

## Revista de la Asociación Dental Mexicana

Volumen **62**  
Volume

Número **6**  
Number

Noviembre-Diciembre **2005**  
November-December

*Artículo:*

### Virus del papiloma humano; visión actual en biomedicina

Derechos reservados, Copyright © 2005:  
Asociación Dental Mexicana, AC

Otras secciones de  
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in  
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



# Virus del papiloma humano; visión actual en biomedicina

Gloria Premoli,\* Anajulia González,\* Juana Villarreal,\* Tiziana Percoco,\* Pierina Pietrocino,\*\* Luis Aguilera\*\*\*

\* Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Mérida, Mérida, Venezuela.

\*\* Laboratorio de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes.

\*\*\* Instituto de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología. Universidad Autónoma de Zacatecas-México.

## Resumen

Los papilomavirus humanos (VPH) son virus epiteliotrópicos de doble cadena de ADN que producen lesiones verrugosas en piel y mucosas. Actualmente se conocen más de 100 tipos, de los cuales algunos de ellos tienen potencial oncogénico variable dependiendo de la capacidad de transformación e integración en la célula hospedadora y están fuertemente asociados con cáncer cervical así como otros tipos de cáncer. Aun cuando los métodos tradicionales como la técnica de Papanicolaou sigue siendo una herramienta valiosa para el tamizaje de las lesiones producidas por el VPH, en las últimas décadas se han usado técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, Hibridización *in situ*, captura de híbridos entre otras; las cuales son más efectivas en cuanto a la detección de la infección. El objetivo de esta revisión es proporcionar información amplia y actualizada sobre el VPH que permitirá el mejor entendimiento del virus, su comportamiento patológico, epidemiológico, nuevos enfoques de diagnóstico y recientes avances en el área preventiva.

**Palabras clave:** VPH, neoplasias, virus papiloma humano, morfología, diagnóstico, herramientas moleculares, vacunas.

## Abstract

*Human papillomaviruses (HPV) are epitheliotropic and double-stranded DNA viruses, which produce verrucous lesions in mucosae and skin. There are more than 100 types, and some of them have an oncogenic potential which depends of its capacity of transformation and integration into the host cell. HPV are strongly associated with cervical and other kind of cancer. Even though the traditional diagnostic methods like Papanicolaou cytology (Pap) continues being a valuable tool for the tamizaje of the injuries produced by the VPH, in the last decades they have been used molecular techniques like the polymerase chain reaction, Hybridization *in situ*, capture of hybrids among others; which are more effective in the detection of the infection has helped in the screening of HPV however, molecular techniques such as polymerase chain reaction and hybrids capture has been used in the last years showing better diagnostic efficiency. The main purpose of this review is to give an update of HPV which will help to have a better understanding of the virus, its pathological and epidemiological behavior, and the latest in technology for its diagnostic and prevention.*

**Keywords:** HPV, neoplasia, human papilloma virus, morphology, diagnostic, molecular tools, vaccines.

Recibido para publicación:  
26-Noviembre-2005.

## Introducción

Los papilomavirus humanos son pequeños virus de ADN de doble cadena con una cápside proteica y al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse; son epiteliotrópicos y una vez que alcanzan las

células basales pueden permanecer en forma episomal, en estado latente, o bien abandonar esa latencia y aprovechar la diferenciación celular propia del epitelio cervical.<sup>1</sup> De este modo, paralelamente a la maduración del epitelio cervical, los VPHs expresan sus genes de forma secuencial; en primer lugar los genes tempranos (E1...

E8), en las capas basales y posteriormente, en capas superficiales del epitelio más diferenciado, expresan sus proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo. En determinadas circunstancias fisiológicas de “permisividad inmunológica” y tras un periodo de persistencia de la infección, generalmente largo, las partículas de ADN viral que se encuentran en forma episomal, sufren un proceso de integración dentro del genoma celular y con ello una serie de acontecimientos que conducen a un proceso de bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y Rb) y, como consecuencia, alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical seguidas de un acúmulo de errores genéticos (clastogénesis) que son la base de la transformación tumoral.<sup>2</sup>

Las manifestaciones de la infección por papilomavirus (VPH) se han conocido desde hace mucho tiempo por la presencia de verrugas,<sup>1</sup> su origen viral fue demostrado hace más de un siglo cuando se comprobó que las verrugas caninas podían ser transmitidas a animales saludables usando un extracto ultrafiltrado de dichas verrugas; y sólo fue diez años más tarde que se demostró que en el humano podía transmitirse de manera similar.<sup>3</sup>

El virus del papiloma humano puede clasificarse atendiendo a su diversidad genética, de modo que cuando dos secuencias víricas presentan en la región L1 una homología inferior al 90% pueden considerarse genotipos distintos. La trascendencia de esta diversidad genética no sólo reside en la posibilidad de clasificar los distintos papilomavirus, sino que este esquema de genotipo se corresponde con la relación filogenética de los genotipos, su tropismo celular y, de forma interesante, su potencial patógeno.<sup>4,5</sup>

Actualmente se han caracterizado más de 100 tipos de VPH, con más de 40 tipos anogenitales, de los cuales 15 de ellos son oncogénicos; y en humanos constituyen uno de los grupos virales más frecuentes que infectan el epitelio de piel y mucosas: conjuntivas, cavidad oral, laringe, árbol traqueobronquial, esófago, vejiga, ano y tracto genital.<sup>3,6</sup>

La implementación de nuevas tecnologías de diagnóstico tanto histopatológicas como moleculares han ayudado a mejorar la detección de este virus no sólo en la mucosa cervical en donde se observa un gran porcentaje de afección por VPH sino que se ha mejorado la detección en otras áreas anatómicas, en las cuales el virus era difícil de detectar.<sup>7</sup> Actualmente se han diseñado varias estrategias para desarrollar vacunas contra estos virus que permitan eventualmente prevenir infecciones virales y el desarrollo de cáncer.

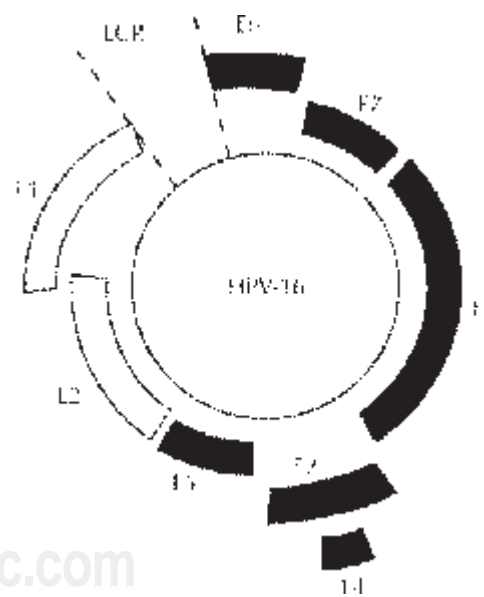
En esta revisión nos abocamos a un tema de gran importancia mundial, ya que en los últimos 30 años se

ha observado un alarmante incremento de la prevalencia de la infección por el VPH siendo de vital interés revisar los últimos avances que se han realizado en el conocimiento básico y en el campo de la biomedicina referidos a los papilomavirus y su relación con los procesos oncogénicos.

