes en proteínas L1.²⁶ Estos anticuerpos son detectados relativamente tarde en el curso de la infección, 3 a 12 meses después de que el DNA del papilomavirus se observa en tejidos infectados.²⁰

1.7 Efectos de agentes físicos y químicos

Efectos a agentes físicos

- Temperatura : llegan a una inactivación directa a temperaturas por encima a la del cuerpo humano (38.5 ° C) y causar una depresión en la acción del virus.
- pH: las proteínas que forman el virus pueden llegar a precipitarse al alcanzar el punto isoeléctrico.
- Radiaciones: Los rayos ultravioletas (UV) provocan en el ácido nucleico del virus dímeros de timidina. Los gamma provocan que los dobles enlaces de las proteínas se modifiquen en cuanto a su estructura. Los rayos X provocan que los ácidos nucleicos modifiquen su estructura tridimensional.

Efectos a agentes químicos

- Concentración de sales: el aumento de la concentración de sales causa que gran parte del agua que normalmente solvataría a las proteínas, esté enlazada en las capas de hidratación de numerosos iones salinos, impidiendo una hidratación suficiente de las proteínas y disminuyendo su solubilidad.
- Formalina o formol: se forman enlaces cruzados en las proteínas.
- Óxido de etileno: actúa como agente oxidante.
- β-mercaptoetanol: actúa como agente reductor de los puentes disulfuro.

- Fotodinámica: por medio de colorantes de ácidos nucleicos, como el naranja de acridina o el bromuro de etidio, se inactivan, pues estos colorantes se incorporan al ácido nucleico y, al exponerse a los rayos solares, se modifican las estructuras.
- Solventes: como el éter que causa deshidratación de la cápside.⁸

2 El VPH como factor predisponente para el cáncer cérvicouterino

2.1 Cáncer

La carcinogénesis está influida por la edad, el estado endocrino, la dieta, otros agentes exógenos (cocarcinógenos y/o promotores) y el estado inmunológico.

La carcinogénesis es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células que da lugar a una neoplasia y la posterior adquisición, por estas células, de capacidad invasiva que les permite diseminarse desde su sitio natural en el organismo y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (proceso conocido como metástasis).

Si sólo tiene lugar un aumento del crecimiento de un grupo de células en el lugar donde normalmente se hallan, se habla de un tumor benigno, que generalmente es eliminable completamente por cirugía. (Fig. 3)

CELULAS MALIGNAS



Fig. 3: Crecimiento de células malignas.

Por el contrario, cuando las células de un tumor son capaces de invadir los tejidos circundantes o distantes, tras penetrar en el torrente circulatorio sanguíneo o linfático y formar metástasis, se habla de un tumor maligno o cáncer. (Fig. 4)

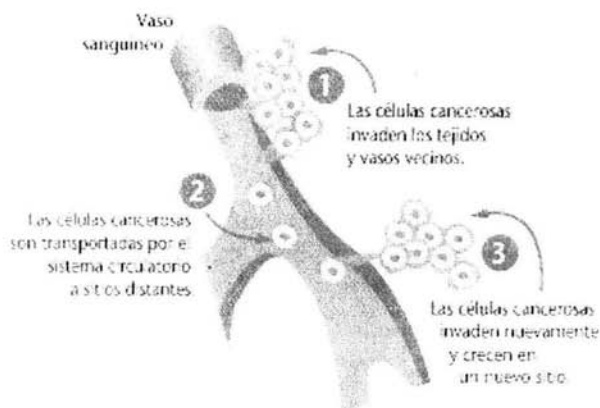


Fig. 4: Diseminación por el torrente sanguíneo de células malignas.

Las células proliferan aumentando su masa o tamaño y duplicando y segregando sus cromosomas, para posteriormente dividirse en dos células hijas que son genéticamente iguales. La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del organismo.

Todas las células de un tumor, benigno o maligno, derivan de una sola célula, es decir, los tumores son *monoclonales*. El proceso de formación de un tumor, a partir de una célula, implica la acumulación sucesiva de alteraciones en las células durante un período de tiempo. Este es el proceso de *progresión tumoral*, que se compone de cambios genéticos (mutaciones) y selección progresiva de células cada vez más anormales en su crecimiento y comportamiento, adquiriendo la capacidad de invadir el tejido circundante y, posteriormente, de originar metástasis.

El 90% de los tumores son generados por células epiteliales (*carcinomas*). Los otros tipos mayoritarios de cánceres son derivados de células del tejido conectivo o muscular (*sarcomas*), de la sangre (*leucemias, linfomas, mielomas*), o de células del sistema nervioso (*neuroblastomas, gliomas*). Las células epiteliales son las que mantienen, durante más tiempo de la vida del individuo, la capacidad de dividirse. Por otro lado, debido a su localización, recubriendo las superficies externas e internas del organismo, las células epiteliales están más expuestas a la acción de agentes de todo tipo que alteren su comportamiento.

La primera fase de un tumor es la alteración de la capacidad de proliferación de una célula como resultado de una mutación en uno de los genes que la controlan. Es la *iniciación* y al agente que la causa se le llama *iniciador*. Esta célula "iniciada" crece con una velocidad ligeramente superior a las normales y puede pasar inadvertida durante un período muy largo.

El aumento de la incidencia del cáncer provocado por la repetida exposición a un carcinógeno de cualquier tipo indica la necesidad de mutaciones sucesivas. Sin embargo, es también posible aumentar la incidencia de cánceres por tratamiento con sustancias que no producen mutaciones: los *agentes promotores tumorales*. Estos actúan modificando los productos de genes implicados en el control de la proliferación celular, de modo que su papel es colaborar con la mutación iniciadora y sólo causan cáncer cuando actúan de modo repetido tras el carcinógeno iniciador. Es la segunda fase, *promoción*, durante la cual el agente promotor estimula el crecimiento de las escasas células iniciadas que, con una sola mutación, tenían ligeramente alterado su crecimiento. Este aumento de células con una mutación favorece la posibilidad de que alguna de ellas acumule una nueva mutación que la haga crecer aún más deprisa, ya que la división celular aumenta el riesgo de adquirir mutaciones. El humo del tabaco contiene

numerosas sustancias que son iniciadores o promotores tumorales: benzopirenos, nicotina, naftilaminas, fenoles, etc.³⁸

La tercera fase es la *progresión* tumoral o adquisición de nuevas alteraciones genéticas que provocan un aumento de la malignidad, con adquisición de capacidad invasiva y metastásica, siendo esta última la causa del fallo de los tratamientos y de la muerte de los pacientes con cáncer.

La capacidad de formar metástasis se basa en la adquisición de invasividad por las células del tumor primario. La invasividad es, por tanto, la característica esencial del cáncer. La progresiva acumulación de mutaciones, probablemente en una secuencia específica para cada tipo celular, origina primero una hiperplasia o crecimiento desordenado y luego invasividad celular, vascularización o angiogénesis y, finalmente, metástasis.

La invasividad incluye a su vez varios procesos: pérdida de la adhesión celular, degradación de la matriz extracelular (en el caso de los epitelios, la lámina basal) y movilidad. Todo ello permite a las células infiltrarse en el tejido que las rodea, al mismo tiempo que conservan una elevada habilidad para multiplicarse. Este proceso de invasión ocasiona, por tanto, la diseminación local de las células tumorales.

El crecimiento de un tumor, tanto primario como secundario, mayor de 5-10 mm de diámetro, requiere su vascularización. Sin la cercanía de vasos sanguíneos, las células tumorales no sólo no pueden diseminarse, sino que mueren por deficiencia de nutrientes y oxígeno y falta de eliminación de anhídrido carbónico, ácido láctico y otras sustancias de desecho, debido a que los intercambios por simple difusión no alcanzan a las células internas del tumor. La angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de otros pre-existentes, es fundamental tanto al comienzo como al final del proceso de carcinogénesis.

Una vez en la cercanía de los vasos, las células tumorales deben atravesar sus paredes para acceder a la circulación sanguínea o linfática, que en todo caso, están conectadas.

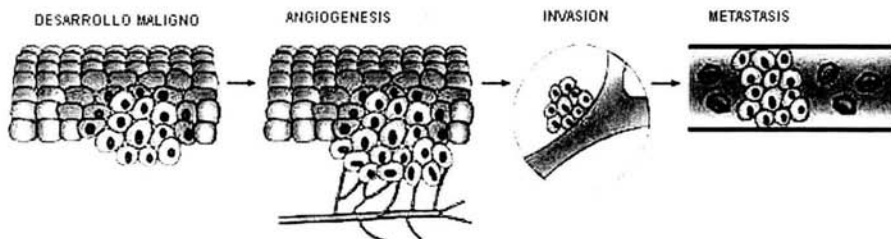


Fig. 5: Invasividad de un crecimiento maligno

Durante este proceso, las células deben soportar deformaciones que dependerán de la rigidez de las paredes y la disparidad entre su propio diámetro y el del vaso. Ya en el torrente sanguíneo (generalmente los sarcomas) o linfático (los carcinomas), las células tumorales deben sobrevivir al ataque del sistema inmune, adherirse a la pared de los vasos en una región distante y extravasarse. El establecimiento de metástasis por las células tumorales que han conseguido alcanzar la circulación sanguínea o linfática es un proceso afortunadamente muy poco eficiente. Se ha estimado que menos de un 0,05% de ellas lo consiguen.¹²

Hay dos tipos de genes en los cuales se puede perder el control del crecimiento celular:

- Los genes que estimulan el crecimiento celular.
- Los genes que inhiben el crecimiento celular.

Los virus se involucran en el desarrollo del cáncer porque pueden poseer una copia de cualquiera de estos genes o pueden inclusive alterar la expresión celular de éstos.

Hay dos tipos de oncovirus: los que contienen DNA y los que contienen RNA. Estos tienen formas muy diferentes de replicarse pero también tienen en común un factor en su ciclo replicativo: la habilidad de integrar su genoma en el genoma celular.

Así, cuando un virus se establece en una célula, a ésta se le denomina célula transformada. La transformación es un cambio en la función biológica de la célula que resulta de la regulación celular por genes virales, incluyendo generalmente pérdida en el control del crecimiento celular, habilidad invasiva y diferenciación así como aberraciones cromosómicas.

La región, en el genoma viral, capaz de inducir las neoplasias se le denomina oncogen. Estos descubrimientos llevaron a encontrar la existencia de proto-oncogenes celulares presentes en todas las células, que a su vez permitieron descubrir a los genes de supresión tumoral.

En 1979 se descubrió un gen conocido como p53, cuya función es parar la replicación cuando el DNA es alterado por alguna mutación.

El p53 es un factor de transcripción. Este se une a sitios específicos en los cromosomas y estimula a otros genes que a su vez detienen la mitosis. También puede estimular la apoptosis.

2.2 Cáncer cérvicouterino y VPH

El cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en nuestro país, sólo después de las enfermedades del corazón.^{31,32,33,34}

El cáncer cérvicouterino representa la segunda entidad nosológica más importante en todo el mundo dentro de las neoplasias malignas que afectan a la mujer, superada solamente por el cáncer mamario.^{2,17,35,36} Las tasas más altas de cáncer cérvicouterino se reportan actualmente en México y Centroamérica.^{11,37,38} Al analizar las tasas de mortalidad por cáncer cérvicouterino en diferentes países, se observa que la variación de la mortalidad es notable con tasas que llegan a ser ocho veces más altas en los países de alto riesgo en Latinoamérica, el sudeste asiático y África, respecto a algunas naciones de Europa, Japón y Australia.³²

En Uganda se ha observado un aumento en la tasa en la incidencia de cáncer cérvicouterino con 16.5 casos por 100,000 mujeres en 1964, 22.81 entre 1968-70 y 35.31 en 1993.³

La incidencia de cáncer cérvicouterino en México entre 1975 y 1992, con base en las estadísticas de la Secretaría de Salud, presentó una tendencia ascendente, con una tasa de 9.72 por 100,000 mujeres al principio del período, y de 42.99 en 1992.³² Para el año 2001, se calculó una tasa de 44.4 casos por 100,000 mujeres.³⁷

En 1997 se registró una tasa de mortalidad de 14.8 por 100,000 habitantes en México por cáncer cérvicouterino y ocupó el tercer lugar en frecuencia como causa de muerte por tumores malignos en la mujer.^{33,39}

En la actualidad se considera como el cáncer de mayor incidencia entre las mujeres mexicanas.³⁷

Año	Tumor maligno de mama	Tumor maligno de cuello uterino
1998	3405	4545
1999	3460	4590
2000	3503	4620

Tabla: comparación de número de defunciones por año de las dos neoplasias más frecuentes que afectan a mujeres en México⁴⁰

La comprobación del rol de diferentes carcinógenos potenciales en la etiología del cáncer cervical ha cambiado la concepción de esta patología, siendo enfocada en la actualidad como una enfermedad de transmisión sexual.^{18,41}

Diferentes agresores tienen un papel importante en el desarrollo de este proceso de carcinogénesis, entre los más relevantes están el tabaquismo y el **VPH** que parece ser la causa central del desarrollo de cáncer cérvicouterino.²⁶ La inmunosupresión parece ser un factor de riesgo importante.²⁸

La incidencia de verrugas genitales causadas por la infección por **VPH** se ha incrementado en las últimas décadas. En E.U.A. e Inglaterra, la aparición de estas verrugas se ha elevado de 2.5 a 8 veces. En América Latina, la incidencia de condiloma acuminado se elevó de 13 a 106 casos por cada 100,000 habitantes entre 1950 y 1970. Se han hecho estudios y la aparición de DNA-**VPH** en mujeres con citología normal varía entre 3.7% y 47.9%.²⁸

Se estima que del 30 % al 50 % de la población sexualmente activa están infectados por **VPH**, a pesar de que sólo el 1% tienen verrugas genitales visibles.³⁰

La asociación entre la infección por **VPH** y cáncer cérvicouterino es muy importante, ya que este último es una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. El control de las infecciones por este virus podría ser la esperanza para frenar la tasa de mortalidad por esta causa.

A pesar de que casi todas las infecciones por **VPH** son benignas, hay evidencia que apuntan a una fuerte asociación entre las infecciones con ciertos tipos de **VPH** y algunos cánceres anogenitales, de los cuales el más común es el cáncer cérvicouterino. En particular, el hecho de detectar DNA de **VPH** en el 90-95 % de los cánceres invasivos cervicales y en neoplasias cervicales intraepiteliales nos indica una conexión etiológica entre **VPH** y neoplasia.^{2,3,10,1418,25,35}

Los estudios muestran que algunos de los tipos genitales de **VPH**, los tipos de alto riesgo como el 16, 18 y el 35, codifican para proteínas (E6/E7)^{1,34,36} fuertemente asociadas con el ciclo celular y la estabilidad genómica. La progresión de la displasia de leve a severa y a cáncer invasor está asociada con el incremento en la expresión de los oncogenes virales. La influencia de diversos factores predisponentes en la progresión de lesiones benignas a malignas no está muy claro aunque hay estudios que apuntan a la predisposición genética (polimorfismo del gen p53) e inmunidad celular.^{42,43}

El genoma viral se integra al genoma del hospedero de una manera que propicia el incremento de la producción de E6 y E7, los genes asociados con la actividad transformante. La asociación entre **VPH** y el cáncer cérvicouterino es reforzada por el hallazgo de que los tipos de **VPH** más frecuentemente detectados en lesiones malignas cervicales son aquellos que muestran actividad transformante en líneas celulares.

Los individuos que desarrollan una infección recidivante y que no mejoran espontáneamente, pueden desarrollar la enfermedad en forma persistente por un largo período de tiempo y, en el caso de infección por grupos de alto riesgo, desarrollar a neoplasia intraepitelial cervical.^{67,68,69}

2.3 Factores de riesgo

La detección de los factores de riesgo para adquirir la infección por **VPH** es importante para identificar la población de riesgo predispuesta al desarrollo de lesiones precursoras de cáncer y poder aplicar medidas preventivas para evitar el desarrollo de éste.

La probabilidad de adquirir la infección por **VPH**, así como los factores de riesgo son predominantemente relacionados con el comportamiento sexual.^{5,37,44}

La influencia de otros factores en el desarrollo de lesiones por **VPH** (como el fumar o los anticonceptivos orales) son menos claros.³⁴

Casi independientemente de la población estudiada, se han clasificado en 5 categorías a los factores de riesgo para el desarrollo de la infección por **VPH**:

- Comportamiento sexual.⁷
- Hábito de fumar (tanto por acción directa de la nicotina al actuar en el rol de molécula inductora de cambios a nivel de las células epiteliales, como por su relación con disminución de la inmunidad celular. Además el benzopireno y benzantraceno son sustancias cancerígenas del humo del cigarro).^{26,28}
- Historia reproductiva.¹⁰
- Factores nutricionales.
- Inmunosupresión.⁶

Siendo estos mismos factores los que predisponen a la mujer a desarrollar cáncer cérvicouterino y sus precursores.^{5,17,32,39,45}

Infecciones por algunos tipos de **VPH** están asociadas con ciertos tipos de constitución genética del portador. La epidermodisplasia verruciforme es una rara enfermedad genética asociada con un defecto en la rama celular del sistema inmune, aumentando la susceptibilidad a infecciones cutáneas con ciertos tipos de **VPH**.^{17,32,45}

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana al relacionarse con un estado de inmunocompromiso es un factor de riesgo importante para el desarrollo de infecciones persistentes por **VPH** y por lo tanto para la progresión neoplásica.³¹

Recientes estudios han señalado la participación en este proceso maligno de otros microorganismos como es el caso de *Chlamydia trachomatis*.^{3,7,34,41,27,10}

2.4 Otras lesiones relacionadas con VPH

En el hombre

Cualquier lesión anogenital, sea papilomatosa, papular, pigmentada, eritematosa o macular, puede ser causada por **VPH**. Las lesiones clínicas son habitualmente multifocales o multicéntricas, manifestándose como papilomas vegetantes, pedunculadas o sésiles. Pueden ser papulares y coalescer, formando placas que ocupan grandes áreas.

Una lesión individual generalmente tiene 1-4 mm de diámetro, sin embargo, a veces, puede tener varios centímetros de diámetro y presentarse como condilomas gigantes o tumor de Buschke-Löwenstein.

Otras lesiones clínicas asociadas a **VPH** en genitales masculinos son:

- Papulosa Bowenoide: se presenta como lesión genital externa con neoplasia intraepitelial severa. Aparece en adultos jóvenes como lesiones menores a 1 cm, eritematosas, de color violáceo o también como pápulas acastañadas.
- Eritroplasia de Queyrat: se encuentra, en general, en hombres de 40-50 años y se presenta como lesión única, numular, de aspecto eritematoso

Las lesiones causadas por **VPH** en el hombre pueden afectar el tracto genitourinario desde los genitales externos hasta el tracto urinario superior y región perianal. El pene es la región anatómica más frecuentemente afectada.²⁸ La circuncisión disminuye el riesgo de infección por **VPH**.^{10,13}

La prevalencia de la infección por **VPH** es significativa en la población masculina. Mas; sin embargo, no se ha definido de forma determinante, la asociación de la infección por **VPH** y los tumores en el aparato genitourinario masculino. Así el hombre, en el aspecto clínico, debe verse como reservorio⁵ del virus y un agente perpetuador de la infección en sus parejas.^{28,46}

Ignorando las causas del desarrollo de cáncer, entre 1998 y el año 2000, un 0.29 % de las defunciones en México a causa de neoplasias en hombres son debidas a cáncer en pene y el 15.7 % de las defunciones a causa de neoplasias en mujeres son debidas a tumores malignos en cuello uterino.