## Morfología y clasificación

Los virus del papiloma humano o papilomavirus (VPH) son un grupo de virus de ADN que pertenece a la familia *Papillomaviridae*, no poseen envoltura, y tienen un diámetro aproximado de 52-55 nm.<sup>5,8</sup> Las partículas virales están compuestas por una cápside proteica, conformada en un 95% por la proteína L1 y en un 5% por la proteína L2, las cuales se ensamblan para formar capsómeros icosaédricos. En el interior de la cápside se encuentra un ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases, constituido por ocho genes y una región regulatoria no codificante: LCR (*Figura 1*), la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedador necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación.<sup>5</sup>

El genoma del VPH, lo conforman dos tipos de genes, aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como genes E (del inglés Early = temprano), y aquellos que son codificados durante las etapas tardías del ciclo replicativo del mismo, conocidos



**Figura 1.** Estructura esquemática del genoma del VPH 16. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la regulación viral (bloques negros). La transcripción de estos genes es mediada por secuencias de la región regulatoria (LCR) que también contiene sitios de replicación viral. Los dos genes de la región tardía codifican las proteínas de la cápside viral (bloques blancos). Tomado de: ver referencia (9).

como L (del inglés Late = tardío). Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (aunque se considera que E4 es en realidad un gene tardío), y dos tardíos: L1 y L2. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. Por otro lado, los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral.<sup>5,10</sup>

A diferencia de lo que ocurre en otras familias virales, las proteínas de la cápside de los diversos tipos de VPH son antigénicamente similares, por lo tanto los VPH no pueden ser clasificados en serotipos; de tal forma, que su clasificación en genotipos y subtipos se basa en el porcentaje de homología de su secuencia de ADN. Hasta el momento han sido caracterizados aproximadamente 100 tipos diferentes de VPH, los cuales pueden clasificarse en dos grupos principales, de acuerdo con el sitio de infección: cutáneos y mucosos. En el *cuadro I* se presenta un resumen de las lesiones más comunes asocia-

das con diferentes tipos de VPH. Los tipos de VPH mucosos asociados con lesiones benignas (VPH tipos 6 y 11 principalmente, VPH -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81 entre otros) son conocidos como tipos de “bajo riesgo”, mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (VPH-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -68, -73, -82) son conocidos como virus de “alto riesgo”.<sup>4,5,9,11</sup>

Debemos tener en cuenta que ciertos tipos virales pueden aparecer en lesiones cancerosas como resultado de una coinfección y no ser los agentes etiológicos causales de la transformación tumoral. Como es lógico, los estudios epidemiológicos atribuyen variaciones poblacionales importantes en la prevalencia y relación causa/efecto de los diferentes tipos virales, sin embargo, es indudable la gran prevalencia o implicación en las patologías de alto grado y carcinomas que en nuestra población tienen los tipos 16 y 18 y la que los tipos 6 y 11 tienen en las patologías de tipo condilomatoso.

### Epidemiología

La epidemiología de las infecciones por VPH no se conoce con precisión, ya que las técnicas para investigación seroepidemiológica son insuficientes y los diagnósticos de infecciones no genitales se realizan en base al examen físico y posteriormente al examen histológico, aunado a esto, la condición de una infección latente sin evidencias sintomatológicas o histológicas no favorece a un dato real de infección por el virus ya que la condición latente sólo puede ser diagnosticada por técnicas moleculares que no son rutinariamente utilizadas. Sin embargo, los VPH están distribuidos en toda la población, y algunos de ellos están asociados con procesos malignos como por ejemplo el del tracto genital (cáncer cervical),<sup>12</sup> carcinoma escamoso bucal,<sup>13</sup> carcinoma de laringe,<sup>14-16</sup> de amígdalas<sup>17</sup> e incluso ha habido reportes de carcinoma de pulmón<sup>18</sup> lo que demuestra valedero el continuo interés y preocupación del potencial rol de los VPH en la patogénesis de los tumores malignos.

El VPH genital es considerado como una de las enfermedades de transmisión sexual más común en la población mundial. Se calcula que el 60-75% de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de VPH genital, sugiriéndose que la prevalencia en hombre es similar al de las mujeres. Los VPH de alto riesgo han sido encontrados en el 99.7% de los tumores cervicales analizados. Anualmente se detectan alrededor de 500,000 nuevos casos de cáncer cervical, el 80% de dichos casos se encuentra en países en vías de desarrollo. En Venezuela este tipo de cáncer se ha convertido en la primera causa de mortalidad y morbilidad por cáncer en la mujer venezolana, detectándose anualmente cerca de 3,500

**Cuadro I.** Lesiones asociadas a diferentes tipos de virus del papiloma humano.

Tipo de VPH	Lesión asociada
<b>Cutáneos</b>	
1,4	Verruca plantaris
2,4	Verruca vulgaris
3,10	Verruca plana
5,8,14,17,20	Epidermodisplasia verruciformis
7	Verrugas del carnicero
9,12,15,19,21-25,36,46,47	Epidermodisplasia verruciformis
41	Carcinoma de células escamosas cutáneas
<b>Mucosos</b>	
6	Condiloma acuminado
11	Papiloma laríngeo
13,32	Hiperplasia epitelial focal
16,18,31,33,35,45,51,52,56	NIC, Carcinoma de cérvix
30	NIC, Carcinoma laríngeo
39	NIC, Carcinoma de cérvix y pene
34,58	NIC
40	NIC, NIP
42	NIC, papiloma vulvar
43	NIC, hiperplasia vulvar
44	NIC, condiloma vulvar
54	Condiloma acuminado
55	Papulosis Bowenoides
57	NIC
59	NIV
Referencia 24	
NIC = <i>Neoplasia intraepitelial del cérvix</i>	
NIP = <i>Neoplasia intraepitelial del pene</i>	
NIV = <i>Neoplasia intraepitelial de la vulva</i>	

nuevos casos, de las cuales mueren aproximadamente 1,300 mujeres por esta causa cada año.<sup>19-24</sup> En la cavidad bucal, la incidencia del papiloma es ligeramente mayor en el sexo femenino siendo su ubicación más frecuente en lengua, paladar encía y labio respectivamente,<sup>25</sup> sin embargo, el porcentaje de casos con evolución a malignidad en esta zona no es alarmante.<sup>26</sup>

A pesar de que se han descrito otras formas alternativas de transmisión viral (vertical o materno-fetal y horizontal o por fomites), su potencial impacto en el número de infecciones por VPH o en su patología asociada es probablemente muy pequeño.<sup>19,20,27-31</sup>

La carcinogénesis cervical es de gran trascendencia dados los indicios crecientes que indican que los mismos tipos virales que afectan al cuello de útero están asociados etiológicamente a una fracción de otros tumores genitales en ambos sexos (pene, vulva, vagina y ano), así como a algunas neoplasias presentes en la cavidad oral, orofaringe, y piel.<sup>32</sup>