Pediatría

Niños y adolescentes infectados por **VPH** son considerados de riesgo para el desarrollo de neoplasias anogenitales. La transmisión de **VPH** a niños puede ocurrir por transmisión materna (gestación o parto), auto-inoculación y por heteroinoculación (contacto no sexual de tipos cutáneos o genitales por miembros de la familia infectados, fomites y a través de contacto sexual voluntario o no).²⁸

El **VPH** puede estar presente en algunas enfermedades del área de la otorrinolaringología. Las lesiones asociadas a **VPH** están localizadas en mucosa oral, faringe, laringe, mucosa nasal y, a veces, en tráquea.

La papilomatosis recurrente de laringe es una proliferación benigna de tipo papilar que se puede presentar de forma grave, comprometiendo vías aéreas superiores y, a veces, inferiores, desembocando a insuficiencia respiratoria de importancia y compromiso funcional. Se asocia principalmente a una contaminación de vías respiratorias de recién nacidos por madres portadoras de **VPH** durante la gestación o en el parto.^{13,26}

La transformación cancerosa es posible pero rara.

En boca pueden desarrollarse condilomas que están fuertemente relacionados con los hábitos sexuales orales.¹³

Las localizaciones faríngeas son asintomáticas, pudiendo presentar expectoraciones hemáticas. La base de lengua y esófago son localizaciones excepcionales.

La localización bronquial y pulmonar se debe principalmente a la infección debida a procedimientos quirúrgicos como la traqueotomía. Generalmente se presenta de forma agresiva, siendo responsable de estrés respiratorio y, a veces, de cuadros de asfixia.

La mucosa de la cavidad nasal es de origen ectodérmico, por lo que facilita el desarrollo de papilomas que pueden ser clasificados como fungiformes, invertidos y mixtos. Los papilomas fúngicos están localizados en la parte anterior del septo nasal y los invertidos en la pared lateral de la nariz.²⁸

Proctología⁵

Las lesiones se localizan frecuentemente en la región perianal y área extragenital. La asociación entre verrugas genitales y anales es más común en mujeres. Las lesiones anales pueden ser secundarias a las genitales y ser causadas por auto-inoculación o por sexo anal. En hombres, la localización exclusivamente anal es típica de homosexuales masculinos.²⁸

Dermatología

Las verrugas cutáneas incluyen a las verrugas comunes (*Verruca vulgaris*), las verrugas plantares y a las verrugas planas. Hay lesiones cutáneas en placa y maculares que ocurren en un raro desorden autosomal llamado Epidermodisplasia verruciforme (EV) y ocasionalmente en pacientes inmunocomprometidos.

Las verrugas comunes se localizan principalmente en áreas expuestas como manos y rodillas donde hay abrasiones que faciliten que el virus entre a la epidermis.

Las lesiones características son de uno a cinco milímetros de diámetro, circunscritas, de apariencia rugosas.¹³

Además de los factores endógenos del hospedero, las condiciones de su medio ambiente favorecen el desarrollo de las lesiones como es el caso de las verrugas del carnicero que por la permanente humedad y la utilización de herramientas de trabajo entre varias personas (cuchillos y tablas para cortar) son factores que permiten la propagación del virus. Morderse las uñas, chuparse el dedo y otros factores de comportamiento permiten que las verrugas se extiendan.

Las verrugas plantares son aquellas que aparecen en palmas de la mano y plantas del pie.

Las verrugas planas son lesiones ligeramente elevadas del nivel cutáneo, más pequeñas que las verrugas comunes con superficies planas, suaves y bordes irregulares. Generalmente son del tono de la piel pero pueden tener un ligero pigmento café o gris. Se localizan principalmente en el dorso de la mano o en la cara siendo más comunes entre niños y en mujeres jóvenes.

La EV es un raro desorden cutáneo caracterizado por la infección cutánea persistente por **VPH** que se manifiesta por la diseminación de lesiones parecidas a verrugas planas y máculas eritematosas hiper e hipopigmentadas localizadas en cara y en la superficie extensora de extremidades inferiores y superiores así como en el tronco.

La EV es una enfermedad multifactorial que involucra factores genéticos, inmunológicos y extrínsecos así como tipos específicos de **VPH**.

La consanguineidad, la deficiencia en la inmunidad celular y la localización usual de cánceres cutáneos en áreas expuestas sugieren lo anterior.^{13,17,47}

3. Manifestaciones clínicas

3.1 Citología del epitelio cervical

La epidermis está compuesta de células epiteliales escamosas estratificadas. Las células epiteliales de la epidermis están sostenidas juntas, en gran parte, por puentes que se entrelazan – desmosomas - los cuales son responsables de la integridad de la piel.

La epidermis se compone de cinco capas que de la superficial a la profunda son: el estrato córneo (capa córnea), estrato lúcido (capa transparente), estrato granuloso (capa granular), estrato espinoso (capa espinosa) y estrato germinativo (capa basal).

El estrato córneo forma la capa más externa de la epidermis y consta de restos de células epiteliales anucleadas aplanadas parecidas a escamas y cubiertas por queratina. Sirve como barrera dando protección mecánica y química. El espesor de esta capa es determinado por la cantidad de estimulación de la superficie mediante abrasión y peso que soporta.

El estrato lúcido está situado inmediatamente abajo del estrato córneo. Es una capa que tiene una o dos células de espesor, consta de células aplanadas transparentes que junto con la capa córnea forman la capa cornificada.

El estrato granuloso consta de dos o tres capas de células aplanadas que contienen gránulos y sustancias oleosas. Mantienen las capas superiores flexibles y sirve como barrera para líquidos corporales.

El estrato espinoso consta de varias hileras de células de forma poligonal interconectadas por puentes intercelulares. Las células tienen gran núcleo que va disminuyendo de tamaño a medida que son más superficiales. En medio de los puentes hay corpúsculos o

desmosomas – engrosamientos locales constituidos por las membranas plasmáticas en sus superficies de unión – que dan la apariencia de espinas.

El estrato germinativo contiene las únicas células de la piel capaces de efectuar división mitótica. Esta constituida por una o dos hileras de células cilíndricas, con núcleo ovalado que ocupa casi toda la célula. Cuando las nuevas células son formadas sufren cambios morfológicos y nucleares a medida que se mueven hacia la capa más superficial. La epidermis se regenera sólo mientras el estrato germinativo permanezca intacto. La capa basal descansa en la membrana basal.

La membrana basal es una delgada hoja de tejido que separa a la dermis de la epidermis. Regula cambios celulares y moleculares entre estas dos áreas y juega un papel importante en la recuperación de heridas. Esta capa puede ser penetrada por tumores malignos y es aquí donde comienza la diseminación de éstos. (Fig. 6)

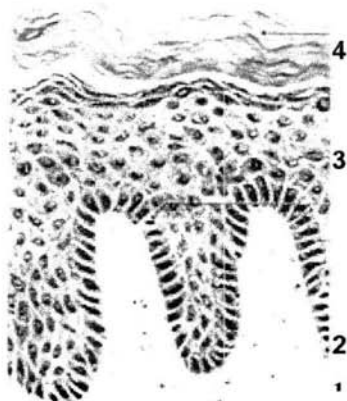


Fig. 6: Capas que componen la epidermis: 1. Membrana basal; 2. Capa basal; 3. Estrato espinoso; 4. Estrato córneo (Schultz E, 1992).

La dermis esta situada inmediatamente debajo de la epidermis y se compone de tejido conectivo que contiene fibras elásticas y colágena, vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos, folículos pilosos y glándulas sudoríparas.

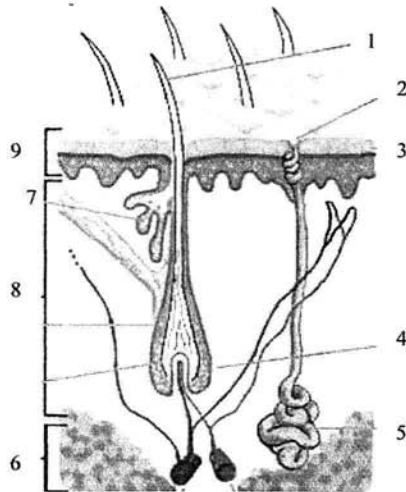


Fig. 7: Componentes del sistema tegumentario: 1: Vello, 2: Poro, 3: Estrato córneo, 4: Folículo piloso, 5: Glándula sudorípara, 6: Tejido subcutáneo, 7: Glándula sebácea, 8: Dermis, 9: Epider

En un frotis para citología se observan células basales, parabasales, intermedias y superficiales.

Las células basales son pequeñas, de núcleo grande, de citoplasma escaso y homogéneo. Las células parabasales son de mayor diámetro, redondas u ovales, la relación núcleo citoplasma es 1:3. En estos dos tipos de células se observan puentes intracelulares.

Las células intermedias no tienen puentes intracelulares, son redondeadas u ovales, contienen glucógeno y su relación núcleo citoplasma es 1:5.

Las células superficiales son de mayor tamaño, de forma poliédrica y citoplasma abundante y transparente. Por su núcleo se dividen en cariopícnóticas y no cariopícnóticas. La relación núcleo citoplasma es 1:7.

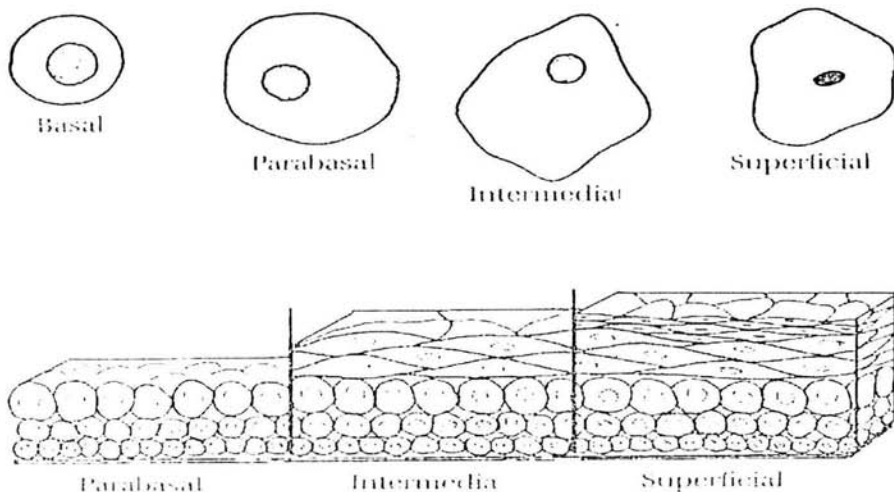


Fig. 8: Diferentes tipos de células que se pueden observar en una citología exfoliativa cervicovaginal (Adaptado de Atkinson's correlative atlas of colposcopy, cytology and histopathology 1987)

3.2 Patogenia

La transmisión de las infecciones por **VPH** parece depender del acceso del virus en las células epiteliales capaces de dividirse. Las únicas células con estas características en el epitelio escamoso son aquellas de la capa basal. Así que, probablemente, las infecciones por **VPH** ocurren debido a la exposición de las células basales a partículas infecciosas virales como resultado de traumas menores del epitelio como, por ejemplo, la interacción sexual.^{5,17}

Se cree que la infección inicial por **VPH** en el epitelio escamoso requiere que el virus se encuentre como virión completo. Una vez que entra al hospedero, los pasos de la

patogénesis viral hacia las células blanco individuales incluyen la adsorción, penetración, desnudamiento, transcripción, replicación, ensamblamiento y liberación. Los detalles de muchos de estos pasos son poco entendidos.

La replicación del **VPH** está fuertemente acoplada a la diferenciación del epitelio cervical. La infección inicial ocurre en la capa basal de células no diferenciadas. En esta etapa, sólo proteínas tempranas son sintetizadas.⁴⁸

La síntesis de las proteínas tempranas es apagada, mientras las células avanzan a través del epitelio y se diferencian.²

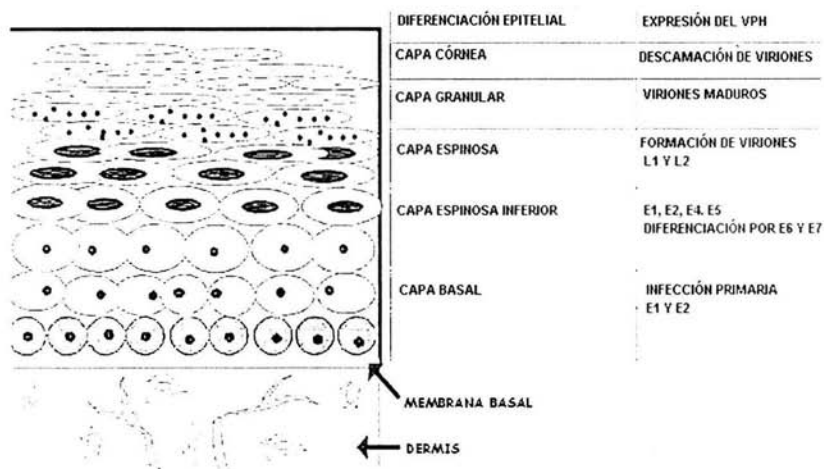


Fig. 9: Expresión de las proteínas de **VPH** a través de la diferenciación celular del epitelio.

Pasos en el ciclo replicativo del VPH⁴⁹

A. Unión a través de un receptor específico: los virus, típicamente, se unen a las células mediante un receptor específico en la superficie de la célula. Generalmente, los receptores virales son moléculas que se proyectan a cierta distancia de la superficie celular, permitiéndole tener contacto fácilmente con los virus. Pueden utilizar glicoproteínas de superficie, componentes de la matriz extracelular y receptores involucrados en la activación y comunicación celular. En el caso del VPH se ha estudiado a la integrina $\alpha_6\beta_4$ como posible receptor específico del VPH.

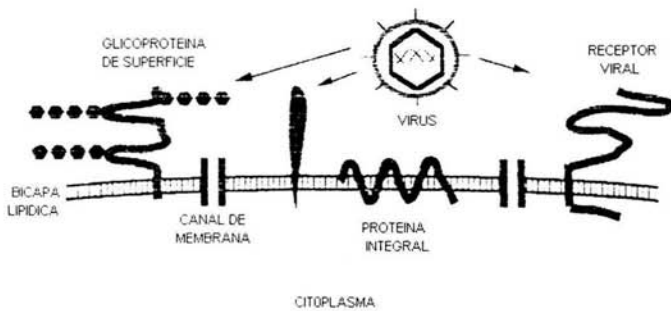


Fig. 10: Revisión general de la unión de un virus a su célula blanco. Para cada tipo de virus hay un receptor específico al cual se unirá para entrar a su célula blanco. Estas generalmente son glicoproteínas de superficie.

La integrina $\alpha_6\beta_4$ se expresa exclusivamente en la capa de células basales del epitelio escamoso estratificado donde se cree que inicia la infección por VPH. La expresión de este dímero se apaga en cuanto inicia la diferenciación celular.

La integrina $\alpha_6\beta_4$ es parte integral de la hemidesmosoma y está implicada en la interacción de las células epiteliales con la membrana basal.

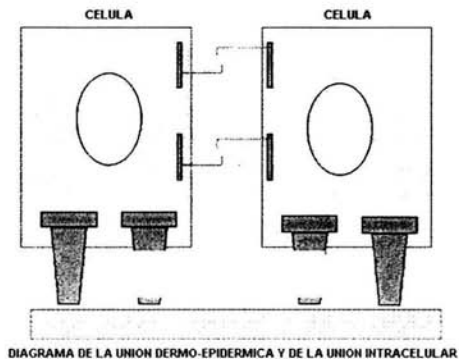


Fig. 11: Los hemidesmosomas son elementos básicos de unión entre las células epidérmicas del estrato basal y el conjuntivo dérmico, a través de la membrana basal.

La subunidad α_6 está presente a lo largo de la superficie de las células basales y en algunas células de la capa suprabasal, mientras que β_4 se localiza en la reserva de células basales.^{50,51}

- B. Entrada: esto requiere que el virus atraviese la bicapa lipídica que rodea la célula, sin destruir a ésta.
- C. Desnudamiento: una vez adentro, el virus debe desensamblarse, de modo que la información genética y cualquier enzima asociada permanezcan intactos, además, que el ácido nucleico viral y sus enzimas asociadas sean dirigidos al compartimento celular adecuado que, en el caso del **VPH**, es el núcleo.
- D. Replicación y producción de las proteínas virales: casi todos los virus codifican sus propias DNA polimerasas pero no es así en el caso de los virus del papiloma. Esto conlleva a que el **VPH** necesita para su proliferación células que se dividan activamente pues utiliza las DNA polimerasas celulares.

El **VPH** replica su propio material genético de su cadena circular en forma bidireccional. Utilizan un origen específico de replicación de DNA (*ori*) que sirve como punto de inicio para la replicación bidireccional del DNA. La replicación tiene un intermediario con forma de letra griega teta que puede ser vista por microscopía electrónica.

- **Proteínas tempranas:** controlan las fases siguientes del ciclo de replicación. El **VPH** produce 8 proteínas tempranas. Entre sus propiedades más importantes están:
E1 y E2 intervienen en la replicación de DNA. E2 es una proteína que se une al DNA, que regula la transcripción viral y promueve la unión de E1 al sitio de origen de la replicación.
E4 no se ha encontrado función en la replicación viral o transformación
E5 Parece tener potencial oncogénico en los tipos de **VPH** de alto riesgo, altera la expresión del complejo mayor de Histocompatibilidad clase I y la presentación de antígeno, afecta en la comunicación célula-célula.
E6 promueve entrar a la fase G1 del ciclo celular y favorece la degradación de p53. Inhibe la diferenciación celular, incrementa la integración del DNA del huésped.
E7 coopera con E6 para transformar a las células, inactiva a pRB y varias ciclinas.
E5, E6 y E7 inducen transitoriamente la síntesis de DNA del hospedero para proveer el medio ambiente y macromoléculas esenciales para la replicación del DNA viral.
E3 y E8 no se conoce su función.^{2,10,20}
- **Proteínas tardías:** el **VPH** produce dos proteínas estructurales., L1 y L2, que son sintetizadas en el epitelio superficial próximo a la exfoliación y son ensamblados en cápsides que encierran el DNA viral.

E. Ensamblamiento y liberación : las partículas virales pueden liberarse de las células mediante lisis celular o por gemación de las membranas celulares. Ambos procesos llevan consigo cambios en las membranas celulares, lo que generalmente se observa in vitro, como parte del efecto citopático inducido por los virus.⁵² No hay mecanismos especiales para la liberación de los virus sin envoltura; con el tiempo, las células infectadas sufren lisis y liberan las partículas del virus.¹⁶ Esto se acompaña por un colapso de la célula, inducido por otra proteína viral, E4.

Las células infectadas no son capaces de diferenciarse normalmente debido a:

- Interferencia funcional de las proteínas reguladoras del ciclo celular, causada por la expresión de los genes virales (por ejemplo, interferencia entre **VPH 16 E6** con la proteína celular p53).
- Sobreproducción de E5, E6 y E7.