## Ciclo de replicación

El ciclo de los VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas; exhibiendo un alto grado de tropismo por el epitelio escamoso en diferentes regiones corporales en donde los tipos asociados a lesiones anogenitales se encuentran solamente en la región genital, mientras que los tipos asociados con verrugas cutáneas en manos y pies se encuentran restringidos a dichas áreas. Es posible que las diferencias en la distribución de los receptores para el VPH en dichas células sea un factor importante para la presencia restringida de tipos específicos de VPH, sin embargo, los elementos más importantes que determinan la especificidad de los virus son los factores de transcripción producidos por las células hospederas. La expresión de los genes de los diferentes tipos de VPH regulan de manera estricta y específica factores de transcripción, como AP-1, el factor específico de keratinocitos, NF-1/CTF, CEFI, CEFII y TEFI y algunos factores de origen hormonal VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, microheridas y abrasiones del tejido.<sup>2,11</sup>

El virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula  $\alpha 6$ -Integrina. Una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales, en donde el ADN viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular.<sup>33</sup>

Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. El análisis de las moléculas de ARN mensajero viral durante las diferentes etapas de diferenciación de las células infectadas demuestra que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo, la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los keratinocitos totalmente diferenciados de los estratos córneos, donde también ocurre el ensamblado de las cápsidas virales que dan lugar a la formación de viriones.<sup>2</sup>

Los VPH no presentan una fase lítica, por lo tanto se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, la cual es liberada cuando las células terminales del estrato córneo sufren un proceso de descamación.<sup>12,24</sup>

## Patología

Como su nombre lo indica, los VPH inducen la formación de lesiones papilomatosas. La manifestación morfológica más común de la infección por VPH es la verruga, la cual es esencialmente una hiperplasia epitelial benigna con acantosis y papilomatosis considerables.

El proceso neoplásico asociado con el VPH no se limita al epitelio escamoso, sino que también está involucrado con el desarrollo de lesiones de células columnares. La infección por VPH produce cambios importantes en la morfología celular, por ejemplo se observa la formación de una amplia vacuola perinuclear, el núcleo agrandado, irregular e hipercrómico, además de ser posible encontrar binucleaciones. Las células que han sufrido estos cambios morfológicos son conocidas como koilocitos y son consideradas como la "huella digital" del VPH.<sup>34,35</sup>

Sin embargo, la infección por VPH no siempre produce la formación de la lesión papilar típica, también puede producir lesiones conocidas como condiloma plano, que comparten las mismas características citológicas del condiloma acuminado, pero no se alzan sobre la superficie adyacente, por lo que no son visibles a simple vista.<sup>5</sup> En el tracto genital las verrugas (*condyloma acuminatum*), son comúnmente múltiples y ocurren con frecuencia en la vulva, extendiéndose hacia el portio vaginalis y el cérvix, produciendo lesiones filiformes pedunculadas que pueden coalescer produciendo masas similares a tumores.

La mayoría de las infecciones por VPH desaparecen después de algunos meses posteriores al diagnóstico. Las lesiones cervicales de bajo grado también tienden a regresar a la normalidad, sin embargo, éstas también pueden progresar hacia lesiones de alto grado con un riesgo absoluto del 15-25% en el transcurso de 2 a 4 años, mientras que las lesiones de alto grado tienen una probabili-

dad del 50% de progresar a cáncer. En la mayoría de los casos la progresión no es un fenómeno abrupto, sino que transcurre lentamente a través del desarrollo de lesiones pre-malignas y pre-invasivas.

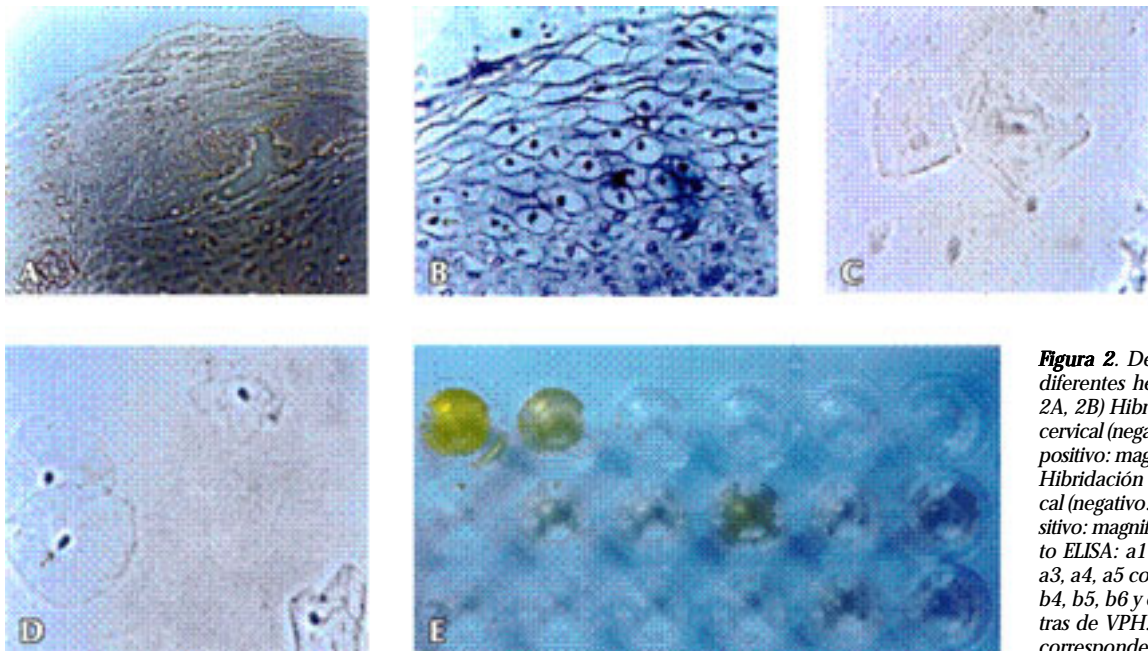
Dichas lesiones pre-malignas del cérvix son conocidas neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y se dividen en tres grados (NIC1, 2 y 3) de acuerdo con la severidad de la lesión. Las características histológicas esenciales de la NIC incluyen la presencia de koilocitos, ausencia de diferenciación citoplásmica o estratificación ordenada y presencia de células multinucleadas. Cuando estas modificaciones abarcan menos del tercio bajo del epitelio cervical se considera una NIC1; cuando las células afectadas se extienden más allá del tercio bajo del epitelio, pero no abarcan el tercio alto se considera NIC2; mientras que NIC3 es la condición en la cual las células indiferenciadas, no estratificadas y basaloides ocupan más de dos tercios, o incluso todo el espesor del epitelio cervical.<sup>2</sup>

El carcinoma micro-invasor es el estado inicial del cáncer cervical, en él las células neoplásicas han invadido la membrana basal del epitelio. Cuando las células malignas infiltran el endocérvix y se asocian para formar tumores exofíticos que pueden manifestar una ulceración superficial, se considera que se ha desarrollado un cáncer invasor, mismo que posee la capacidad de extenderse hacia el tejido vaginal, paracervical y parametrial adyacentes, para generar eventualmente metástasis lejanas (Figura 2). En resumen, la historia natural de una infección por VPH en carcinoma cervical puede resumirse en 3 rutas:

1. Remisión completa (clearance) del VPH después de una infección aguda, es decir, luego de un periodo de incubación de 3 semanas a 8 meses aparecen lesiones condilomatosas o aplanadas típicas de la infección con una posterior eliminación del virus por parte del sistema inmune;<sup>22,36</sup>
2. Infección latente, que se presenta sin evidencia clínica ni histológica, sólo es posible detectarla con métodos de detección del ADN. Se desconoce el tiempo y las condiciones para que una lesión latente evolucione a una fase subclínica o clínica aunque los estados de inmunodeficiencia pueden activarla;<sup>36,37</sup>
3. Infección progresiva y activa, hay evolución a lesiones precancerosas (neoplasia intraepitelial cervical (NIC1, NIC II, carcinoma *in situ*), de los cuales un porcentaje muy pequeño regresa a la normalidad, ya que por lo regular es seguido de una lesión invasiva o cancerosa.<sup>6,36</sup>

### Factores predisponentes para el desarrollo de cáncer por VPH

Mucho se ha hecho énfasis que la evolución a malignidad de los epitelios infectados con VPH depende de la asociación de varios factores y que no sólo la infección con tipos oncogénicos de VPHs es suficiente para desarrollar cualquier tipo de cáncer, ya que es necesario la presencia de una serie de cofactores que ayudan a la progresión a malignidad del epitelio afectado.<sup>2,19,38-40</sup> Entre ellos encontramos:



**Figura 2.** Detección de VPH usando diferentes herramientas moleculares: 2A, 2B) Hibridación in situ de biopsia cervical (negativo: magnificación 400X, positivo: magnificación 800X); 2C, 2D) Hibridación in situ de citología cervical (negativo: magnificación 400X, positivo: magnificación 400X); 2E) Formato ELISA: a1 y a2 controles positivos. a3, a4, a5 controles negativos. b2, b3, b4, b5, b6 y c5 corresponden a muestras de VPH. b1, c1, c2, c3, c4, y c6 corresponden a pozos sin muestra.

1. Factores de adquisición: Como la conducta sexual de riesgo (edad de primer coito, promiscuidad, relaciones sexuales sin preservativos y/o otros tipos de prácticas sexuales) y los varones de riesgo elevado (promiscuos, no circuncidados, falta de higiene).
2. Factores de progresión/regresión; en los cuales se encuentran:
  - a. Virales: Genotipos y variantes, la integración al ADN celular y la carga viral.
  - b. Genéticos: Respuesta inmunitaria y susceptibilidad genética.
  - c. Medio-ambientales: Edad, tabaco, contraceptivos orales, paridad, estado de inmunosupresión y VIH, e inclusive otras enfermedades de transmisión sexual como *Chlamydia sp* y Herpes virus.
3. Factores de invasión: como los factores angiogénicos.

### Mecanismo de transformación

Las regiones E6 y E7 son esenciales para los procesos de oncogénesis, ya que ellas producen las proteínas necesarias para la transformación. En los VPH de alto riesgo, la oncogenicidad de E6 y E7 se debe en parte, a que estas proteínas se unen a las proteínas supresoras de tumores p53 y del gen de retinoblastoma (Rb) respectivamente y les impiden actuar de forma normal.<sup>37,41</sup>

La proteína E6 de los VPH de alto riesgo se une con alta afinidad a la molécula conocida como p53, induciendo su degradación. La proteína p53 es un importante factor regulador de la replicación celular y es conocido como el principal represor de tumores en el ser humano, p53 es capaz de detectar daños sufridos por el DNA en cualquier célula del organismo. Si el daño ha sido en una etapa del ciclo celular en la que aún no ha ocurrido la replicación del DNA, p53 envía una señal para que el ciclo celular se pare y el daño sea reparado, una vez ocurrida la reparación la célula continúa su ciclo normal. Cuando el daño es sufrido durante o inmediatamente después de la replicación del DNA, p53 envía una señal para detener el ciclo celular, y como a este nivel es imposible reparar los daños, la célula sufre un proceso de eliminación por apoptosis dirigido por la misma p53. Con esto no se permite que los daños causados al DNA sean heredados a células hijas que pueden, eventualmente, ser el origen de un tumor maligno.<sup>36,42</sup>

Por otra parte, la proteína E7 se une específicamente al producto del gen represor de tumores Rb. Rb fue descubierto y caracterizado en el retinoblastoma, es un factor regulador del ciclo celular, ya que se une directamente al factor transcripcional E2F, que a su vez induce la transcripción de elementos involucrados con la replicación celular. La proteína E7 de los VPH de alto riesgo tiene una alta afinidad por el sitio de unión de Rb a E2F,

cuando la célula ha sido infectada por el virus la proteína E7 se une a este sitio en Rb impidiendo que éste mantenga controlado a E2F, el cual queda libre e induce la replicación celular continua. De esta manera E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células, produciendo tumores cervicales a largo plazo.<sup>37,41</sup>

Además, la actividad de los genes E6 y E7 está regulada por la expresión del gen E2, el cual reprime la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7. Cuando el genoma viral se integra, se observa un sitio de ruptura del ADN viral a nivel del gen E2, perdiéndose sus funciones y en consecuencia los oncogenes virales E6 y E7 se sobreexpresan al unirse a los proto-oncogenes celulares cercanos o ubicados en los "sitios frágiles" o sitios de inserción del ADN celular. Esta transformación es independiente de la existencia de lesiones benignas o malignas.<sup>42</sup>

### Métodos diagnósticos

A pesar de la dificultad en el establecimiento de un sistema de cultivo que permita aislar el virus de las muestras clínicas debido a su tropismo específico por el epitelio escamoso, las infecciones por VPH pueden ser diagnosticadas a través de los indicios clínicos, citológicos, histopatológicos y pruebas moleculares.<sup>43</sup>

El método diagnóstico más ampliamente usado para la detección del VPH es la citología, conocida como prueba del Papanicolaou.<sup>16,44-47</sup> La prueba se desarrolla en células obtenidas de un raspado de la pared cervical, que son posteriormente colocadas en una laminilla, fijadas, teñidas y estudiadas al microscopio. La presencia de koilocitos es el indicador clave de una infección por VPH, sin embargo el grado de avance de la lesión debe ser determinado por un estudio histopatológico, que permite diferenciar los estratos del epitelio afectado, de este modo detectar tanto el nivel de infiltración celular como las áreas de invasión; es por esto que el diagnóstico histopatológico es considerado como la prueba de oro para la detección y clasificación de las lesiones inducidas por VPH pero sin una determinación del tipo de VPH involucrado.<sup>34,48</sup>

La terminología utilizada en el diagnóstico citológico e histopatológico de las lesiones cervicales pre-malignas ha cambiado gradualmente. Lo que inicialmente se conocía como displasia leve corresponde a NIC1, de igual forma la displasia moderada corresponde a NIC2 y la displasia severa a NIC3, en la clasificación citológica del sistema Bethesda la infección por VPH y la NIC1 han sido agrupadas como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL por sus siglas en inglés), mientras que las NIC2 y NIC3 han sido designadas lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL por sus siglas en inglés).<sup>49-52</sup> También pueden ser visualizadas áreas específicas de células infectadas por VPH gracias a

la reacción producida por la aplicación de ácido acético diluido sobre el tejido afectado. La reacción produce la formación de zonas blanquecinas (lesión acetoblanca) temporales, que indican la posible presencia del virus. La visualización de tales zonas se hace a través de un colposcopio, y esta técnica es normalmente usada como una herramienta para la toma dirigida de biopsias a ser analizadas por histopatología, y posteriormente para el tratamiento de las lesiones.<sup>43</sup>

Aun cuando los cambios morfológicos asociados con la infección por el virus son fácilmente reconocidos y relativamente característicos, las metodologías basadas en dichos cambios no permiten verificar la presencia del ADN viral, ni tampoco determinar el tipo de VPH presente en una lesión, lo cual es una información de gran relevancia considerando que algunos tipos virales están estrechamente asociados con el desarrollo de condiciones malignas.