Cuando esto ocurre, la síntesis del DNA del hospedero continua sin supervisión y lleva a una rápida división de células no diferenciadas con características morfológicas de neoplasia. Se piensa que la acumulación de rompimientos cromosomales, rearrreglos, deleciones y otras mutaciones genómicas llevan a las células a tener capacidad invasiva y, por último, a la malignidad.⁵

Cuando una lesión avanza de bajo a alto grado, ocurren alteraciones en la relación huésped-hospedero y el virus de forma episomal (circular) pasa a forma lineal, incorporándose en el DNA de la célula epitelial.¹⁷ En este proceso parecen estar involucradas las proteínas E1 y E2, que se separan, permitiendo el aumento de las proteínas E6 y E7, llevando a una transformación neoplásica (inhibiendo el antioncogen p53²³), manteniendo el genoma viral lineal e incorporado al DNA de la célula hospedera.

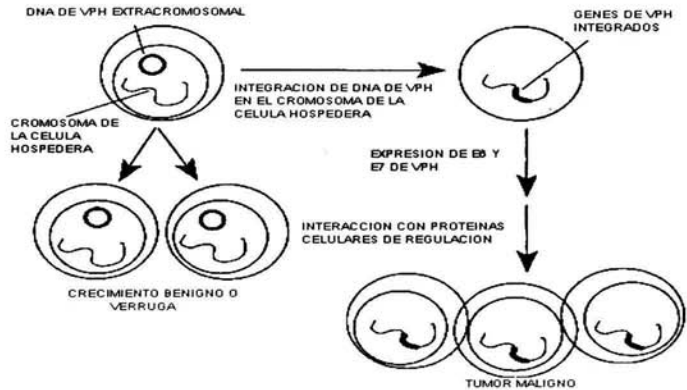


Fig. 12: Estado del genoma viral en la infección por **VPH** (Adaptado de Molecular Biology of the cell 1989).

Por motivos aún desconocidos, las proteínas E6 y E7 de subtipos de bajo grado no son capaces de transformar a las células *in vitro*.⁴⁸

En cuanto ocurren estos cambios a nivel molecular, también se ven alteraciones a nivel morfológico. El aumento de la actividad mitótica parece ser un marcador altamente predictivo de la transformación neoplásica y de aneuploidia.²⁸

La inoculación efectiva del **VPH** depende de la susceptibilidad del individuo y la viabilidad del virus. Los factores que influyen en la infectividad del **VPH** son: el número de partículas virales en la lesión, el grado de exposición de las lesiones y los mecanismos específicos de defensa del huésped.¹⁷

3.3 Patología

Después de establecida la infección por **VPH**, dos vías son factibles:

- Persistencia en células basales y parabasales del genoma viral en forma latente sin cambios aparentes en el epitelio blanco.
- Se puede establecer la infección activa de las células parabasales .

En este último caso, el **VPH** estimula la proliferación de las células basales (y la síntesis de las proteínas tempranas), llevando a la formación de lesiones epiteliales visibles, como una verruga.¹⁷ En la infección activa, el número de partículas virales se incrementa sustancialmente durante el ciclo de vida de las células epiteliales, hasta que la célula que contiene un gran número de viriones completos es exfoliada en la superficie epitelial. Como con otros muchos virus, se asocian efectos citopáticos y son estos efectos, los que crean cambios histológicos y citológicos típicos reconocibles como manifestaciones morfológicas de una infección por **VPH** visibles por microscopía.

En la revisión citológica, la infección por **VPH** se reconoce por la agregación de células epiteliales escamosas. La célula escamosa es densa, con condensación citoplásmica periférica. Los márgenes celulares son irregulares y la célula adquiere un forma redondeada u oval en contraste de la típica apariencia poligonal.

La transparencia citoplasmática generalmente se pierde. En la mayoría de los casos hay un halo perinuclear. El núcleo puede estar deformado y se encuentra generalmente a un lado del halo perinuclear. Grados diferentes de bi o multinucleación pueden estar presentes.⁵³

El **VPH** puede causar infecciones clínicas, subclínicas y latentes.

En una infección clínica, la lesión debe ser aparente por todos los métodos diagnósticos como la colposcopia, la detección de DNA de **VPH** o la biopsia. Una infección subclínica,

para algunos autores, son aquellas lesiones observadas después de la aplicación de ácido acético; para otros autores son aquellas lesiones que no son visibles en la inspección rutinaria, pero que se vuelven visibles en la colposcopia después de la aplicación de ácido acético y, que en la histología, contengan los cambios típicos inducidos por **VPH**. Si están correctamente categorizadas, todas las infecciones subclínicas por **VPH** deberían contener **DNA-VPH** cuando se someten a la hibridación o la reacción en cadena de la polimerasa.

Por definición, las infecciones virales latentes representan aquellos casos donde el genoma viral esta presente en el tejido blanco normal, entonces, hay una infección latente cuando se encuentra **DNA-VPH** en biopsias en las cuales, por todos los criterios histológicos, son clasificados como epitelio normal.

La displasia cervical es un término usado para describir el crecimiento anormal del tejido epitelial en la superficie del cérvix. La displasia también recibe el nombre de neoplasia cervical intraepitelial (CIN por su nombre en inglés: *cervical intraepithelial neoplasia*), la cual va de anomalías celulares medias (CIN I) a crecimientos precancerosos serios (CIN III), que pueden desembocar a cáncer cervical invasivo.⁴⁶

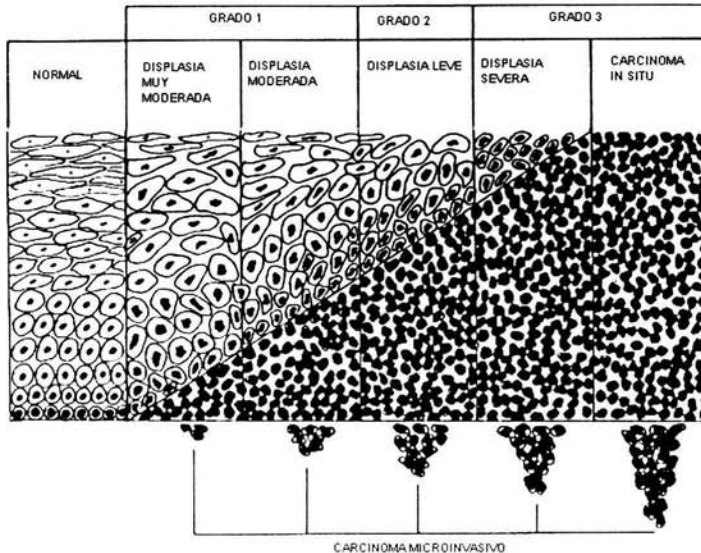


Fig. 13: La displasia va de anomalías celulares medias (CIN I) a crecimientos precancerosos serios (CIN III), que pueden desembocar a cáncer cervical invasivo (Blaustein A 1982).

Estos cambios parecen estimularse por la infección por **VPH** y representan los efectos citopáticos del virus en su ciclo replicativo. Los cambios morfológicos ocurren dada la habilidad del virus para interrumpir el ciclo celular, inducir poliploidia e inhibir la diferenciación citoplasmática funcional (produciendo vacuolización coilocítica degenerativa).

Las células hiperdiploides tienen incrementado su material nuclear y se manifiestan como células hiper cromáticas.

A nivel tisular, el cambio más importante es el atraso de la maduración progresiva a través de las capas verticales del epitelio normal y la expansión de la zona parabasal y suprabasal asociado con la presencia de coilocitos.

En las lesiones de bajo grado, las células suprabasales proliferativas atípicas no pueden ocupar estratos arriba del tercio bajo del grueso del epitelio, a través del cual los cambios citopáticos de la infección por **VPH** se encuentran en abundancia.

La presencia o ausencia de CIN se basa en la presencia de patrones celulares neoplásicos, morfológicamente reconocibles en la población suprabasal. La poliploidia en este tipo de lesiones es evidente por la bi, tri o multinucleación que es otro patrón importante en el epitelio infectado por el virus.⁵

Los hallazgos histopatológicos en el condiloma cervical muestran papilomatosis - superficie papilar - y acantosis que es un engrosamiento del epitelio. En los papilomas planos puede no haber superficie papilomatosa, pero si acantosis.

En las lesiones papilares y planas, la coilocitosis abarca desde la zona media del epitelio hasta la superficie. Esta coilocitosis presenta zonas citoplasmáticas claras, largas e irregulares alrededor del núcleo.

En la superficie, la coilocitosis debe ser uno de varios hallazgos, incluyendo paraqueratosis (una capa de pequeñas células queratinizadas), disqueratosis o hiperqueratosis.^{14,17} La disqueratosis se refiere a una placa de células con maduración nuclear anormal asociada con patrones inapropiados de queratinización citoplasmática. No es patognomónico de la infección por **VPH** porque suele aparecer como reacción superficial de otras lesiones como la hiperqueratosis, la neoplasia intraepitelial e inclusive el carcinoma invasor. Al teñir con la técnica de Papanicolaou, las células disqueratóticas frecuentemente se ven como un grupo de células con el citoplasma naranja, amarillo o rojo e hiper cromáticas, núcleo irregular y generalmente muestran signos de cambios degenerativos. También se puede presentar hiperqueratosis, reacción superficial que se identifica como una placa de células queratinizadas sin núcleo o con el núcleo reducido a

su mínima expresión y muy obscuro. A las células con estas alteraciones se les conoce como queranocitos.^{14,54}

3.4 Oncogenesis

El ciclo celular normal esta compuesto por 4 etapas:

1. Fase S (síntesis de DNA): replicación del DNA cromosomal
2. Fase M (mitosis): segregación del DNA cromosomal
3. G1
4. G2

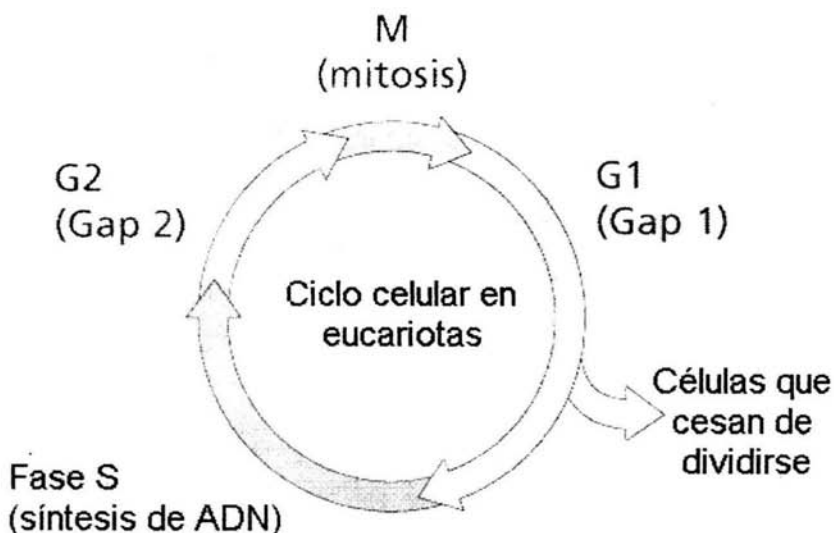


Fig. 14: Ciclo celular y sus cuatro fases (Gross GG y Barroso R, 1997).

Durante la fase G1 hay una oportunidad para salir del ciclo celular y a esta etapa se le llama G0.

El crecimiento y proliferación celular están coordinadas y reguladas por un grupo específico de factores celulares de crecimiento. Estos factores y nutrientes actúan durante las fases iniciales de G1, durante la cual la célula es muy sensible.

La coordinación de todos los procesos involucrados en el progreso del ciclo celular está controlado por un grupo de proteínas reguladoras llamadas cinasas ciclo-dependientes (CDKs). Son enzimas que fosforilan un amplio rango de proteínas vías inhibición o activación. Estas CDKs son activas a través de todo el ciclo celular, pero su actividad varía en fases específicas y depende de una unión no covalente con proteínas activadoras llamadas ciclinas. Estas son proteínas lábiles que aparecen por un breve periodo de tiempo durante ciertas fases del ciclo. Ciclinas específicas - nombradas de la A a la E - son producidas y asociadas con una CDK durante fases específicas del ciclo.

Las ciclinas no solo activan CDKs, también afectan su localización a nivel subcelular en la célula, ayudando al desplazamiento de estas del citoplasma al núcleo. Las ciclinas pueden ser rápidamente degradadas después de completarse el ciclo celular.

Factores de crecimiento se relacionan con la síntesis de las tres ciclinas D – D1, D2 y D3 – Estas se unen a CDK4 y CDK6 estimulando el inicio de la fase G1 del ciclo celular. Una de las ciclinas (ciclina D-CDK4) y CDK6 se unen a la proteína de supresión tumoral del retinoblastoma (pRB).

El gen RB se localiza en el cromosoma 13 y la pRB (105 kDa) está presente en complejos con el factor de transcripción E2F. Este factor de transcripción es una proteína que regula el gen de transcripción necesario para entrar en fase S del ciclo. En esta forma, el E2F en combinación con la pRB son inactivos, pero al fosforilar la pRB con las ciclinas D-CDKs resulta en la liberación de E2F y permite que el ciclo celular progrese. El complejo ciclina E-CDK lleva al ciclo a entrar en fase S mediante la fosforilación de las proteínas involucradas en la síntesis de DNA.

Una vez que el ciclo ha entrado en fase S, el complejo ciclina E-CDK se degrada rápidamente para ser reemplazada por la acumulación de ciclina A, cuyo rol es la regulación de la replicación de DNA y la progresión del ciclo celular a través de la fase G2 a fase M. La concentración del complejo ciclina B-CDK también juega un papel importante en la mayor parte de la mitosis, incluyendo la condensación cromosómica, rompimiento de membrana nuclear y la citocinesis.

Debe de haber una regulación interna para que la progresión del ciclo celular sea igualmente balanceada entre la acción positiva de las CDKs y la supresión de los Inhibidores de cinasas ciclo-dependientes (CKIs). Los inhibidores mas estudiados son el p16, p27 y p21. p16 se une específicamente a CDK4 y CDK6 y con esta acción previene la progresión de la fase G1. La producción de p27 depende de la actividad del factor B de crecimiento transformante (TGF-B) o por contacto célula-célula. Esta acción previene la proliferación celular después de que un contacto ocurre. También inhibe varios complejos ciclina-CDK, y su expresión está inducida por la p53 (proteína de supresión tumoral) que es producido como respuesta a daño a nivel de DNA. Hay altos niveles de p21 en células en la Fase G0.

Como resultado del daño de DNA hay una acumulación de p53, que causa que el ciclo celular se detenga transitoriamente, permitiendo así que la célula lo repare. Esto incrementa la expresión de p21, que inhibe una amplia gama de complejos ciclinas-CDK y puede probablemente detener el ciclo celular en cualquier etapa. Si se encuentra que el DNA tiene un daño irreparable, entonces p53 induce la expresión de otras proteínas que llevan a la célula a la muerte celular programada.

Cualquier alteración del p53 llevará a una replicación inadecuada de DNA dañado o una segregación cromosomal incorrecta durante la mitosis, que eventualmente puede llevar a

una transformación maligna debida a los efectos de la acumulación y propagación de errores en la secuencia de DNA.⁵⁵

Efecto de la interacción **VPH**-célula hospedera

Los cambios malignos en una célula son resultado de la acumulación de muchas mutaciones en los genes de control del ciclo celular. Estas mutaciones en genes regulatorios caen en dos categorías: a) alteraciones en mecanismos positivos de la proliferación y b) en la inactivación de los genes que controlan las señales negativas o de cese involucradas en el ciclo celular. Los genes involucrados en la progresión positiva progresiva del ciclo celular son llamados proto-oncogenes y una vez que han mutado, su expresión es activada durante la fase incorrecta del ciclo. Es cuando se llaman oncogenes, y se vuelven una fuerza incontrolada para la proliferación celular.

Otra forma de control en la regulación genómica involucra a la mutación inactivante de gen de supresión tumoral, el cual produce un efecto negativo en el ciclo celular. Cualquier interrupción en su función puede llevar a una proliferación incontrolada de la célula, como cuando ocurren mutaciones en el gen p53.

El **VPH** induce la neoplasia inactivando la proteína p53. El **VPH** debe replicarse en la célula hospedera y de algún modo interrumpe el mecanismo de síntesis de DNA removiendo el control en el ciclo celular. El daño de la p53 es inducido por la oncoproteína E6 del **VPH** 16 o 18, que incrementa el nivel de p53 reduciendo su destrucción. La unión de la proteína carcinogénica E6 inactiva la p53 y previene la vía normal de reparación de daño genómico y muerte celular programada (apoptosis) de la célula hospedera.

Además, la oncoproteína E7 del **VPH** 16 o 18 se une e inactiva la proteína de supresión tumoral del retinoblastoma (pRB) y a moléculas relacionadas, liberando el factor de transcripción E2F que juega un papel importante en la síntesis del DNA de la célula hospedera, así como en la del DNA viral.

La oncoproteína E7 también se une y activa otros complejos y estimula a la célula a salir de la fase G0 para entrar al ciclo celular, mientras que E6 remueve el mecanismo de apoptosis, el cual se activa cuando hay daño masivo en el DNA o una progresión celular fuera de control. El efecto combinado es un fenotipo mutante donde la célula entra en el ciclo celular constantemente e incorpora cualquier mutación espontánea que pueda ocurrir. Esto explica el largo pero variable desarrollo del carcinoma cervical, pues depende que ocurran mutaciones adicionales que permitan a células premalignas destruir la membrana basal, y migrar a través del cuerpo y hacer metástasis.

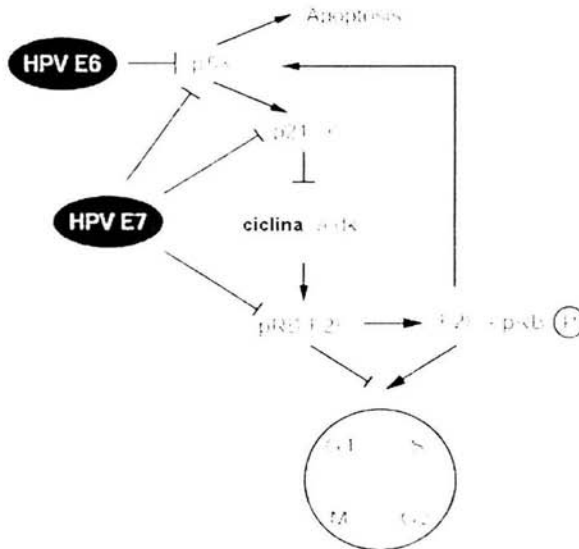


Fig. 15: Interacción de E6 y E7 en el ciclo celular. E6 interactúa con p53 impidiendo que se inactive la división celular si hay alteraciones en el DNA inhibiendo la apoptosis. E7 interactúa con pRB induciendo a la célula a dividirse continuamente (Singer A y Monaghan JM 2000).

Hay estudios que indican un incremento en la susceptibilidad de la proteína p53 a la degradación por E6 de tipos oncogénicos de **VPH** resultante del polimorfismo del codón 72 del gen p53 que lleva a la sustitución de arginina por prolina en el producto del gen. Esto indicaría que hay dos isoformas de p53 funcionalmente diferentes y proporcionaría un marcador para detectar a las mujeres con un riesgo alto de desarrollar cáncer cérvicouterino.

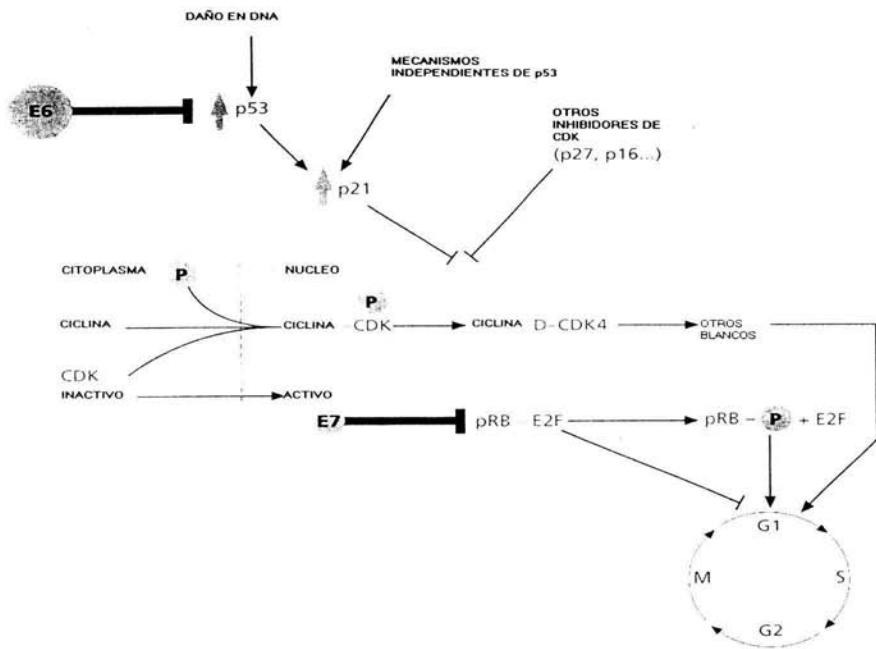


Fig. 16: Representación de los mecanismos celulares en los cuales intervienen E6 y E7 (Singer A y Monaghan JM 2000).

La expresión de E6 y E7 son necesarias para la immortalización de los queratinocitos y para mantener el fenotipo cancerígeno en la célula en los tumores asociados a **VPH**. En los carcinomas inducidos por **VPH** 16 o 18, E6 y E7 se expresan en abundancia en comparación con lesiones no asociadas a cáncer.

La proteína E2 al parecer no tiene un potencial oncogénico pero mantiene una sobreproducción de E6 y E7 a lo largo del ciclo celular.^{5,17,52}

4 Métodos de diagnóstico utilizados para la detección del VPH

Examinar la clínica es el primer paso para emitir el diagnóstico de infección por VPH. El médico se auxilia de aparatos como el colposcopio para visualizar las lesiones características causadas por este virus.

Las técnicas que generalmente se emplean en la detección de virus patógenos para el ser humano no se aplican en la detección rutinaria del VPH.

Se diagnostica detectando los efectos citopáticos causados por el VPH y/o la detección de su DNA.¹⁷

4.1 Colpocitopatología

Colposcopia

El uso del colposcopio ha encontrado expresión en el esfuerzo hacia el diagnóstico y manejo del cáncer cervical y lesiones relacionadas. Muchas lesiones intraepiteliales son ahora manejadas por métodos físicos como la criocirugía, terapia eléctrica o aplicación de láser, apoyándose en la colposcopia y evitando la histerectomía u otros métodos quirúrgicos que traían consigo complicaciones propias de las cirugías mayores.

La colposcopia permite al clínico apreciar la fisiología y patología del cérvix de una forma no alcanzada por otro método.

Un colposcopio es un aparato esencialmente integrado por lentes de aumento, iluminación de alta intensidad, vista estereoscópica y almacenamiento de imágenes. Un filtro verde es también de gran utilidad, pues la pérdida de intensidad de luz esconde

muchos aspectos morfológicos. El contraste ayuda en la observación de la configuración superficial y hay una disminución útil del reflejo de la fuente de luz.

Es importante tomar en cuenta que una adecuada preparación del cérvix es necesaria para la evaluación colposcópica. Hinselmann (1955) buscaba una solución mucolítica y encontró que el ácido acético en agua al 2 % - 4 % era adecuada. Además, esta solución provoca un cambio en el tono del color del epitelio, que es muy útil para categorizar los tipos de epitelio presentes.

Es recomendable aplicar solución salina para limpiar antes de la aplicación del ácido acético, hacer una revisión y posteriormente aplicar el ácido acético.

La aplicación del ácido acético provoca que el epitelio columnar y al epitelio anormal, se vuelvan edematosos. El epitelio anormal o atípico adquiere una apariencia opaca o blanca, fácilmente distinguible del epitelio normal, que tiene una apariencia rosada.

Frecuentemente el ácido acético se usa como fijador de tejidos pues penetra rápidamente en estos. Su efecto en el núcleo celular es precipitar las nucleoproteínas. El citoplasma se vacuoliza y la célula se hincha.

Cuando el ácido acético se aplica al epitelio normal escamoso, la penetración a través de la delgada superficie nucleada y las capas intermedias produce una escasa precipitación.

Las células parabasales y basales del epitelio contienen más nucleoproteínas, pero no las suficientes para opacar el color del estroma cervical con sus ricas redes de vasos subepiteliales, observándose en el epitelio una apariencia rosada.

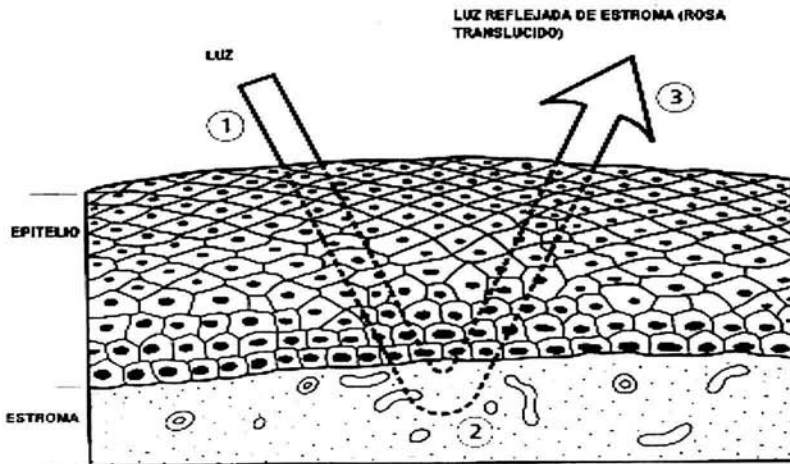


Fig. 17: Cuando en el epitelio normal escamoso no hay lesiones, la penetración del ácido acético a través de la delgada superficie nucleada y las capas intermedias no produce opacidad observándose en el epitelio una apariencia rosada (Singer A y Monaghan JM 2000).

Cuando el ácido acético es aplicado a zonas de neoplasia intraepitelial cervical, la precipitación de nucleoproteínas de las células neoplásicas, oscurece los vasos capilares, la luz se refleja y se observa el epitelio acetoblanco. Mientras más gruesa sea la capa de tejido neoplásico más pronta será la respuesta de precipitación. El efecto es reversible debido a que el ácido es neutralizado y las proteínas ya no precipitan. La apariencia acetoblanca no es exclusiva del tejido neoplásico, y se presentará en aquellas circunstancias en las que haya un incremento de nucleoproteínas, por ejemplo durante la metaplasia, la reepitelización y en la presencia de virus o productos de virus.

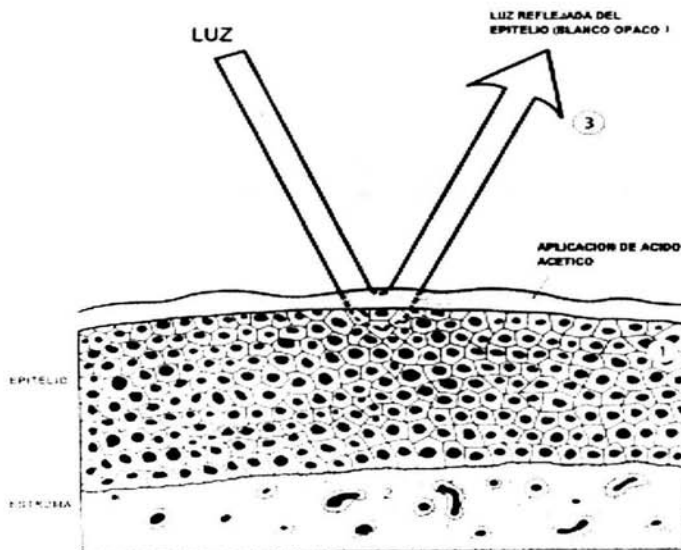


Fig. 18: Cuando el ácido acético es aplicado a zonas de neoplasia intraepitelial cervical, la precipitación de nucleoproteínas de las células neoplásicas, oscurece los vasos capilares, la luz se refleja y se observa el epitelio acetoblanco. La apariencia acetoblanca no es exclusiva del tejido neoplásico, y se presentará en aquellas circunstancias en las que haya un incremento de nucleoproteínas, por ejemplo durante la metaplasia, la reepitelización y en la presencia de virus o productos de virus (Singer A y Monaghan JM 2000).

La respuesta del tejido variará de acuerdo a la concentración del ácido acético siendo más rápida mientras mas alta sea ésta, así como debe considerarse un tiempo aproximado de 60 segundos antes de limpiar el exceso de éste.⁵

También es muy útil la aplicación de la prueba de Schiller. La solución de Schiller consiste en una preparación de yodo. Se basa en la respuesta del epitelio escamoso bien diferenciado el cual, de acuerdo a su contenido de glucógeno, se tiñe con gran fuerza con el yodo y se designa como yodo positivo. La mayoría de los otros tipos de epitelio, incluyendo el columnar, el epitelio metaplásico inmaduro, el neoplasma cervical intraepitelial y el epitelio de la mayoría de los cánceres avanzados se consideran como

yodo-negativos. Esta tinción se debe aplicar después de la aplicación de ácido acético y su correspondiente revisión colposcópica.⁴¹

El glucógeno es un polisacárido ramificado compuesto por moléculas de α -D-glucosa unidas por enlaces 1,4 salvo en los puntos de ramificación donde el enlace se establece entre los carbonos 1 y 6. Estas uniones le confieren a la molécula de glucógeno una estructura arbórea que permite acumular millones de moléculas de glucosa sin variación de la presión osmótica. Tiene cadenas cortas y al reaccionar con el yodo da un color pardo rojizo situándose su absorción máxima en los 470 nm.

Dado que hay reservas de glucógeno en los tejidos, la aplicación de yodo producirá un cambio en la coloración del epitelio. En el epitelio normal hay una baja cantidad de proteínas presentes y una alta concentración de glucógeno, especialmente en el citoplasma, mientras que en el epitelio atípico hay proteínas en la membrana celular, núcleo y citoplasma pero muy poco glucógeno.⁵

Los estudios colposcópico y el citológico son complementarios, no debiendo suplir la colposcopia al estudio citológico. El estudio histológico es indispensable cuando se ha encontrado alguna alteración, ya sea a nivel colposcópico o citológico.¹⁷

Citología

El examen citológico es un proceso complejo, trabajoso y cuyo resultado final depende del juicio del citotécnico y del citopatólogo. Un diagnóstico, dentro de los límites de la normalidad, no garantiza que el paciente no tenga ninguna lesión epitelial. Significa que, en la muestra, no fueron identificadas células alteradas, ausentes, tal vez, por una deficiente colecta o por algún otro motivo.

El hallazgo de cualquier alteración citológica, por mínima que sea, debe ser valorada por el clínico y relacionada con cualquier lesión colposcópica o peniscópica.

La citología se refiere al diagnóstico morfológico basado en los caracteres microscópicos de células y componentes extracelulares desprendidos del órgano espontáneamente u obtenidos por procedimientos que en general son menos invasivos que la biopsia.

Para la detección por citología del **VPH** se utiliza el método de la citología exfoliativa, recogiendo material desprendido espontáneamente de la mucosa cérvico vaginal

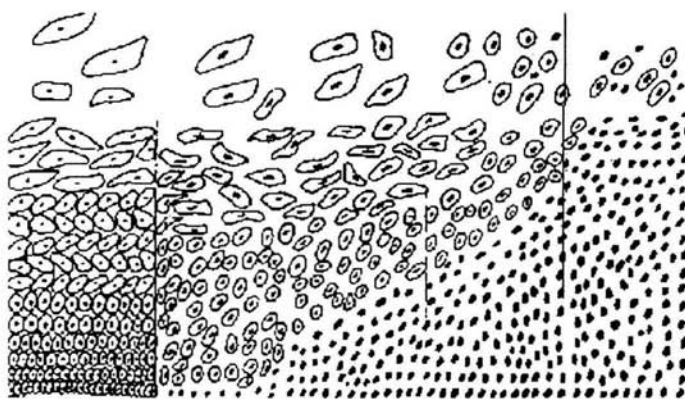


Fig. 19: Los diferentes tipos de células que son exfoliadas sirven para la realización de un examen citológico

Por tanto, la mucosa debe encontrarse en condiciones fisiológicas adecuadas, sin manipular, sin lavar y sin medicamentos.

Debe hacerse un extendido delgado y uniforme del material a examinar sobre un portaobjetos y fijar la muestra con alcohol de 96° o con líquido fijador a base de polietilenglicol o isopril.

Posteriormente la laminilla se tiñe utilizando la Tinción de Papanicolaou. Esta es una tinción tricrómica a base de:

- a) Hematoxilina que tiñe los núcleos.
- b) Orange G que tiñe los citoplasmas transparentes
- c) EA-50 que tiñe los citoplasmas más densos

Una vez seca se monta con una gota de bálsamo de Canadá o resina sintética y se coloca un cubreobjetos.

Se examina la laminilla por microscopía de luz a seco débil, recorriéndola en zig-zag y buscando alteraciones y efectos citopáticos por infección de **VPH**.⁵⁴

La coilocitosis es el efecto citopático patognomónico de la infección por **VPH**. Hay presencia de halos citoplasmáticos perinucleares y displasia nuclear.

Los cambios morfológicos ocurren por la habilidad del virus para interrumpir el ciclo celular, inducir poliploidia e inhabilitar la diferenciación citoplasmática funcional, generando así la vacuolización degenerativa coilocítica. Otros hallazgos que pueden encontrarse en la infección por **VPH** y que son criterios menores son la disqueratosis, hiperqueratosis, metaplasia inmadura atípica, citomegalia, células con glóbulos de condensación citoplasmática, elongamiento nuclear.²⁸

4.2 Histopatología

La expresión de un proceso infeccioso varía, desde un grado mínimo hasta extensos comprometimientos. De esta manera, en los hospederos susceptibles ocurre la expresión viral activa, como lesiones macroscópicas u otros tipos de alteraciones subclínicas. Estas últimas son consideradas como las más comunes en una infección activa, siendo expresadas en el examen colposcópico como lesiones acetoblancas.

Debe tomarse en cuenta que otras patologías, tales como la candidosis, foliculitis, psoriasis, dermatitis por contacto entre otras, pueden cursar con lesiones similares, cuyo

diagnóstico diferencial con el **VPH** debe ser dado a través de una biopsia y de su examen anatomopatológico, siendo posible correlacionar el efecto citopático del virus (coilocitosis) con la lesión epitelial proliferativa o neoplásica.

La toma de la muestra debe considerar contar con tejido representativo, en cantidad y condiciones adecuadas.

La fijación de la muestra es en formol al 10%. El volumen del fijador deber ser a lo menos 10 veces mayor que el del trozo de tejido. Las muestras pequeñas (menos de 2 cm) son extremadamente susceptibles a la desecación y deben colocarse inmediatamente en fijador.

Los hallazgos histopatológicos en el condiloma cervical muestran coilocitosis y pueden encontrarse uno o varios hallazgos como la papilomatosis, acantosis, hiperqueratosis, paraqueratosis, disqueratosis entre otros patrones menores.

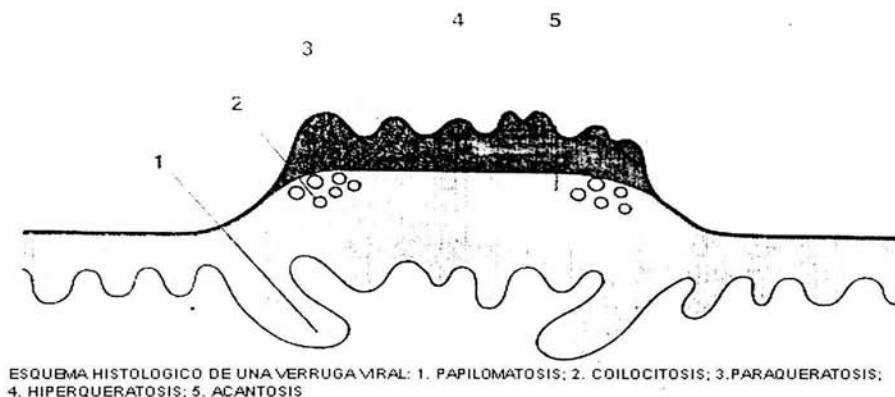


Fig. 20: Hallazgos patológicos hallados en una lesión por **VPH** (Gross GG y Barroso R. 1997).

4.3 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.

Hay varios métodos utilizados en esta área:

- Método directo: un marcador visual, ya sea fluorescente o enzimático, se adhiere químicamente al anticuerpo primario. El anticuerpo primario es el anticuerpo dirigido contra el antígeno que se quiere demostrar.
- Método indirecto: el marcador visual está unido al anticuerpo secundario. El tejido es expuesto previamente al anticuerpo primario que no es marcado y luego al anticuerpo secundario, el cual es dirigido contra el anticuerpo primario y se unirá con él.
- Método de la peroxidasa-antiperoxidasa: este método usa un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario y un anticuerpo producido en contra, conjugado con la enzima peroxidasa (complejo PAP). El anticuerpo secundario es producido en una especie animal diferente del anticuerpo primario y del complejo peroxidasa-antiperoxidasa y el anticuerpo primario y el complejo peroxidasa-antiperoxidasa provienen de la misma especie animal. Consecuentemente, el anticuerpo secundario actúa como puente o anticuerpo eslabón.
- Método del complejo avidina-biotina (ABC): esta técnica también usa tres reactivos: un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario que esta

químicamente ligado a la vitamina biotina, y un complejo de la glicoproteína avidina que está ligada a la biotina y peroxidasa. La avidina tiene la habilidad de ligarse con cuatro moléculas de biotina, en forma no inmunológica. Esta fuente de afinidad le da al método excelente sensibilidad.

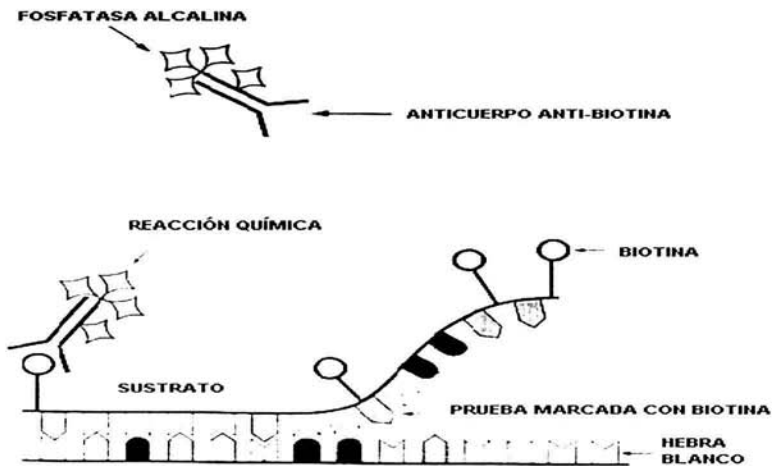


Fig. 21: Método de la avidina-biotina (Gross GG y Barroso R. 1997).