La detección de los anticuerpos para las proteínas E6 y E7 ha sido de gran validez, ya que la presencia de altos niveles de estos anticuerpos (anti-E6 y anti-E7) está asociada con la progresión a malignidad de la enfermedad debido a la gran producción de E6 y E7 por las células cancerosas. Es por esto que la utilización de proteínas recombinantes para estos antígenos, y la producción de proteínas estructurales de la región L1 y L2 como partículas parecidas a virus (VLP) han sido utilizadas para pruebas serológicas tipo ELISA.<sup>53,54</sup> En nuestro centro, el sistema ELISA ha sido utilizado desarrollando una variable que es la detección de secuencias nucleotídicas específicas de ADN de cepas VPH-6, VPH-11, VPH-16 y VPH-18 marcadas con digoxigenina y la utilización de sondas marcadas con terminal transferasa y oligos de captura específicos para el virus (*Figura 2e*). En el estudio se analizaron cuatro cepas de VPH evidenciando que el ensayo de hibridación colorimétrica fue capaz de identificar la unión de los oligo de captura con las respectivas cepas; la reacción colorimétrica mostró valores de absorbancia por encima del cutoff 0.354 nm. Todas las muestras de ADN-VPH probadas reconocieron específicamente a los Oligo poli-dT con un promedio de absorbancia de (1.794 nm) y ninguna reactividad fue encontrada en los grupos controles negativos con un promedio de absorbancia de (0.286 nm). Cada muestra de VPH fue probada por triplicado.

Desafortunadamente, estas técnicas serológicas no han tenido el auge que se desearía a pesar de ser una alternativa favorable para el muestreo poblacional, pues el formato ELISA ha sido utilizado para la detección masiva de muchas otras patologías debido a su fácil ejecución, alta reproducibilidad y bajo costo en relación con pruebas moleculares. Sin embargo, para el caso de VPH utilizando la reacción antígeno-anticuerpo no se ha logrado la sensibilidad adecuada y el número de falsos positivos no está acorde con niveles de confiabilidad, debido prin-

cialmente al tipo de respuesta inmune, o tipo de VPH.

Todas estas consideraciones han justificado el uso y desarrollo de las pruebas moleculares, las cuales gracias a su gran sensibilidad y especificidad han tomado un puesto invaluable en el diagnóstico de VPH en muestras clínicas. Además, éstas permiten el diagnóstico de la infecciones latentes, la detección del ADN, incluso cuando está integrado, caracterizar el genotipo viral y detectar la presencia de infecciones mixtas y los más recientes facilitan la cuantificación de la carga viral.<sup>55</sup> Existen sistemas ampliamente desarrollados para el diagnóstico de VPH por estos métodos como es el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligos consenso que amplifican regiones altamente conservadas entre los VPH (*Cuadro II, Figura 3*). Las ventajas ofrecidas por este tipo de técnica han sido muy beneficiosas por la alta especificidad y sensibilidad que nos ofrece en la detección y genotipificación del VPH.

Para definir la región a ser amplificada se utilizan primer consensos degenerados o primer generales de regiones conservadas del genoma, dentro de los ensayos universales de detección de VPH se incluyen los sistemas MY9/MY11, GP5/GP6, GP5+ /GP6+ , OBI/II, CPI/CPII y más recientemente SPF1/SPF2,<sup>56</sup> pudiéndose de este modo destacar de 10 a 100 copias del genoma viral. Sin embargo, el manejo adecuado de las muestras y la optimización de las condiciones de trabajo son condiciones indispensables para aminorar el riesgo de contaminación cruzada, dada la elevada sensibilidad de esta reacción.<sup>57</sup>

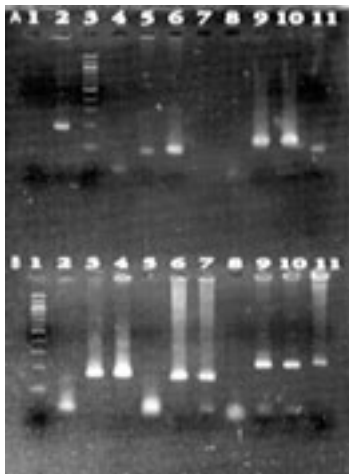
En los principales centros de referencia se ha logrado el desarrollo y unificación de criterios de este tipo de pruebas moleculares para el diagnóstico de VPH, utilizando varias pruebas estratégicas en este tipo de diagnóstico adaptadas a las condiciones e infraestructura de cada centro. Un diseño utilizado para el diagnóstico molecular del VPH en diferentes tipos de muestras se encuentra reflejado en la *figura 4*, la cual representa la cronología de los diferentes sistemas de amplificación que han sido utilizados para la detección molecular del VPH, dando así mayor validez a la tipificación del virus a través de estos métodos moleculares, lo cual en nuestra experiencia a nivel de estudios piloto están dando resultados satisfactorios en poblaciones normales y de alto riesgo.

Otra técnica que ha demostrado ser muy eficaz a nivel molecular para la detección de VPH y de otras patologías es la hibridación *in situ* (HIS) que a diferencia de otras metodologías de hibridación de ácidos nucleicos permite detectar, localizar y visualizar secuencias nucleotídicas específicas a nivel celular con la ventaja adicional de preservación de la morfología tisular y de la utilización de sondas marcadas con complejos no radioactivos como es el caso de la biotina, digoxigenina, etc. La detección de VPH en muestras de biopsias embebi-



Cuadro II. Primers usados para la detección del VPH.