Las soluciones de anticuerpo son producidas mediante suero completo, inmunoglobulina, reactivo purificado de afinidad y anticuerpos monoclonales. El suero completo es el menos caro pero contiene elementos del suero y otros anticuerpos no específicos. Las inmunoglobulinas del suero contienen anticuerpos específicos y los que no lo son. El reactivo purificado de afinidad contiene solamente los anticuerpos específicos que queremos, pero es caro de producir. Las soluciones de anticuerpos monoclonales se obtienen usando un antígeno característico determinante (epitope).

La inmunohistoquímica puede detectar el revestimiento proteico de las partículas virales del VPH que se encuentran en lesiones vistas por microscopía óptica en material incluido

en parafina o en preparados citológicos, siendo utilizados anticuerpos policlonales marcados contra antígenos específicos de varios tipos de **VPH**.

En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizan como marcadores compuestos de fluoresceína que bajo luz ultravioleta emiten luz de longitud de onda visible, que depende de la naturaleza del compuesto. El isotiocianato de fluoresceína emite luz verde amarillenta intensa. La inmunofluorescencia directa consiste en la detección de antígenos mediante anticuerpos conjugados con fluoresceína. Esta técnica pese a ser muy sensible, presenta inconvenientes como la falta de permanencia de la fluorescencia, requiere de microscopía especializada y el detalle morfológico es pobre.

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A.

Comercialmente, hay anticuerpos policlonales para varios tipos de **VPH** (pool de anticuerpo de amplio espectro) y anticuerpos específicos que discriminan los tipos 6, 11 y 18.

Presenta alta especificidad, pero solamente detecta fases episomales (con expresión del segmento de la región L1 de la cápside viral), encontradas en lesiones de bajo grado, como los condilomas o papilomas. Cuando ocurre una integración del genoma viral a la célula hospedera, como en los casos de lesiones intraepiteliales de alto grado, carcinomas epidermoides invasores y adenocarcinomas, la sensibilidad disminuye (falso-negativo).

Un elemento a considerar es la óptima preservación del tejido y por ende de los antígenos. La mayoría de los antígenos se conservan adecuadamente después de la fijación en formalina e inclusión en parafina. Algunos son más lábiles y sólo se detectan en cortes de congelación.

La inmunohistoquímica no es un método adecuado para el diagnóstico de la infección por **VPH**, debido a su baja sensibilidad.^{28,56}

4.4 Biología molecular

El diagnóstico de la presencia de DNA del **VPH** es un arma importante en el rastreo de neoplasias en el tracto genital inferior, así como en la lucha contra las enfermedades sexualmente transmisibles.

Los métodos disponibles actualmente son el southern blot, el dot blot, la hibridación molecular *in situ*, la captura híbrida y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).^{10,17,25} Estos métodos son adecuados para pacientes con lesiones colposcópicas no características, citología cérvico vaginal sugestiva de lesiones no definidas, lesiones de bajo grado de colon, vagina y vulva, discordancia citopatológica, así como para el monitoreo terapéutico y como control de calidad en anatomía patológica.

Las cadenas de RNA o DNA pueden estar formadas por una o dos hebras. Bajo condiciones apropiadas, las hebras complementarias se unen mediante un proceso llamado apareamiento de bases o hibridización.

La naturaleza del DNA es de doble hebra. Las hebras de DNA deben ser desnaturalizadas o separadas para producir blancos accesibles, que puedan ser detectados por sondas específicas de DNA o RNA.

Este proceso de desnaturalización se lleva a cabo solo bajo ciertas condiciones , como en medios con pH muy alcalinos, a altas temperaturas o condiciones no fisiológicas de concentración de iones.

Todos estos factores extremos afectan la estabilidad de las uniones de hidrógeno entre las bases complementarias. Además la estabilidad del complejo blanco-sonda se ve afectado por la homología entre los correspondientes nucleótidos de las hebras hibridizadas.

Para visualizar la formación del complejo híbrido debe marcarse la prueba. Esta marca puede ser por medio de isótopos radioactivos o sustancias químicas.¹⁷

4.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La utilización de la técnica de PCR en estudios epidemiológicos, investigando la relación entre **VPH** y cáncer cervical, permitió la comprobación de que el **VPH** era el factor de riesgo principal para el desarrollo de la neoplasia cervical, atribuyéndose los resultados negativos a la baja sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnóstico antes utilizados.

La gran sensibilidad del PCR deriva de su enorme potencial de amplificación de un segmento específico de DNA del agente investigado. Se necesita conocer la secuencia del nucleótido blanco para así poder generar oligonucleótidos cebadores de 20 a 25 bases de longitud que se unen a regiones específicas del DNA blanco.

Una gran ventaja del método es que puede utilizarse una gran variedad de materiales como frotis citológicos, lavados, biopsias congeladas o tejidos incluidos en parafina, a partir de los cuales se puede llevar a cabo la PCR. El DNA blanco debe ser separado por

medio de detergentes no iónicos y digestión proteica o congelando y calentando repetidas veces el material celular.^{17,57}

La amplificación debe llevarse a cabo en una mezcla de los siguientes componentes: la muestra de DNA, moléculas cebadoras específicas o cebadores control internos, DNA polimerasa termoestable, los cuatro deoxirribonucleótidos y amortiguador para PCR que contiene cloruro de magnesio, cloruro de potasio y tris-HCL pH 8.3.

El proceso se lleva a cabo a través de repetidos ciclos de tres pasos básicos:

- Desnaturalización del DNA por calor (95°C)
- Acoplamiento de dos moléculas cebadoras específicas (40-60°C). Las dos moléculas cebadoras se unen específicamente a sus secuencias de DNA complementarias. La distancia entre las dos moléculas cebadoras es de unos cuantos cientos de nucleótidos.
- la actividad de polimerización de la enzima DNA polimerasa termorresistente (68-75°C). La DNA polimerasa genera hebras hijas de DNA que expanden la región entre dos moléculas cebadoras.^{17,57}

Las dos hebras de DNA iniciales se convierten en cuatro hebras individuales, las cuales sirven como base para un ciclo de PCR subsiguiente. El PCR usualmente termina después de 35-40 ciclos.

Se codifican millones de fragmentos idénticos de DNA y se detectan tras una electroforesis en gel y una tinción con bromuro de etidio. Se especifica por hibridación transfiriéndolo a un Southern blot o dot blot.¹⁷

Las reacciones de PCR más utilizadas emplean moléculas cebadoras amplificando parte del gen L1.^{22,25} Tal estrategia se justifica por ser la región más conservada en la secuencia de DNA entre los diferentes tipos de **VPH**, permitiendo la detección de una gran mayoría de tipos. Destacan las moléculas cebadoras MY09/11, descritos por M. Manos, y las

moléculas cebadoras GP5+/GP6+ utilizados por el grupo holandés encabezado por J. Walboomers.⁷²

La principal desventaja del PCR deriva de su alta sensibilidad que lleva a un gran número de diagnósticos positivos sin correlación clínica, siendo, por tanto, una prueba de bajo valor predictivo positivo, mas de altísimo valor predictivo negativo para neoplasia cervical.

4.4.2 Hibridación molecular *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica basada en la detección de pequeños segmentos de DNA o RNA a partir de sondas específicas. Una sonda son secuencias de nucleótidos complementarias desarrolladas a partir de segmentos conocidos de DNA o RNA que se desean identificar.

Bajo condiciones adecuadas, ocurre la hibridación (a través del establecimiento de puentes de hidrógeno) de la sonda con una secuencia blanco de DNA viral.

Para permitir la visualización de la reacción entre las moléculas de DNA o RNA en estudio y las sondas, éstas pueden ser asociadas a moléculas radioactivas, fluorescentes o biotiniladas.

Las sondas marcadas con elementos radioactivos no son de elección para su uso rutinario, pues se necesita protección y manipulación especial. Las técnicas no-isotópicas o colorimétricas son más rápidas y permiten una localización más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables y más baratas. La sensibilidad es igual o levemente inferior a la de los métodos isotópicos.

Recientemente fué descrito un método de amplificación de señales de detección que aumentan la sensibilidad de la hibridación *in situ* cerca de cien mil veces, referida como semejante al southern blot o PCR, detectando apenas una copia viral por célula, además,

permite saber el estado físico (episomal o integrado al genoma) del **VPH**, sin necesidad de hibridación por southern blot.

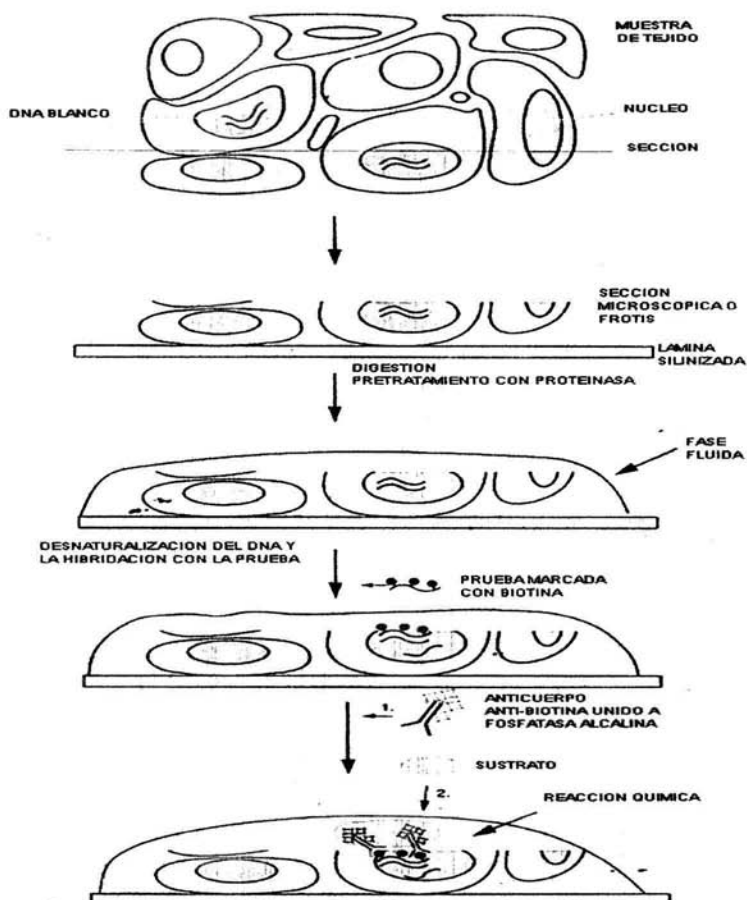


Fig. 22: Proceso de la hibridación molecular *in situ* (Gross GG y Barroso R. 1997).

Esta técnica permite la localización topográfica del ácido nuclear viral en tejidos y células. Las grandes ventajas de la hibridación molecular *in situ* son la posibilidad de hacer correlaciones de los aspectos morfológicos/histológicos de las lesiones sin la necesidad

de material fijado en medios especiales, permitiendo el análisis de biopsias o piezas quirúrgicas colectadas y fijadas en formol al 10 %, material congelado, cultivo de células, material de archivo (bloques de parafina) o preparados citológicos.

La única particularidad de la técnica es que la muestra debe ser colectada en láminas silanizadas (preparadas con un tipo especial de cola para que las célula no se separen durante la reacción).²⁸

El DNA celular es desnaturalizado por álcali o calor, lo cual permite la hibridación con las sondas marcadas. Se leen las pruebas y los controles positivos y negativos de manera adecuada.

Los principales problemas de la hibridación *in situ* es el deterioro morfológico y la variación de la sensibilidad (detección de más de 10-20 copias de DNA viral por célula).¹⁷

La hibridación *in situ* en filtro es una técnica en la cual las celular obtenidas por frotis son suspendidas en una solución reguladora de fosfato. Las células se filtran a través de una membrana de nitrocelulosa. Se desnaturalizan las células, se hibridizan bajo condiciones estrictas y se lava. El espécimen se somete a autoradiografía y los resultados se obtienen entre 1 y 7 días después. Los filtros se interpretan como positivos cuando puntos claros pueden ser distinguidos de las señales de fondo. Se necesitan aproximadamente 10,000 copias de DNA viral por células para que la técnica funcione.

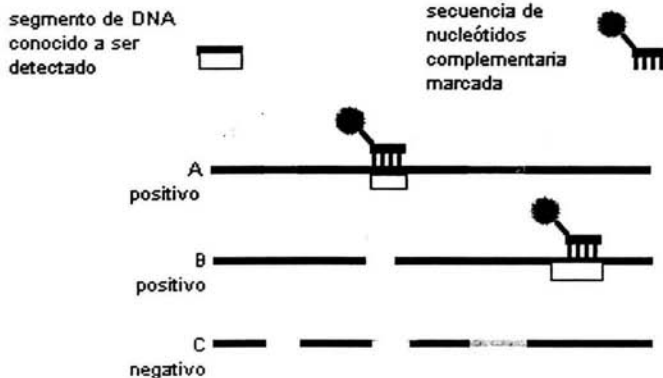


Fig. 23: Para permitir la visualización de la reacción entre las moléculas de DNA o RNA en estudio y las sondas, éstas pueden ser asociadas a moléculas radioactivas, fluorescentes o biotiniladas (Gross GG y Barroso R. 1997).

La técnica sólo aplica a muestras celulares, no es específico y muy poco sensible por lo que es un método obsoleto para la investigación de infección por **VPH**.

Se le conoce como FISH por sus siglas en inglés: **Filter *in situ* hybridization**.

Captura híbrida

El sistema de captura híbrida en microplaca consiste en una solución hibridadora que utiliza anticuerpos de captura con amplificación de señal, siendo detectados por medio de quimioluminiscencia. Especímenes que contienen DNA son hibridados con una variedad de cadenas específicas de RNA-**VPH**. El resultado es la captura de híbridos RNA/DNA sobre la superficie de la microplaca cubierta de anticuerpos específicos para los híbridos de RNA/DNA.

Posteriormente, se lleva a cabo la reacción de los híbridos inmovilizados con conjugados de anticuerpos específicos para híbridos de RNA/DNA y fosfatasa alcalina, que son detectados por un sustrato quimioluminescente. Varias moléculas de fosfatasa alcalina son conjugadas a cada anticuerpo. Muchos anticuerpos conjugados se unen a cada híbrido capturado. La luz emitida es medida como unidades de luz relativa (RLU) en un luminómetro. La intensidad de la luz emitida denota la presencia o ausencia de DNA blanco en los especímenes en los que se está verificando la presencia del virus.

Cuando el RLU igual o supera el valor de corte nos indica la presencia de DNA-**VPH** en el espécimen. El RLU menor que el valor de corte indica la ausencia de DNA-**VPH** específico o los niveles de DNA-**VPH** está debajo de los límites de detección del ensayo.

La duración de la prueba es de 4 horas.

La captura híbrida para **VPH** es capaz de detectar los 18 tipos de **VPH** que más comúnmente infectan el tracto anogenital.

Su sensibilidad es de 1 pg/mL de DNA-**VPH**, equivalente a 0.1 copias de virus por célula. Por esta sensibilidad, los estudios han mostrado estricta relación entre los resultados y la evolución clínica.

Todas las pruebas de captura híbrida son, al mismo tiempo, cualitativas y cuantitativas.

En mujeres, el examen se puede realizar en material colectado por raspado. También se pueden analizar biopsias de tamaño aproximado de 5 mm obtenidas en fresco por corte transversal. El material de la biopsia debe ser colocado inmediatamente en un kit colector y almacenado a una temperatura de 2-30 °C, antes de ser transportado y procesado.⁶⁶

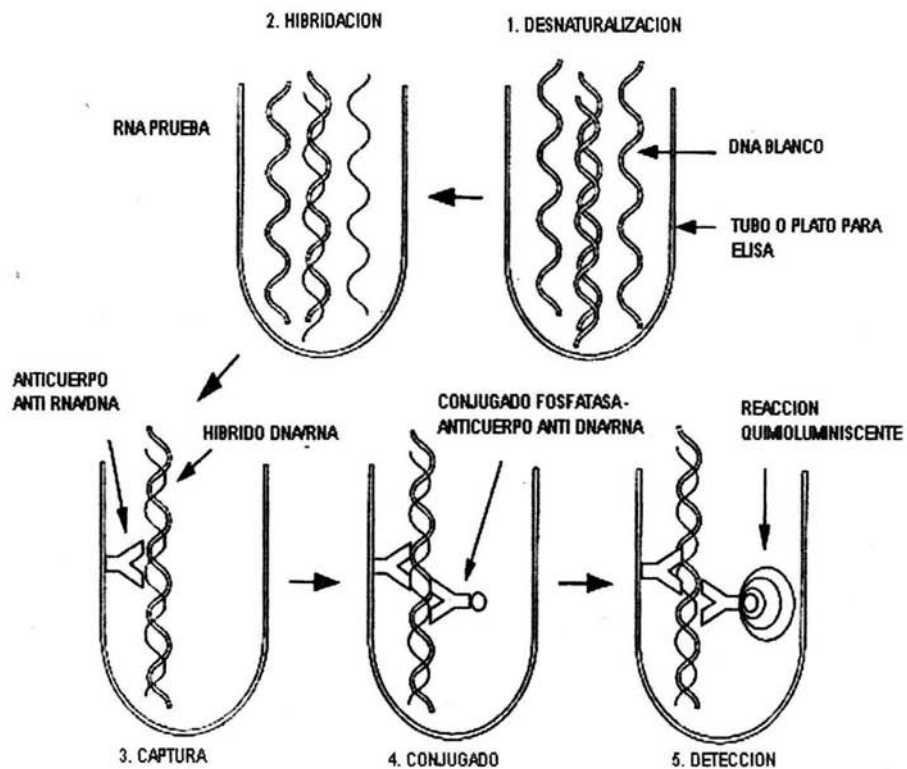


Fig. 24: El sistema de captura híbrida consiste en una solución hibridadora que utiliza anticuerpos de captura con amplificación de señal, siendo detectados por medio de quimioluminiscencia (Singer A y Monaghan JM 2000).

Falta página

N° 78

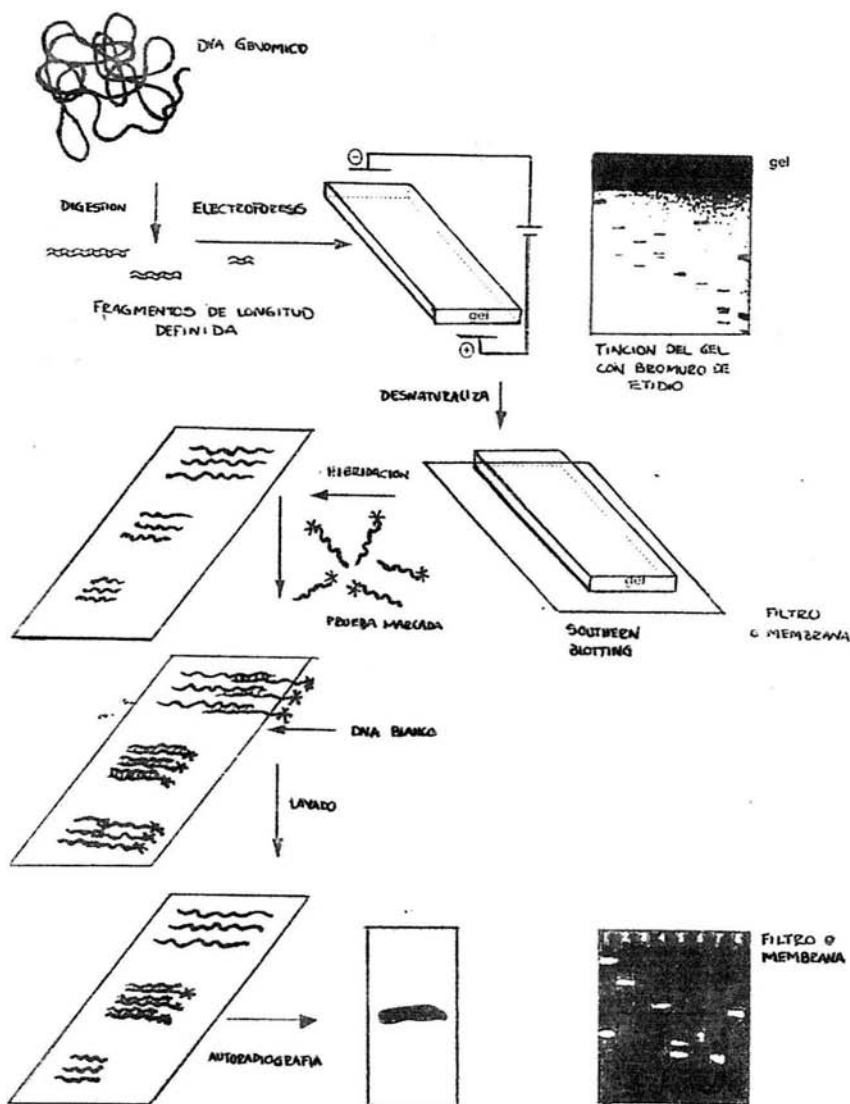


Fig 25: Southern blott se utiliza para la detección de DNA de VPH en DNA celular. Los tejidos o las células son homogeneizados y las proteínas son enzimáticamente digeridas. El DNA celular es extraído y se digiere con endonucleasas de restricción en fragmentos de DNA de diferentes tamaños. Estos fragmentos se cargan en paredes de gel antes de la electrofresis y se tiñen con bromuro de etidio. Se traspa a un soporte y se incluyen controles que posteriormente se comparan con los fragmentos del DNA problema (Gross GG y Barroso R. 1997)

4.4.4 Dot blot

Esta técnica omite dos pasos del southern blot – la digestión del DNA celular y la separación de los diferentes fragmentos de DNA por Electroforesis. Después de la extracción del DNA, es desnaturizado utilizando calor o álcali. Los ácidos nucleicos son filtrados a través de una membrana uniéndose directamente a esta. Como en el southern blot, se incluyen controles de ácido nucleico viral clonado. Se hibridiza y lava bajo condiciones adecuadas, leyéndose posteriormente las marcas. Ya que el DNA se concentra en un filtro pequeño, pequeñas cantidades de DNA pueden ser detectadas (0.1-1µg).

El Dot blot es menos específica que el southern blot cuando hay menos de 10 copias de **VPH** por célula. Además, grandes cantidades de DNA celular puede resultar en un falso negativo.

Hay un kit comercial disponible que trabaja con una modificación de esta técnica (ViraPap y ViraType para tipo de **VPH** de Digene Diagnostics). Utiliza una extracción de DNA y sondas de RNA marcadas con ³²P. Aunque la técnica trabaja bien hay varias desventajas, entre ellas, que no es fácil distinguir a los falsos positivos, no se ha podido sustituir el ³²P por otro tipo de marca y se pueden detectar solo un número limitado de tipos virales.¹⁷

4.5 Microscopía electrónica

Se utiliza para ampliar el conocimiento acerca de la relación del **VPH** con la célula hospedera pues identifica partículas virales intranucleares y citoplasmáticas.

Contribuye en el estudio de las etapas y mecanismos de patogenia de las lesiones. Su uso es restrictivo a protocolos de investigación.²⁸

Se utilizan la microscopía electrónica de transmisión o convencional y la de barrido.

Las muestras para microscopía electrónica deben fijarse en glutaraldehído. Las muestras se incluyen en resinas sintéticas (Epon) y se practican cortes 10 veces más delgados que los de microscopía de luz llamados cortes ultrafinos. La tinción se realiza con sales de metales pesados como citrato de plomo, tetróxido de Osmio o acetato de uranilo, que permiten un contraste adecuado del tejido bajo el haz de electrones. Los cortes ultrafinos se montan sobre grillas de cobre, se tiñen y se observan al microscopio electrónico.

Microscopía electrónica de transmisión

En esta técnica la preparación teñida es traspasada por un haz de electrones, lo cual proporciona la imagen ultrafina sobre una pantalla.

El examen cuidadoso y la evaluación de las características ultraestructurales a la luz del cuadro clínico y la imagen histopatológica al microscopio de luz y los estudios inmunohistoquímicos, permiten un diagnóstico de certeza en la mayoría de los casos.

Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido permite el estudio de superficies celulares. La imagen se obtiene rastreando la superficie de la muestra con un haz electrónico ultrafino. Las señales generadas se recolectan, amplifican y captan en un tubo de rayos catódicos. En estas condiciones las anomalías estructurales y de superficie pueden identificarse

fácilmente con esta técnica. De esta forma, es posible incluso establecer un pronóstico de reversibilidad de las alteraciones utilizando esta técnica.⁶⁴

COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA VPH ²⁸						
Prueba	Muestra	Dificultad	Sensibilidad	Especificidad	Discriminación Tipos de VPH	Cuantificación viral
Citológica	1	Bajo	Baja	Baja	No	No
Histológica	2,3,4	Bajo	Baja	Baja	No	No
Inmuno- histoquímico	1,2,3,4	Moderada	Moderada	Alta	Si	No
Captura híbrida	2,5	Bajo	Alta	Alta	Si	Si
PCR extraído	1,2,3,4	Alto	Alta	Alta	Si	No
PCR <i>in situ</i>	1,2,3,4	Muy alto	Alta	Alta	Si	No
Hibridación	2,6	Muy alto	Alta	Alta	Si	No

Muestras

1. Secreción cervicovaginal, raspado uretral, de glande y prepucio, lesiones cutáneo-mucosas fijadas rutinariamente.
2. Biopsias o piezas quirúrgicas en fresco.
3. Biopsias o piezas quirúrgicas fijadas en formol al 10%, tamponado.
4. Material en bloques de parafina.
5. Raspado de lesiones en medio de transporte específico para Captura Híbrida.
6. Citologías en fresco.

5 Tratamiento y profilaxis

El objetivo del tratamiento es reducir, remover o destruir las lesiones clínicas o subclínicas, además de prevenir la transmisión del **VPH**, pues no hay medidas efectivas disponibles capaces de erradicar el virus del tracto genital inferior. La infección recidiva por **VPH** ocurren por:

- ♦ Asincronismo de lesiones.
- ♦ Latencia del virus.
- ♦ Características biológicas del virus y del hospedero.
- ♦ Adherencia al tratamiento.
- ♦ Tipo de tratamiento indicado.
- ♦ Falla intrínseca del método terapéutico utilizado.
- ♦ Nueva contaminación.
- ♦ Autocontaminación.

5.1 Tratamientos

Los métodos disponibles para el tratamiento de la infección por **VPH** se dividen en químicos, quirúrgicos y los que estimulan al sistema inmune.^{17,28,30}

Los factores que intervienen en la elección del método son:

- Número, tamaño y localización de las lesiones.
- La aceptación del paciente al método propuesto.
- El estado inmune del paciente.
- La disponibilidad de recursos.
- La eficacia y efectos adversos.
- La experiencia y capacidad técnica del médico.

5.1.1. Químicos

Dentro de los tratamiento químicos se encuentran el ácido tricloroacético, el 5-fluorouracilo (5-FU), la podofilina, el ácido salicílico y la formalina o glutaraldehído entre los más usados.

5.1.1.1 Acido tricloroacético

La acción del ácido tricloroacético es como agente queratolítico. La solución al 80%-90% debe ser aplicada directamente sobre las lesiones, manteniendo el aplicador al menos un minuto. El tamaño del aplicador debe ser proporcional a la lesión. Es más efectivo en lesiones recientes con poca queratinización (áreas húmedas)

Es indicado en lesiones clínicas o subclínicas, vulvares o penianas.

5.1.1.2 5-Fluorouracilo (5-FU)

La crema al 5 % tiene un efecto antimetabólico como antagonista de la pirimidina. Como un análogo de la pirimidina, compite con la timidilato sintetasa y la sustituye el uracilo.

Interviene en la síntesis de DNA e inhibe en grado menor la formación de RNA, provocando así un desequilibrio metabólico, lo que da como resultado la muerte de la célula. La actividad inhibitoria del 5-FU afecta directamente el crecimiento rápido de las células y por consecuencia, el de las células neoplásicas.

Se estima que la absorción sistémica del 5-fluorouracilo administrado por vía tópica es del 5 al 10% de la dosis aplicada.

No se conoce acerca de su distribución, metabolismo y eliminación. No obstante, administrado por vía sistémica se sabe que es metabolizado ampliamente en hígado y el 60-

80% se excreta por vía respiratoria en 8 a 12 horas como dióxido de carbono. El 15% se elimina por orina como fármaco original.

Se puede asociar con 2 gramos de vitamina A aumentando la inmunidad local.

En vulva y en vagina debe ser aplicado ayudados por el colposcopio, con una capa fina, una vez por semana, hasta que aparezca cualquier señal de hiperemia o erosión.

El uso de 5-FU puede ocasionar manchas hipercrómicas en piel vulvar o peniana, que desaparecen lentamente.¹⁷

5.1.1.3 Podofilina:

La podofilotoxina es la parte activa de la planta *Podophyllum peltatum*. *Podophyllum* deriva del griego y significa *hoja de pie*, porque la hoja de esta planta tiene apariencia de pie.

Ha sido ampliamente utilizada por su actividad queratolítica, aunque en general es un caústico muy severo. Actúa como agente citotóxico activo con afinidad específica por las proteínas microtubulares del huso mitótico, impidiendo el ensamble normal del huso y la mitosis de las células epidérmicas se detiene en metafase.^{17,28}

La resina de podofilina se absorbe en aplicación percutánea, es soluble en lípidos y por lo tanto se distribuye ampliamente por todo el organismo incluyendo SNC, por lo que no debe aplicarse sobre piel sana. Después de aplicar el producto durante el tiempo indicado por el médico, se deberá lavar la zona para evitar la absorción del producto. La toxicidad depende del tiempo, extensión y frecuencia de uso. Ha habido casos de neuropatías que pueden llegar a coma. Puede provocar edema, eritema y exfoliación.

Se utiliza en piel vulvar o peniana, siendo contraindicada en uretra, así como durante el período de gestación, ya que es causa de aborto.

Presenta dos mutágenos (quercetin y kanferol^{17,28}) que pueden causar alteraciones displásicas, siendo por eso contraindicada por algunos autores.

5.1.1.4. Acido salicílico

El ácido salicílico actúa como queratolítico, suaviza el material córneo o las costras destruyendo la cohesividad intracelular. Esto ayuda a remover material hiperqueratótico y escamas eliminando así las partículas de **VPH** infecciosas. A bajas concentraciones parece tener acción anti-inflamatoria pues incrementa la vascularidad dérmica.

Las preparaciones pueden presentarse en forma de soluciones, ungüento, pintura o mascarilla. Los ingredientes de estas preparaciones son ácido salicílico en concentración de 10-50% en combinación con otros principios activos como el ácido láctico (4-16 %), glutaraldehído (10 %), formaldehído (75%) o podofilina (20%).

El ácido salicílico es usado sólo en lesiones cutáneas asociadas a **VPH** y la concentración depende del área de aplicación.¹⁷

5.1.1.5. Formalina y glutaraldehido

Son poderosos desinfectantes y tienen propiedades de fijación de tejidos. La desecación de la capa superficial contribuye al efecto desinfectante de ambos compuestos.

Además de la probable destrucción de los viriones localizados en las capas superficiales de la epidermis y la desecación de las mismas, el efecto sensibilizador (reacción alérgica local) puede contribuir a la curación de las verrugas.¹⁷

5.1.2 Quirúrgicos

Los tratamientos quirúrgicos incluyen el curetaje, la excisión con tijeras, la excisión con bisturí, el LASER, la excisión con manejo de electrocirugía de alta frecuencia (Loop Electrosurgical Excisional Procedure – LEEP) y la crioterapia.

5.1.2.1 Excisión con tijeras, bisturí y curetaje

Las tijeras ofrecen un tratamiento alternativo para las lesiones verrucosas. Su uso, no obstante, se limita a lesiones acuminadas especialmente las pediculadas. La anestesia y la sutura generalmente no son necesarias, sobretodo en caso de una lesión única. Los resultados cosméticos y en términos de recurrencia son generalmente excelentes. En la mayoría de los casos el tejido circundante no es dañado y, por tanto, la cicatrización es buena.

La incisión con bisturí no es en general apropiada para verrugas en puntos de presión o en superficies que soportan peso. Se recomienda para lesiones verrucosas con sospecha de neoplasia intraepitelial. Además, se incrementa el riesgo de transplantar tejido infeccioso a capas más profundas de la dermis, con el posible desarrollo de lesiones quísticas.

El curetaje se lleva a cabo con un curete dérmico, que es una cuchara afilada. Se requiere anestesia local. Los resultados cosméticos son generalmente buenos pero hay dolor tras la intervención.¹⁷

5.1.2.2 LASER

LASER es una palabra compuesta por las iniciales de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" que en español significa "amplificación de luz por emisión estimulada de radiación".

En medicina se utilizan los LASER de anhídrido carbónico (CO₂), neodímio y de argonio.

El LASER de CO₂ emite una longitud de onda de 10,600 nm. La energía emitida se centra en un punto específico por un sistema de lentes y espejos. Esta energía es absorbida por todo tipo de tejidos, independientemente de su color.

Además la absorción total de la energía del CO₂ ocurre en 0.1 mm de piel, por lo que altas concentraciones de energía pueden ser aceptadas en un pequeño volumen de tejido.

Cualquier tejido en el punto de aplicación es evaporado a la velocidad de la luz. Adyacente a la zona de vaporización, hay una zona de 0.2-0.3 mm de coagulación, en la cual los vasos sanguíneos mayores a un diámetro de 0.5 mm son sellados.¹⁷

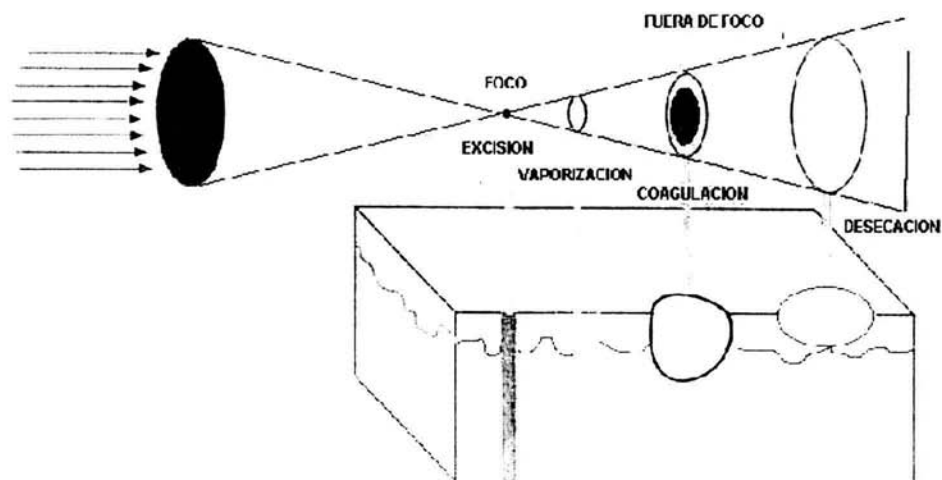


Fig 16: Es importante la buena calibración del LASER porque si este se encuentra fuera de foco podría causar serias lesiones en el tejido (Gross GG y Barroso R. 1997)

El LASER de CO_2 es el más utilizado en lesiones del tracto genital inferior. Es altamente absorbido por tejidos ricos en agua. Al interactuar con el tejido, el LASER de CO_2 provoca la evaporación del agua y carbonización del tejido con alta precisión y con un mínimo daño térmico a los tejidos adyacentes, promoviendo así una excelente cicatrización.

Las ventajas de este método son el bajo índice de infecciones post-operatorias, alta precisión en profundidad y extensión con un óptimo resultado estético, es ambulatorio, alto índice de éxito con una sola aplicación, baja incidencia de complicaciones, el procedimiento puede ser repetido cuantas veces sea necesario, puede ser realizado en gestantes y en pacientes inmunosuprimidas.

La principal desventaja es el alto costo del procedimiento, además de requerir un entrenamiento especializado.

5.1.2.3 Electrocirugía

La electrocauterización es un proceso que ha sido reemplazado por el corte quirúrgico por medio de corriente alterna de alta radiofrecuencia.

El corte electroquirúrgico se logra cuando una corriente eléctrica pasa a través de gases e iones en el tejido. La energía se centra en vez de disiparse para lograr un aumento en la temperatura dentro del tejido y vaporizarse.

La frecuencia esta por encima de aquella que produce excitación neuromuscular y dolor que ocurre debajo de 300 kHz.

Cuando la corriente alterna de alta frecuencia pasa a través de los tejidos, compuestos predominantemente por agua y electrolitos, la energía cinética ioniza partículas del tejido y rápidamente se alinean de nuevo en relación al campo eléctrico. Debido a la alta frecuencia, las partículas ionizadas no se mueven grandes distancias, pero la energía cinética que les imparte produce un aumento rápido en la temperatura del tejido. Los efectos térmicos resultan de la relación entre la cantidad de calor impartido al tejido por el flujo de corriente y la cantidad de calor disipado a través de la evaporación del agua más la conducción térmica a tejidos adyacentes.

Para cualquier tejido, el efecto del aumento de temperatura dependerá de la temperatura y del tiempo en que la temperatura sea mantenida. Cuando la temperatura se eleva lentamente, el agua intra y extracelular se evapora a una tasa suficiente para mantener una temperatura bajo los 100° C. Esto causa que el tejido se deseque y las proteínas del tejido se coagulen térmicamente, llevando a la muerte celular pero sin destrucción tisular.

En contraste, cuando el tejido se calienta rápidamente a altas temperaturas, la evaporación y la transferencia de calor no pueden mantener el equilibrio térmico en los tejidos y la temperatura intracelular se eleva arriba de 100°C. Como resultado de la rápida evaporación,

con cambios en el volumen celular, la presión en la célula se incrementa hasta un punto donde la membrana celular se rompe y existe destrucción tisular.

El proceso físico por el cual hay un corte electroquirúrgico ocurre cuando la temperatura en los tejidos se eleva rápido y lo suficiente para que el agua se evapore. Esto sólo sucede en condiciones de alta densidad de corriente.