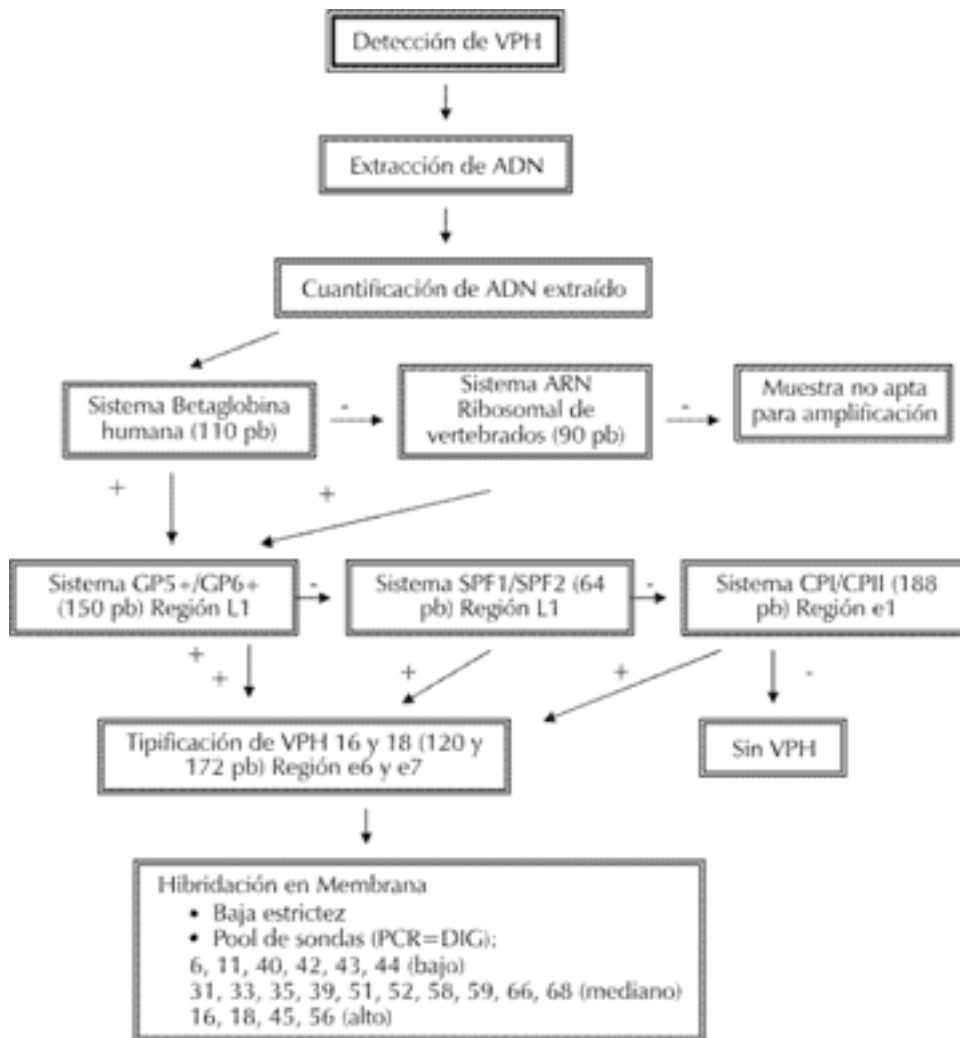
Gen	Secuencia	Producto de amplificación	Ref.
PCO3	5´-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC´-3´	110 pb.	(51)
PCO4	5´-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC´-3´		
ARNRVF	5´-TGA CGG AAG GGC ACC ACC´-3´	90 pb.	(52)
ARNRVR	5´-GGG CCG GGT GAG GTT TC´-3´		
GP5+	5´-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC´-3´	150 pb	(53)
Gp6+	5´-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C´-3´		
SPF1	5´-GCI CAG GGI CAY AAY AAT GG´-3´	64 pb	(54)
SPF2	5´-GTi GTA Tci ACW ACA GTA ACA AA´-3´		
CpI	5´-TTA TCW TAT GCC CAY TGT ACC AT´-3´	188 pb	(53)
CpII	5´-ATG TTA ATW SAG CCW CCA AAA TT´-3´		
6 ESP F	5´-GCT GGA TAT GCA ACA ACA GTT G´-3´	189pb	(55)
6 ESP R	5´-CAT GCA TGT TGT CCA GCA GTG´-3´		
11 ESP1	5´-CGC AGA GAT ATA TGC ATA TGC´-3´	80pb	(53)
11 ESP2	5´-AGT TCT AAG CAA CAG GCA CAC´-3´		
16 ESP1	5´-TCA AAA GCC ACT GTG TCC TG´-3´	120pb	(53)
16 ESP2	5´-CGT GTT CTT GAT GAT CTG CA´-3´		
18 ESP1	5´-CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT´-3´	172pb	(53)
18 ESP2	5´-TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT´-3´		
31 ESP1	5´-CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC´-3´	153pb	(53)
31 ESP2	5´ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC3´		
33 ESP1	5´-AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG´-3´	211pb	(53)
33 ESP2	5´-ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG´-3´		
35 ESP1	5´-CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA´-3´	230pb	(53)
35 ESP2	5´-GGG GCA CAC TAT TCC AAA TG´-3´		
I: Inosina	Y: C+ T W: A+ T S: G+ C		



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados de las diferentes reacciones de PCR, coloreado con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100 pb (A3 y B1). A: sistema específico VPH 6 de 189 pb (A1: control negativo sin ADN, A2: paciente infectado); sistema específico VPH 11 de 80 pb (A4: control negativo sin ADN, A5: control positivo, A6, A11: pacientes infectados); sistema específico VPH 16 de 120 pb (A8: control negativo sin ADN negativo, A9: control positivo, A10: paciente infectado). B: sistema específico VPH 18 de 172 pb (B2: control negativo sin ADN negativo, B3: control positivo, B4: paciente infectado); sistema específico VPH 31 de 153 pb (B5: control negativo sin ADN, B6: control positivo, B7: paciente infectado); sistema VPH 33 de 211 pb (B8: control negativo sin ADN, B9: control positivo, B10: paciente infectado); sistema VPH 35 de 210 pb (B11: paciente infectado).

das en parafina ha sido posible por medio de la utilización de esta técnica utilizando sondas marcadas con digoxigenina a través de la enzima terminal transferasa, lo que hace muy factible que esta técnica pueda ser utilizada en estudios retrospectivos de incidencia de VPH.<sup>6,58-60</sup> Sin embargo, existen metodologías como el sistema CARD (Catalized Reporter Deposition) que en nuestra experiencia nos han dado muy buenos resultados y que han servido para optimizar la técnica de hibridación *in situ* con un aumento o amplificación del tipo de señal emitida y no del blanco. Esta técnica está basada en la deposición de un hapteno de tyramida en la proximidad de la zona hibridada y visualizada utilizando un anticuerpo anti-hapteno conjugado con peroxidasa seguido por una reacción de diaminobenzidina.<sup>61</sup> La utilización de este tipo de técnica nos ha permitido mejorar considerablemente y con gran facilidad el porcentaje de detección de VPH en muestras citológicas, sin embargo, es una tecnología que desafortunadamente por su costo no se encuentra al alcance de todos los centros de diagnóstico.

La utilización del sistema de captura de híbridos el cual detecta la presencia de VPH de alto o bajo riesgo por la formación de híbridos de ADN-ARN, sin ser genotípicamente específica ha sido muy utilizada en el desarrollo



**Figura 4.** Representación esquemática de las diferentes etapas seguidas en la detección y tipificación del VPH. Muestras de ADN positivas para el sistema (+); muestras de ADN negativas para el sistema (-).

llo de los kit comerciales, los cuales no han tenido gran auge debido a que su sensibilidad ha sido cuestionada, además no ofrece una información genotípica específica y el alto costo que representaría en un sistema de muestreo masivo en donde métodos más económicos pueden dar resultados comparables.<sup>5,63-65</sup>

Otras de las técnicas empleadas es el sistema CARD (Catalyzed Reported Deposition) la cual se fundamenta en la deposición de un hapteno de Tyramida en la proximidad de la zona hibridada utilizando un anticuerpo anti-hapteno conjugado con peroxidasa seguido por una reacción de diaminobenzidina, siendo una técnica sensible pero costosa.<sup>62</sup>

Recientemente numerosos marcadores tumorales han tenido un auge en la investigación de los mecanismos moleculares de proliferación e inmortalización celular y su relación con diferentes tipos de cáncer, ofreciendo el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico clínico, seguimiento y pronóstico de la patología.