La alta densidad de corriente se logra al confinar la corriente en un área seccional extremadamente pequeña. La corriente se concentra en áreas que viajan entre el electrodo activo y el tejido. Este arco ocurre cuando el campo eléctrico entre dos electrodos se vuelve lo suficientemente fuerte para ionizar las partículas en el espacio entre éstos. Al ocurrir esto, se emite luz y la corriente se mueve a través del espacio entre los dos electrodos. Los arcos se propician cuando hay vapor envolviendo al electrodo, que puede ser ionizado en el campo eléctrico. La envoltura de vapor es generado por la evaporación de agua en los tejidos durante el proceso de corte.

El LEEP es ampliamente usada para eliminar lesiones asociadas a **VPH**.¹¹ Las complicaciones asociadas al LEEP son representadas por quemaduras de pared vaginal debido a la difícil visibilidad o por inexperiencia.

5.1.2.4 Crioterapia

La crioterapia convierte el agua de las células en cristales de hielo a través de la deshidratación, modificando la concentración de solutos en la estructura biológica y los sistemas de membrana como resultado de la desaparición de la estructura acuosa.

Hay varios mecanismos involucrados en la criodestrucción, entre ellos:

- Mecanismos físicos
- Mecanismos vasculares

La fase física comprende cristalización intra y extracelular, deshidratación celular con colapso celular, incremento de la concentración intracelular de electrolitos, desnaturalización de la membrana de lipoproteínas y choque térmico. La trombosis resulta de la vasoconstricción de las arteriolas y vénulas, modificando el endotelio vascular, incrementando la permeabilidad vascular con un incremento de la viscosidad sanguínea.

La crioterapia puede ser aplicada a lesiones asociadas a **VPH** en piel, genitales y ojos.¹⁷

5.1.3 Estimuladores de la inmunidad

5.1.3.1 Imiquimod

El 1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amino) o imiquimod es un inductor del interferón, de una variedad de otras citoquinas y es un inmunoestimulador. Tiene actividad antiviral y anticancerígena y tiene la propiedad de funcionar como adjuvante de las vacunas.³⁰ *In vitro*, induce monocitos y macrófagos del torrente sanguíneo para producir una variedad de subtipos de interferones alfa y al factor de necrosis tumoral alfa, IL-1, IL6, IL-8, IL-10, Factor estimulante de colonias granulocíticas, entre otros.^{58,59}

Su exacto mecanismo de acción permanece desconocido, pero se sabe que es un estimulador de la inmunidad celular por medio de todas las citoquinas que induce, además de actuar por medio de todos los mecanismos del interferón alfa.

Se utiliza en crema al 5 % para su uso tópico, aplicándose sobre las lesiones vegetantes por tres días alternados hasta la desaparición de las lesiones o por un período de 16 semanas.

La penetración del fármaco es mayor a través de la piel parcialmente queratinizada (estrato córneo) que a través de la piel totalmente queratinizada como lo es la vulva.³⁰

Pueden observarse quemaduras localizadas, eritema, irritación, dolor, sensibilidad.

1.1.3.2 Retinoides

Los retinoides incluyen a todos los ácidos transretinoides (tretinoin), ácido 13-cisretinoico (isotretinoin) y los retinoides aromáticos (etetrinato e acitretin). Son una clase de componentes naturales o sintéticos relacionados con la vitamina A.

Se unen a receptores celulares específicos, produciendo efectos que van desde alteración en la proliferación de la epidermis hasta la diferenciación de la queratina. Han demostrado una buena actividad inmunomoduladora. Así mismo, tienen un efecto similar al de los interferones, además de la buena aplicatividad terapéutica en la infección por **VPH**, una vez que ha replicado el papilomavirus y se ha asociado a una diferenciación queratinocítica.

La combinación de acción antiproliferativa de los retinoides a los efectos antiproliferativos, inmunoestimulador e inmunopotencializador de los inteferones sugiere que la asociación entre estos dos tipos de agentes puede ser de gran ayuda en el tratamiento de las lesiones refractarias y de precánceres y cánceres asociados con **VPH**.

Pueden ser utilizados para reducir el tamaño de las lesiones virales en piel y en mucosa o como auxiliar postquirúrgico.

Los efectos adversos que se han observado son dermatitis, eritema, descamación e hiperpigmentación.^{17,28}

Los retinoides pueden utilizarse para reducir la cantidad de verrugas virales en la piel y la mucosa para así mejorar el acceso a procesos quirúrgicos.¹⁷

1.1.3.3 Interleucina-2 (IL-2)

La interleucina-2 (IL-2) es una citocina producida en forma natural que fue identificada por primera vez en 1976 como estimulante del crecimiento de los linfocitos T activados, siendo denominada al inicio "factor de crecimiento de las células T". Al conocer mejor su acción biológica se observó que no sólo estimulaba el crecimiento de los linfocitos T activados, sino que también aumentaba la respuesta inmune mediante la activación de otras células de la fórmula blanca, linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y células naturales asesinas (NK), por lo que se cambió su nombre a Interleucina -2 (IL-2).

Las propiedades inmunorreguladoras de IL-2 son la intensificación de la mitogénesis de linfocitos y estimulación a largo plazo del crecimiento de líneas de células humanas dependientes de interleucina-2; incremento de la citotoxicidad de los linfocitos T; activación de las células citotóxicas naturales (LAK y NK); inducción de la producción de interferón-gamma. La administración de IL-2 produce múltiples efectos inmunológicos dependientes de la dosis. Estos efectos incluyen activación de la inmunidad celular con intensa linfocitosis, eosinofilia y trombocitopenia, producción de citocinas, incluyendo factor de necrosis tumoral, IL-1 e interferón gamma.

Después de una infusión intravenosa corta, se observa una elevada concentración plasmática seguida de una rápida distribución al espacio extravascular y extracelular con eliminación vía renal, excretando en la orina una proteína con escasa o nula actividad biológica.

Una vez concluida la infusión, aproximadamente 30% de la dosis administrada es detectable en el plasma.

Sale de la circulación a nivel renal tanto por filtración glomerular, como por extracción peritubular.

Más del 80% de la cantidad de IL-2 recombinante distribuida en el plasma, liberada de la circulación y de paso por el riñón, es metabolizada en forma de aminoácidos en las células de revestimiento del túbulo contorneado proximal.

La desaparición plasmática relativamente rápida de IL-2 ha indicado el camino para esquemas de dosificación caracterizados por dosificaciones intravenosas cortas y frecuentes.

Hay pocos trabajos sobre la eficacia de la IL-2 en el tratamiento de lesiones por **VPH**. La expectativa es que pueda usarse en lesiones de **VPH** refractarias, a pesar de que su uso en lesiones benignas es limitado debido al riesgo de efectos adversos tales como hipotensión arterial de leve a severa, arritmia de leve a severa, taquicardia de leve a severa, angina de pecho, oliguria de leve a severa con urea y creatinina plasmáticas elevadas, disnea de leve a severa, hiperbilirrubinemia de leve a severa, elevación en grado leve a severo de las transaminasas hepáticas y de la fosfatasa alcalina, náusea de leve a severa con o sin vómito, diarrea de leve a severa, anorexia de leve a severa, eritema de leves a moderados, anemia de leve a severa, leve a moderado aumento de peso con edema, fiebre con o sin escalofríos de leve a severa, malestar y fatiga de leve a severas.

5.1.3.3 Isoprinosine:

Derivado sintético purínico que aumenta el poder de la fagocitosis, o el número de linfocitos T helpers y en la producción de mediadores clínicos de los linfocitos T (interferón, linfocina, interleucina-2) y estimula a los linfocitos T citotóxicos.

Administrado por vía oral parece ser importante para los casos de recidiva posteriores al tratamiento con agentes físicos.

1.1.3.4 Interferón:

El interferón es una glicoproteína de acción endógena e intracelular que inhibe la multiplicación de las células infectadas por el **VPH** y torna a las células no infectadas refractarias a la infección. Inhibe la multiplicación celular y la proliferación epitelial de los condilomas, estimulando también a los linfocitos T citotóxicos y a los macrófagos (inmunomodulador).

Los interferones se clasifican de acuerdo a su procedencia genética, producción celular primaria y propiedades.

Se dividen en Tipo I (Interferón alfa y beta) y Tipo II (interferón gamma).

El interferón alfa es producido por tecnología recombinante, involucrando al DNA, estimulación de leucocitos y células linfoblásticas.

El interferón beta está disponible como producto recombinante, siendo naturalmente producido por los fibroblastos.

La unión a receptores específicos de membrana celular produce una serie de efectos:

- Tipo I: asociado a acción antiviral (células no infectadas refractarias a la infección) y antiproliferativa (inhibición de multiplicación celular y proliferación epitelial de los condilomas).
- Tipo II: incrementan la actividad inmunológica.

Las diversas propiedades de los interferones permiten el uso de diferentes estrategias en el tratamiento de lesiones inducidas por **VPH**.

Las propiedades antivirales y antiproliferativas han sido observadas cuando son utilizadas en altas dosis, y los efectos inmunomoduladores prevalecen cuando se utilizan dosis bajas.

Pacientes con infección recurrente presentan reducción en la actividad de las células NK, por lo que bajas dosis de interferón determinan un aumento en la actividad de estas células, pero este fenómeno tiende a desaparecer en tratamientos muy prolongados por lo que se prefiere el uso de interferones en ciclos de tratamiento.

El uso de interferones es recomendado posteriormente a una intervención quirúrgica de lesiones visibles.

El uso de los interferones puede ser tópico como gel, crema o pomada, intralesional o sistémico. Teóricamente, con la aplicación sistémica todas las células infectadas estarían expuestas a la acción de los interferones.

Los efectos adversos consisten en el síndrome tipo gripal: fiebre, cefalea, escalofríos, mialgia, astenia, náusea, vómitos, fatiga, malestar, vértigo, lumbalgias, dispepsia. Algunos pacientes refieren dolor localizado en la zona de la inyección, ardor, prurito, irritación, dolor y ocasionalmente sangrado local.

La administración intramuscular o subcutánea del interferón alfa brinda concentraciones promedio comparables. La absorción del interferón alfa recombinante es lenta y las concentraciones máximas en el suero se logran entre 3 y 12 horas después de la aplicación

por ambas vías. La vida media de eliminación es de 2-3 horas aproximadamente y después de 16 horas es indetectable en suero.

Cuando se administra en forma intravenosa, los niveles máximos se alcanzan al finalizar la infusión y es indetectable cuatro horas después. El riñón es el sitio principal de degradación. El interferón alfa actúa en las células por medio de la unión a receptores específicos de membrana, donde se desencadena una cascada de reacciones intracelulares, mediadas por segundos mensajeros.

Los efectos generados por dichas reacciones incluyen la inducción de ciertas enzimas, supresión de la proliferación celular, actividades inmunomoduladoras e inhibición de la replicación viral en células infectadas.⁶⁵

5.2 Vacunación

La mayoría de las vacunas virales consisten en virus atenuados o inactivados por formalina. En el caso del **VPH** hay varias dificultades en la obtención de una vacuna como lo es la multiplicidad de tipos virales y los peligros potenciales en el uso de vacunas utilizando oncoproteínas como E6 o E7 de **VPH 16**.^{28,60,61}

Se ha observado que cuando los viriones son administrados sistémicamente, son altamente inmunogénicos produciendo altos títulos de anticuerpos neutralizantes¹, así que una de las líneas de investigación consiste en la obtención de inmunógenos que desencadenen una protección humoral.

Considerando ésto, se debe entender la estructura de las cápsides virales y determinar los requerimientos para su ensamblaje.

Como se mencionó anteriormente en este texto, la cápside del **VPH** esta formada por dos proteínas estructurales: L1 y L2 . El virion contiene 360 moléculas de L1 distribuidas en 72

capsómeros, cada uno de los cuales contiene 5 moléculas de L1. Se ha estimado un radio L1:L2 de 30:1 por lo que se calcula que existen 12 moléculas de L2 por virión.

Hay 60 capsómeros en un virión que son hexavalentes - rodeados por 6 capsómeros y 12 pentavalentes. Aunque no se ha confirmado la precisa disposición de las 12 moléculas de L2 en el virión, se estima que estas se encuentran en los 12 capsómeros pentavalentes.

Reconstrucciones tridimensionales por microscopía crioelectrónica indican una densidad de electrones en la cavidad central de los capsómeros pentavalentes en contraste con la cavidad central de los capsómeros hexavalentes.

L1 tiene la capacidad de formar partículas parecidas a virus que por su nombre en inglés se les conoce como VLP (Virus-Like Particles). Estas asemejan auténticas cápsides virales tanto antigénica como estructuralmente. También existen VLP que contienen tanto la proteína L1 como la L2 en un radio similar a los viriones auténticos.

Las VLP inducen niveles de anticuerpos neutralizantes de manera comparable con los viriones auténticos. Como los epitopes del **VPH** son conformacionales, las VLP deben asumir la conformación de estos viriones y no requieren de moléculas de L2.

Estudios en modelos animales han demostrado que la vacunación sistémica con VLP de L1 y VLP de L1 y L2 confieren protección casi con la misma eficiencia y que la transferencia pasiva de suero o de IgG de animales inmunizados confieren protección contra infecciones subsecuentes con tipos de virus homólogos.

Hay que hacer notar que varios tipos de **VPH** se han encontrado en el cáncer cérvicouterino y que la naturaleza específica de la protección inmune contra los diferentes tipos de **VPH** requieren el desarrollo de una vacuna polivalente. Una vacuna que incluya VLP que induzcan anticuerpos contra los tipos 18, 31 y 45 de **VPH**, prevendría el 80 % de los cánceres cérvicouterinos.

Otro gran problema, es la eficiencia con que la vacunación sistémica con VLP va a conferir protección contra la infección en la mucosa cérvico vaginal. Mientras la mayoría de los virus induce una infección potencialmente seria después de la fase virémica - la cual da la oportunidad a los anticuerpos neutralizantes en el plasma de interferir con la infectividad viral – los **VPH** inducen sus lesiones en el portal de entrada, la superficie epitelial.

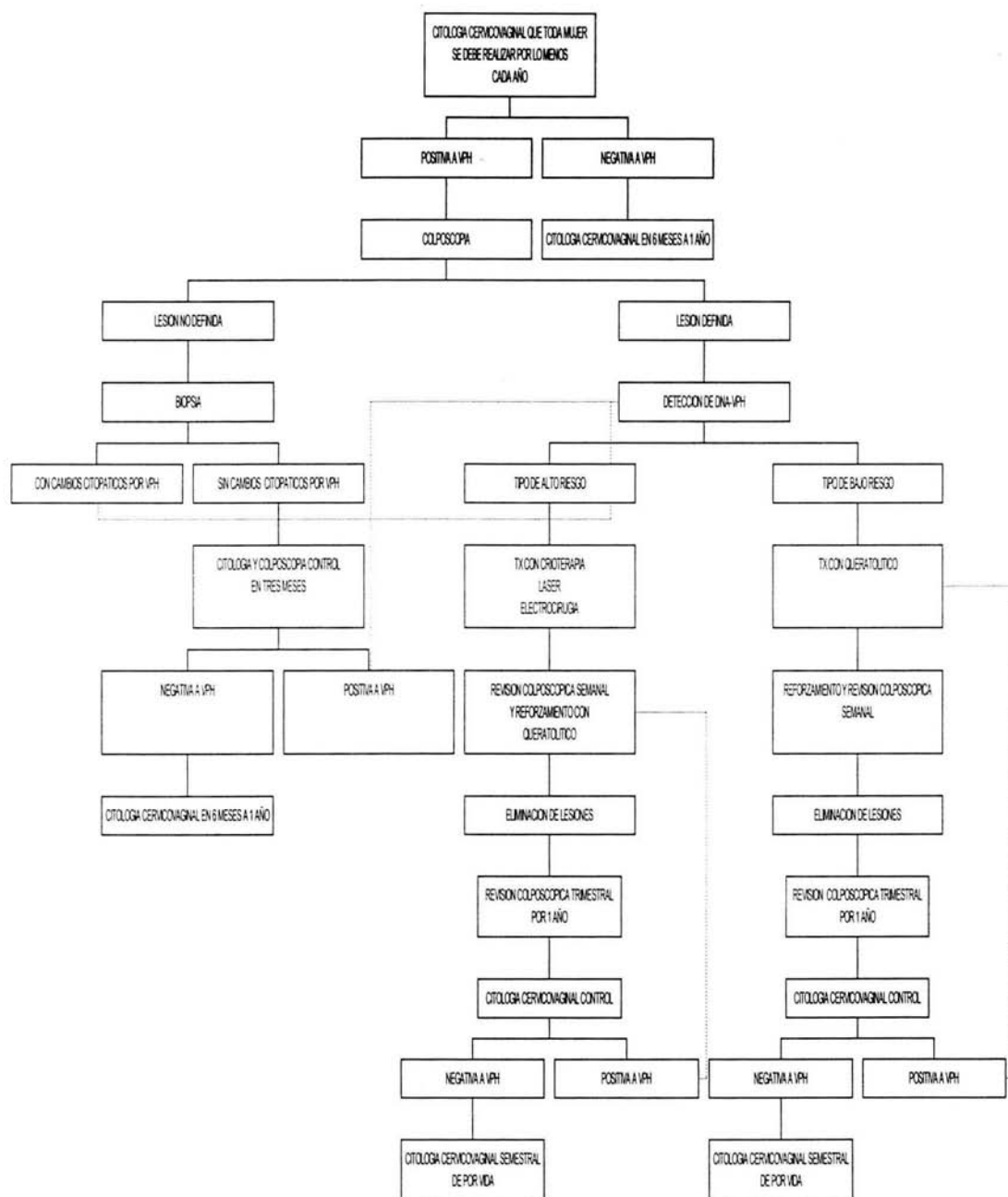
La inmunización sistémica induce IgG circulantes que pueden pasar en baja cantidad al tracto vaginal, pero difícilmente se induciría la producción de IgA vaginal. Uno de los factores necesarios para la infección por **VPH** parece ser el trauma local del epitelio por lo que puede ser posible que el exudado resultante lleve las IgG sistémicas necesarias para neutralizar al virus.^{1,61}

Otro intento para incrementar la eficacia de la vacunas basadas en VLP, es la de incluir antígenos contra proteínas virales no estructurales como E1, E2, E6 o E7.⁶⁰ Estos péptidos pueden fusionarse a L1 o L2.^{29,62}

Independiente al hecho de que L1 es la proteína estructural más abundante, es crítica para la formación de las VLP por lo que la proteína L2 parece la indicada para esta fusión.¹

Es conveniente utilizar otro tipo de terapias con la vacunación, sobre todo las que induzcan inflamación en el sitio de la lesión. Esto incrementa la respuesta inmune inducida por la vacuna, dirigiéndola a donde se necesita.^{61,62,65,70}

APENDICE 1: Diagrama de diagnóstico y tratamiento de infección por VPH



Este diagrama se basa en que toda mujer que haya empezado a tener vida sexual debe realizarse la prueba de Papanicolaou cada 6 meses o cada año como máximo.

El diagnóstico comienza con la citología exfoliativa cérvicovaginal. Si es negativa se realiza otro Papanicolaou de 6 meses a 1 año como máximo. Si es positiva se realiza una colposcopia cérvicovaginal. La colposcopia puede mostrar lesiones definidas para **VPH** y por lo tanto se procede a realizar la tipificación viral de la cual va a depender el tratamiento. Si en la colposcopia no se define la lesión, se procede a realizar una biopsia que confirme el diagnóstico. Si la biopsia es positiva se procede a la tipificación viral por medio de biología molecular, si es negativa a los cambios citopáticos por **VPH** se suele esperar 3 meses para volver a realizar una colposcopia cérvicovaginal, que de ser positiva al **VPH** requiere la tipificación viral.

La tipificación viral puede tener dos resultados, tipos de bajo riesgo y de alto riesgo. Los segundos requieren medidas terapéuticas más severas, pues son los que tienen la más alta probabilidad para desarrollar lesiones malignas.

Las pacientes con ambos tipos virales, de alto y bajo riesgo, requieren revisiones colposcópicas semanales y reforzamiento al tratamiento hasta que las lesiones hayan desaparecido. Una vez que suceda esto, se procede a realizar revisiones trimestrales cérvicovaginales por colposcopia por un año, así como reforzamiento si son necesarios. Al término de este año, se realiza una citología cérvicovaginal control, la cual debe resultar negativa para poder realizar las revisiones posteriores semestralmente. En caso contrario, las revisiones y reforzamiento volverían a ser semanales hasta que la citología sea negativa a **VPH**.

Los tratamientos más utilizados para tipos de alto riesgo son la electrocirugía, el LASER y la criocirugía reforzándose con queratolíticos como el ácido tricloroacético que es el queratolítico al que más se recurre. Los tipos de bajo riesgo pueden ser tratados por estos

mismos métodos o por un tratamiento con queratolíticos, si así lo cree necesario el médico tratante.

Es importante mencionar que cuando a una mujer se le detecta infección por **VPH** inmediatamente debe ser diagnosticada y tratada en caso necesario, junto con su pareja o sus parejas sexuales pues de no ser así, la reinfectaría y el tratamiento no tendría éxito.

DISCUSION

El virus del papiloma humano es un pequeño virus de DNA que infecta mucosas y en algunos casos, induce la transformación maligna. Ataca varias regiones anatómicas entre ellas el pene, cuello uterino, vagina, vulva, uretra, región anal, mucosa oral, faringe, laringe, mucosa nasal y piel. De estos sitios anatómicos, el cuello uterino es la región donde se ha encontrado una asociación importante entre la infección por **VPH** y el cáncer. En los demás sitios anatómicos la transformación maligna es posible pero poco frecuente.

La relación entre el cáncer cérvicouterino y la infección por **VPH** ha sido comprobada en diversos estudios. El DNA de **VPH** ha sido detectado en el 90-95 % de los casos de cáncer cérvicouterino mas se cree que el 100 % de los casos están relacionados a esta infección y que el porcentaje restante no ha sido detectado debido a fallas en los métodos de análisis del genoma viral.

El comportamiento sexual es el principal factor de riesgo para la adquisición de la infección cérvical por este virus, influida por el estado nutricional y la integridad del sistema inmune.

El **VPH** está formado por ocho proteínas tempranas (E1-E8) y dos proteínas tardías (L1-L2) donde L1 tiene la capacidad de formar partículas parecidas a virus o VLP que asemejan a cápsides virales auténticas y las proteínas E6 y E7 tienen la capacidad de intervenir en el ciclo celular interactuando con las proteínas que controlan las mutaciones en el DNA celular, provocando que éstas, se acumulen y desemboquen en una proliferación incontrolada de la célula. Las VLP se han utilizado como vacunas fusionando además antígenos contra proteínas virales como E1, E2, E6 o E7. El desarrollo de estas vacunas se ha visto frenado debido a la multiplicidad de serotipos virales y a los peligros que trae consigo utilizar oncoproteínas como E6 o E7.

Debido a la ubicación anatómica del cuello uterino, la infección por este virus puede pasar desapercibida por largo tiempo si no se realizan los estudios adecuados para la detección temprana de lesiones. Los métodos diagnósticos son la citología, colposcopia, histopatología, inmunohistoquímica, biología molecular y microscopía electrónica. El estudio de rutina es la prueba de Papanicolaou siendo la biopsia la prueba confirmatoria y la determinación del serotipo viral - oncogénico o no – el indicador del tipo de tratamiento que debe aplicarse en cada caso.

Los tratamientos varían de acuerdo a la extensión, ubicación, serotipo viral y posibilidad económica del paciente. Estos se dividen en tratamientos químicos, quirúrgicos y los estimuladores de la inmunidad. Casi siempre se recomienda la combinación de dos o más métodos para obtener una mejor respuesta del organismo.

CONCLUSIONES

La infección por **VPH** induce diversas afecciones siendo la más importante y la más estudiada el desarrollo de cáncer en la región del cuello uterino, cuyos factores de riesgo se correlacionan con la actividad sexual, motivo por el cual, es de vital importancia que se instruya a la población y se cree conciencia de que al realizarse periódicamente revisiones por medio de estudios sencillos como lo es el Papanicolaou y la colposcopia se evitaría el aumento en la incidencia de cáncer cérvicouterino, que se ha venido observando estos últimos años en la población femenina mexicana, además de inculcar, que una vez controlada la infección – que no se erradica – se debe continuar con las revisiones periódicas así como analizar y tratar a la pareja sexual para evitar la reinfección posterior al tratamiento.

También es importante mencionar que la rapidez con la que los avances científicos se adapten a los protocolos clínicos y terapéuticos está fuertemente ligada al clima de investigación de los hospitales, así como al apoyo que la sociedad ofrece a la investigación, reconociendo que esta infección es altamente peligrosa si no se detecta a tiempo, pues es asintomática hasta que la transformación maligna ha avanzado lo suficiente para provocar un problema de salud grave e inclusive la muerte. Así pues, la medida profiláctica más adecuada es la información que se le pueda dar a la población, pero además, la vacunación contra las infecciones por el **VPH** por los tipos virales más comunes tiene el potencial de prevenir la mayoría de cánceres cervicales en cualquier parte del mundo, convirtiéndose la profilaxis asociada a la inmunoterapia, a largo plazo, en un método de prevención real para las mujeres mexicanas.

BIBLIOGRAFIA

1. Lowy DR y Schiller JT. **Papillomaviruses: prophylactic vaccine prospects.** Biochim Biophys Acta 1998; 1423: M1-M8.
2. Beuther KR y Tyring S. **Human Papillomavirus and human disease.** Am J Med 1997; 102(5A): 9-15.
3. Muñoz N. **Human papillomavirus and cáncer: the epidemiological evidence.** J Clin Virol 2000; 19: 1-5.
4. Murray PR. **Manual of clinical Microbiology.** 6th USA: ASM Press; 1995: p1082-1089.
5. Singer A y Managhan JM. **Lower genital tract precancer, colposcopy, pathology and treatment.** 2nd Ed.U.K.: Blackwell science; 2000: p1-312.
6. Zamudio AA, Zepeda ZJ, Rodriguez BB y Tenorio MFR. **Evaluación del Papanicolaou y la colposcopia en el diagnóstico de la infección por el virus del papiloma humano.** Rev Fac Medic UNAM 2001; 44(1): 5-7.
7. Dillner J., **Trends over time in the incidence of cervical neoplasia in comparison to trends over time in human papillomavirus infection.** J Clin Virol 2000; 19: 7-23.
8. Gardida RL. **Trabajo monográfico de actualización: Virus del Papiloma Humano (HPV).** Tesis. Facultad de Química. UNAM. México. 1994
9. Arillo-Santillan E, Lazcano-Ponce E, Peris M, Salazar ME, Salmeron-Castro J y Alonso-De RP. **El conocimiento de profesionales de la salud sobre la**

- prevención del cáncer cervical. Alternativas de educación médica.** Rev Sal Pública de México 2000; 42(1): 34-42.
10. 19th International Papillomavirus conference, September 1-7, 2001, Costao do Santino, Florionapolis, Brazil, Program and oral presentations, Adpress Industria Grafica.
11. Lazcano-Ponce E, Rivera L, Arillo-Santillan E, Salmerón J, Hernandez-Avila M y Muñoz N. **Acceptability of a Human Papillomavirus (HPV) trial vaccine among mothers of adolescents in Cuernavaca, México.** Arch Med Res 2001; 32: 243-7.
12. Collins MKL. **Practical molecular virology: viral vectors for gene expression.** USA: Human press; 1991: p159-74.
13. Craighead JE. **Pathology and pathogenesis of human viral diseases.** China: Ed. Academic Press; 2000: p303-34.
14. Giutoli RL, Atkinson BF, Ernst CS, Rubin MM y Egan VS. **Atkinson's correlative atlas of colposcopy, cytology and histopathology.** USA: J.B. Lippicutt company; 1987: p1-235.
15. Salzman NP y Howley PM. **The Papovaviridae Volume 2 The Papillomaviruses.** USA: Ed. Plenum Press; 1987: p1-292.
16. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. **Microbiología médica de Jawetz, Melnik y Adelberg.** 16° Ed. México: El Manual Moderno; 1999:
17. Prophet EB, Mills B, Arrington JB y Sobin LH. **Métodos Histotecnológicos.** Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP): p253-

18. Bosch X, Cararah M, Comino R, Guerra A, Hernández F, Nogueira JM, Palacio V, Vidart JA y Vilata JJ. **Infección por el virus del papiloma humano (VPH). Consenso multidisciplinar del Foro VPH.** *Progresos de Obstetricia y Ginecología* 2001; 44(7): 36p.
19. Kurstak E y Kurstak C. **Comparative diagnosis of viral diseases, vol III. Vertebrate animal and related viruses.** USA: Ed. Academic Press; 1981: p69-98.
20. Ahmed ER and Chen ISY. **Persistent viral infections.** Great Britain: Ed. John Wiley and sons; 1999: p131-46.
21. Singer A y Managhan JM. **Lower genital tract precancer, colposcopy, pathology and treatment.** 2nd Ed.U.K.: Blackwell science; 2000: p1-312.
22. Vernon SD, Unger ER y Williams D. **Comparison of Human Papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting and hybrid capture.** *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 651-5.
23. Heinzl PA, Chan S, Ho L, O'connor M, Balaram P, Saveria CM, Fujinaga K, Kiviati N, Kuypers J, Pfister H, Steinberg BM, Tay S, Villa LL y Bernard H. **Variation of Human Papillomavirus Type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world.** *J Clin Microbiol* 1995; 33(7): 1746-54.
24. Frias SJA. **Aspectos clínico-epidemiológicos de los papilomavirus humanos.** *Rev Sanid Milit Méx* 1997; 51(1): 52-6.
25. Josefsson A, Livak K y Gyllensten U. **Detection and quantitation of Human Papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay.** *J Clin Microbiol* 1999; 37(3): 490-6.
26. Stanley MA. **Inmunology of human papillomaviruses.** USA: Ed. Plenum Press; 1994: p45-297.

27. Lanham S, Herbert A, Basarab A y Watt P. **Detection of cervical infections in colposcopy clinic patients.** J Clin Microbiol 2001; 39(8): 2946-50.
28. I Consenso brasileiro de HPV. Papilomavirus humano. Brasil: BG Editora e Producoes Culturais Ltda.; 2000: 142p.
29. Stern PL, Brown M, Stacey SN, Kitchener HC, Hampson I, Abdel-Hady E y Moore JV. **Natural HPV immunity and vaccination strategies.** J Clin Virol 2000; 19: 57-66.
30. Beutner KR, Tying SK, Trofatter KFJr, Douglas JM, Spotswood S, Owens ML, Fox TL, Houghman AJ y Schmitt KA. **Imiquimod, a patient-applied immune-response modifier for treatment of external genital warts.** Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(4): 789-94
31. **Modulación de la dieta y Carcinogénesis.** Boletín de Biomédicas 1997; 2(6).
32. Castañeda-Iñiguez MS, Toledo-Cisneros R y Aguilera-Delgadillo M. **Factores de riesgo para cáncer cérvicouterino en mujeres de Zacatecas.** Rev Sal Pública de México 1998; 40(4): 330-8.
33. López-Graniel C, Soler VI, Chanona VG, Gonzalez EA y Cantú LD. **Opciones de tratamiento de cáncer cérvicouterino estadio clínico IVA.** Rev Inst Nal Cancerol 2000; 46 (2): 93-9.
34. Cavalcanti SMB, Zardo LG, Passos MRL y Oliveira LHS. **Epidemiological aspects of Human Papillomavirus infection an cervical cáncer in Brazil.** Journal of infection 2000; 40: 80-7.
35. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T, Borysiewicz LK y Gelder CM. **Papillomaviruses in clinical samples.** J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3204-12.

36. Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Gissmann L y Pawlita M. **Antibodies against early proteins of Human Papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cáncer.** J Clin Microbiol 1998; 36(2): 475-80.
37. Lazcano-Ponce E, Rivera L, Arillo-Santillan E, Salmerón J, Hernandez-Avila M y Muñoz N. **Acceptability of a Human Papillomavirus (HPV) trial vaccine among mothers of adolescents in Cuernavaca, México.** Arch Med Res 2001; 32: 243-7.
38. Zamora PA y Terrés SAM. **Infección por virus del papiloma humano en mujeres y hombres mexicanos. Identificación por el sistema de captura de híbridos.** Rev Mex Patol clin 1998; 45(1): 9-15.
39. Velasco MV. **El cáncer cérvicouterino, El médico familiar frente al problema.** Rev Med IMSS 2001; 39(6): 509-15.
40. CENIDS-SSA,2000.
41. Coppleson M, Pixley E y Reid B., **Colposcopy, A scientific and practical approach to the cervix, vagina and vulva in Healt and disease.** 3rd Ed. USA: Charles C. Thomas Publisher; 1986: p1-203.
42. Langosch KM, Riethdorf S y Park TW. **Natural course of HPV infection. Usefulness of HPV analysis in cervix diagnosis.** *Pathologe.* 1999; 20(1): 15-24.
43. **p53 polymorphism and risk of cervical cáncer.** The Lancet, November 14, 1998 352
44. Papillomavirus report: The official journal of the International Papillomavirus Society. 2001; 12(5).
45. Hernández HDM, Hernández AFR, Ornelas BL.A, González LG, Andrade A y Martínez GMC. **Cáncer de cuello uterino. Factores sociales, clínicos y**

reproductivos asociados con lesiones precursoras. Rev Med IMSS. 2001; 39 (4): 325-33

46. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Hernández-Avila M, Salmerón J, Leyva H, Meijer CJL y Walboomers J M. **High prevalence of Human Papillomavirus infection in Mexican males. Comparative study of penile-urethral swabs and urine samples.** Sex Transm Dis 2001; 28(5): 277-80.
47. Preiser W, Kapur N, Snoeck R, Groves RW y Brink NS. **No apparent effect of cidofovir in epidermodysplasia verruciformis.** J Clin Virol 2000; 16: 55-7.
48. Thomas JT, OH ST, Terhune SS y Laimins LA. **Cellular changes induced by low-risk Human Papillomavirus Type 11 in keranocytes that stably maintain viral episomes.** J Virol 2001; 75(16): 7564-71.
49. Tortora GJ, Funke BR y Case CL. **Microbiology, an introduction.** 5TH Ed. USA: Benjamin Cummings Publishing Company; 1995: p347-9.
50. Evander M, Frazer IH, Payne E, Mei Qi, Hengst M y McMillan NA.. **Identification of $\alpha_6\beta_4$ integrin as a candidate receptor for Papillomaviruses.** J Virol 1997; 71(3): 2449-56.
51. Stanley M. **Papillomavirus: biology and clinical implications for inmunotherapy.** Molecular Medicine Today 1997: 239-40.
52. **Papillomavirus, the Oficial Journal of the International Papillomavirus Society,** 2002; 13(3): p65-98.
53. Astarita RW. **Practical citopathology.** USA: Ed. Churchill Livingstone; 1990:

54. Cavalcanti SMB, Zardo LG, Passos MRL y Oliveira LHS. **Epidemiological aspects of Human Papillomavirus infection an cervical cáncer in Brazil.** Journal of infection 2000; 40: 80-7.
55. Lowe SW y Lin AW. **Apoptosis in cáncer.** Carcinogenesis. 2000; 21(3):485-95.
56. Prophet EB, Mills B, Arrington JB y Sobin LH. **Métodos Histotecnológicos.** Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP): p253-8
57. Mant C, Kell B, Best JM y Cason J., **Polymerase chain reaction protocols for the detection of DNA from mucosal human papillomavirus types -6,-11,-16,-18,-31 and -33.** J Virol Methods 1997; 66:169-78.
58. Arany I, Tying SK, Brysk MM, Stanley MA, Tomai MA, Miller RI, Smith MH, McDermott DJ y Slade HB. **Correlation between Pretreatment Levels of Interferón Response Genes and Clinical Responses to an Immune Response Modifier (Imiquimod) in Genital Warts.** Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(7): 1869-73.
59. Holmes KK. **Preventing genital infections with human papillomavirus: lessons learned from the HPV epidemic.** J Clin Virol 2000; 19: 91-9.
60. Osen W, Jochmus I, Müller M y Gissmann L. **Immunization against human papillomavirus infection and associated neoplasian.** J Clin Virol 2000; 19: 75-8.
61. Schiller JT. **Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cáncer.** Molecular Medicine Today 1999; 5: 209-15.
62. Wettendorff M. **Therapeutic Vaccination.** Virus Res 2002; 82: 133-40.

63. González CMV. **Detección del Virus del Papiloma Humano en líneas celulares y evaluación de la actividad antiviral de nuevas moléculas.** Tesis. Facultad de Química. UNAM. México. 1997.
64. Martin SJ. **The biochemistry of viruses.** Great Britain: Ed. Cambridge University Press; 1978: p1-20.
65. Pitot HC. **Fundamentos de oncología.** España: Serie Reverté, Ciencia y Sociedad; 1981: p13-24.
66. Swan DC, Tucker R, Tortolero-Luna G, Follen MM, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaun RA, Reeves WC y Icenogle JP. **Human Papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type.** J Clin Microbiol 1999; 37(4): 1030-4
67. Salmerón-Castro J, Franco-Marina F, Salazar- Martínez E y Lazcano-Ponce EC. **Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer en el Instituto Mexicano del Seguro Social: 1991-1995.** Rev Sal Pública de México 1997; 39: 266-73.
68. Bounaguro FM, Tornesello ML, Salatiello I, Okong P, Bounaguro L, Beth-Giraldo E, Biryahwaho B, Sempala SDK y Giraldo G. **The Uganda study on HPV variants and genital cáncers.** J Clin Virol 2000; 19: 31-41.
69. Arany I, Tyring SK, Brysk MM, Stanley MA, Tomai MA, Miller RI, Smith MH, McDermott DJ y Slade HB. **Correlation between Pretreatment Levels of Interferón Response Genes and Clinical Responses to an Immune Response Modifier (Imiquimod) in Genital Warts.** Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(7): 1869-73.
70. Gardida RL. **Trabajo monográfico de actualización: Virus del Papiloma Humano (HPV).** Tesis. Facultad de Química. UNAM. México. 1994

71. Fenner F, McAustan BR, Mims CA, Sambrook J y White DO. **The biology of animal viruses.** 2nd edition. USA: Ed. Academi Press; 1974: p1-451.
72. Van den Brule AJC, Snijders PJ, Meijer CJ, Wallboomers JM. **PCR based detection of genital HPV genotypes, an update and future perspectives.**
Papillomavirus Report 1993;4:95.