Un ejemplo es la telomerasa, que es una enzima de tipo ADN polimerasa<sup>66</sup> y cuya actividad ha sido detectada en un alto porcentaje de tumores sólidos dándole validez como marcador tumoral. La actividad de la telomerasa puede ser medida *in vitro* por medio de un método basado en una reacción de PCR llamado TRAP: Telomeric Repeated Amplification Protocol.<sup>67</sup> Recientes investigaciones en esta área han enfocado la detección de la telomerasa en muestras de exfoliado cervical de pacientes con reportes citológicos normales y con diagnóstico de carcinoma cervical, las cuales fueron evaluadas a través de diagnósticos moleculares para la detección de VPH por medio de reacciones de PCR con oligos específicos, detectándose actividad de la telomerasa en un 88% de las muestras con cáncer cervical y en todas las muestras que dieron positivo molecularmente para VPH.<sup>68</sup> Sin embargo, en la actualidad este tipo de ensayo sólo se encuentra a nivel de estudios de investigación, los cua-

les se están basando en evaluar su presencia e interrelación con otras patologías.

## Vacunas

El desarrollo de las vacunas contra la infección por VPH se ha limitado debido a las dificultades para cultivar el virus, puesto que necesita transcribirse y replicarse en queratinocitos diferenciados<sup>69</sup> aunado a la ausencia de un modelo animal adecuado para su estudio y a la especificidad de especie de estos virus. Actualmente se están desarrollando dos tipos de vacunas contra el VPH:

- i) Vacunas tradicionales o profilácticas que previenen las infecciones neutralizando las partículas virales y para ello generalmente se usan virus atenuados o muertos; el ejemplo representativo es la vacuna de partículas semejantes a virus (VLP's), cuyo diseño se basa en la capacidad intrínseca de las proteínas de las cápside de los VPH, para autoensamblarse en partículas semejantes a virus cuando se expresan a partir de un promotor, y en ausencia de otros productos virales;<sup>70,71</sup> y
- ii) Vacunas terapéuticas cuyo objetivo es eliminar la infección existente al intentar controlar el crecimiento de células transformadas e inducir la regresión de lesiones preexistentes, a través de la generación de una respuesta inmunológica dirigida hacia las células infectadas que expresan los antígenos virales E6 y E7.<sup>71,72</sup> Entre ellas tenemos las vacunas basadas en péptidos, las basadas en proteínas, las de vectores virales y las de ADN.<sup>70-73</sup> Cabe destacar que Patarroyo y colaboradores estudian la estructura conformacional de péptidos sintéticos que pueden ser utilizados como anticuerpos para estudios de diagnóstico y vacunas.<sup>53,74</sup> En general, una vacuna eficiente contra los VPH genitales debe ser capaz de prevenir la infección y reinfección al generar una adecuada respuesta inmune en el sitio y en el tiempo de infección. Por lo tanto, al desarrollar una vacuna exitosa contra el VPH representa la mejor forma de controlar el cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, varios expertos advierten que es probable que una vacuna efectiva, de bajo costo y que sea aceptada por la población general no esté disponible al público sino hasta dentro de 10 ó 20 años.<sup>75</sup>

## Conclusión

La infección por VPH se ha incrementado en la actualidad y a pesar de estar considerada como una de las principales enfermedades de transmisión sexual en el mundo. Su afección no se limita al epitelio vaginal, sino que se ha observado un incremento de su presencia en epitelios y mucosas de otras regiones anatómicas. La identi-

cación de lesiones intraepiteliales y tumorales asociadas a tipos de VPH con diferente potencial oncogénico ha resaltado la importancia del estudio de este virus. Se conoce que la persistencia viral de los tipos de alto riesgo oncogénico facilitaría la progresión de las lesiones al desarrollo de cáncer, por ello comprender la interacción entre el efecto patogénico viral en la célula huésped con un grupo de cofactores de riesgo necesarios para la progresión de lesiones facilitaría una conducta preventiva o de diagnóstico precoz. Actualmente se está estudiando cómo el VPH causa cambios en las líneas celulares y cómo se previenen estos cambios con la finalidad de desarrollar varias vacunas tanto profilácticas como terapéuticas que ayuden al sistema inmune a prevenir que las células normales se conviertan en cancerosas, y es por esto que un diagnóstico eficaz y a tiempo es indispensable para lograr un buen manejo del paciente y un cambio en las estadísticas.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo otorgado por FONACIT en los proyectos S1-2000000475, F2001001203 y al CDCHT a través del proyecto O-047-97-07-C.

## Bibliografía

1. Premoli G, Tinoco P. Verruga vulgar: reporte de dos casos. Revisión bibliográfica. *Acta Odontol Venez* 1990; 28: 23-27.
2. Puig-Tintoré LM, Alba A, Cortes X, Bosch FX, Torné A et al. La infección por Papilomavirus Separata de Documento de Consenso S.E.G.O. 2002. Disponible en: <http://www.aepcc.org/congreso/pdf/CONS-VPH.pdf>.
3. Zur H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-350.
4. Jiménez C, Pérez C. Estudio clínico-patológico retrospectivo de papiloma de la mucosa bucal en una población venezolana. *Acta Odontol Venez* 2002 ene [consultado 2003 nov 11]; 40 (1): [11 Pág]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000163652002000100007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000163652002000100007&lng=es&nrm=iso)
5. Chang F. Role of Papillomaviruses. *J Clin Pathol* 1990; 43: 269-276.
6. Perrone M, Premoli G. Papilomavirus humanos. Asociación con ciertas lesiones de la cavidad bucal. *Acta Odontol Venez* 1992; 30: 59-62.
7. Premoli G, Christensen R. Human papillomavirus in oral verrucal-papillary lesions. A comparative histological, clinical and immunohistochemical study. *J Pathologica* 1992; 84: 383-92.
8. de Villiers EM. Taxonomic classification of Papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 2001; 12: 57-63.

9. Munger K. The role of human Papillomaviruses in human cancers. *Frontiers in Bioscience* 7, d641-649, March 1, 2002. Disponible en: [www.bioscience.org/2002/v7/d/munger/figures.htm](http://www.bioscience.org/2002/v7/d/munger/figures.htm)
10. Villa LL. Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Pública Mex* 2003; 45 Suppl 3: S443-8.
11. Schiffman M, Castle P. Human papillomavirus. *Epidemiology and Public Health. Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 930-934.
12. Bonnez W, Reichman R. Papillomavirus. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. editores. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. 4ta ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana S.A.; 1997: 1555-1569.
13. Premoli G, Ramírez JL, Galindo I. Correlation between HPV types associated with oral squamous cell carcinoma and cervicovaginal cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 86: 77-82.
14. Calero L, Brusis T. Laryngeal papillomatosis-first recognition in Germany as an occupational disease in an operating room nurse. *Laryngorhinootologie* 2003; 82: 790-793.
15. Abramson AL, Nouri M, Mullooly V, Fisch G, Steinberg BM. Latent human papillomavirus infection is comparable in the larynx and trachea. *J Med Virol* 2004; 72: 473-477.
16. Klussmann JP, Dinh S, Guntinas O, Wittekindt C, Weissenborn S et al. HPV-associated tonsillar cancer. *An update HNO*. 2004; 52: 208-218.
17. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1463-1470.
18. Aguayo F, Meneses M, Corvalan A, Muñoz ML, Koriyama C et al. Identificacion de virus papiloma humano 16 (vph-16) en carcinoma queratinizante de pulmón. *Rev Chil Enferm Respir* 2002; 18: 83-89.
19. Bosch FX, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89: 183-190.
20. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
21. Novoa A. Cáncer del cérvix uterino. Revisión epidemiológica en Latinoamérica. *La Salud en Durango* 2001; 2: 21-27.
22. Flores Y, Bishai D, Lazcano E, Shah K, Lorincz A et al. Improving cervical cancer screening in Mexico: Results from the Morelos HPV study. *Salud Publica Mex* 2003; 45 Suppl 3: S388-398.
23. Martínez E. Cáncer de cuello uterino. Disponible en: <http://www.sociedadanticancerosa.org/educacion/Educacion.htm#Educacion>
24. HPV types: natural history and epidemiology. 2000. Disponible en: <http://www.arhp.org/healthcareproviders/onlinepublications/clinicalproceedings/cphpv/types.cfm?ID=149>
25. Lamura A, Premoli G. Estudio Epidemiológico de 147 casos de papiloma bucal (Venezuela). Parte I. *Acta Odontol Venez* 1989; 27: 27-32.
26. Premoli G, Ramírez JL. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 355-361.
27. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Human papillomaviruses, Vol 64, International Agency for Research on Cancer, Lyon Koss L. G. *Cancer Supplement*. 1993; 71: 1406.
28. Lazcano E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah K et al. Epidemiology of HPV infection among mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001; 91: 412-420.
29. Premoli G, Pinto J, Ramírez JL, Galindo I. Focal epithelial hyperplasia: Human-papillomavirus-induced disease with a genetic predisposition in a Venezuelan family. *Human Genet* 1993; 91: 386-388.
30. Ho G, Biermal R, Beardsley L. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-428.
31. Ostor A. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-192.
32. Sherman M, Lonnez A, Scott D, Wacholder S, Castle P et al. Baseline Cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10 - year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 46-52.
33. Sonnex C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. *J Clin Pathol* 1998; 51: 643-648.
34. Syrjanen KJ. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with squamous cell neoplasia. *Arch Geschwulstforsch* 1987; 57: 417-444.
35. Chua KL. Genital Human papillomavirus (HPV) infections and their importance for the handling of precancerous lesions of the cervix uteri. Stockholm. *Kongl Carolinska Medico Chirugiska Institutet* 1996: 11-34.
36. Goodman A. Role of routine human papillomavirus subtyping in cervical screening. *Current opinion in Obstetrics and Gynecology* 2000; 12: 11-14.
37. Sancllemente G. Lo que los clnicos deben saber acerca de las vacunas contra el virus del papiloma humano. *Gac Med Mex* 2003; 139: 173-183.
38. Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Enviromental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89: 191-199.
39. Zur H, de Villiers EM. Human Papillomaviruses. *A Rev Microbiol* 1994; 48: 427-4 47.
40. Krüger S, Svare EI, Worm AM, Walboomers J, Meijer C et al. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sexually Transmitted Disease* 2000; 27: 438-445.
41. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89: 213-26.
42. Sheffner M, Domanczuk K, Huibregtse JM, Mietz J, Howley M. Functions human papillomaviruses proteins. *Curr Top Microb Imm* 1994; 186: 83-99.
43. Lorinz AT. Detection of human papillomavirus infection by nucleic acid hybridization. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1987; 14: 451-469.
44. Pap Smear or Pap Test for patients[<http://www.erinet.com/fnadoc/pap.html>].

45. Poljak M, Seme K, Gale N. Detection of human papillomaviruses in tissue specimen. *Advances in Anatomic Pathology* 1998; 5: 216-233.
46. Endo M, Yamashita T, Jin H-Y, Akutsu Y, Jimbow K. Detection of human papillomavirus type 16 in bowenoid papulosis and nonbowenoid tissues. *Inter J of Derma* 2003; 42:474-476.
47. Curiel J, Montes de Oca R, Berumen J, Briones J, Catarino A. Detección citológica del virus del papiloma humano y su correlación con el PCR. *Rev Mex Patol Clin* 1999; 46(2): 74-78.
48. Moscicki AB. Human papillomavirus infections. *Adv Ped* 1992; 39: 257-81.
49. NCI. NCI Bethesda System 2001 Terminology. 2002. Disponible en: [<http://bethesda2001.cancer.gov/terminology.html>]
50. Bergeron C. The 2001 Bethesda System. *Salud Publica Mex* 2003; 45 Suppl 3: S340-4.
51. Kurman RJ, Malkasian GD, Sedlis A, Solomon D. From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new cervical cytologic classification. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 779-782.
52. Jones HW. 3rd. Impact of Bethesda System. *Cancer Supplement* 1995; 76: 1914-1918.
53. Calvo JC, Choconta KC, Díaz D, Orozco O, Bravo MM et al. An alpha helix conformationally restricted peptide is recognized by cervical carcinoma patients' sera. *J Med Chem* 2003; 46: 5389-5394.
54. Coursaget P. Serology for human papillomavirus. *Salud Publica Mex* 2003; 45 Suppl 3: S361-366.
55. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T et al. Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3204-3212.
56. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* 1998; 153(6): 1731-1739.
57. Swygart C. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with Squamous cell neoplasia. *Arch Geschwulstforschung [SIC]* 1997; 6: 417-443.
58. Miyagi J, Tshako K, Kinjo T, Iwamasa T, Hirayasu T. Recent striking changes in histological differentiation and rate of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol* 2000; 53: 676-84.
59. Romero J. Aplicación de la técnica de hibridación *in situ* en la detección del virus del papiloma humano (VPH) en tejidos embebidos en parafina. *Trabajo de Tesis de Grado*. Universidad de Los Andes. 2000.
60. Premoli G, Galindo I, Ramírez JL. *In situ* hybridization with digoxigenin-labelled DNA probes for the detection of human papillomavirus-induced focal epithelial hyperplasia among Venezuelans. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1992; 420: 295-300.
61. Premoli G, Galindo I, Ramírez JL, Perrone M, Rivera H. Detection of human papillomavirus-related oral verruca vulgaris among Venezuelans. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 113-116.
62. Kerstens H, Poddighe P, Hanselaar A. A novel *in situ* hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 347-352.
63. Nelson JH, Hawkins GA, Edlund K, Evander M, Kjellberg L et al. A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 688-695.
64. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 940-5.
65. Bosch FX. Cervical cancer: Advances in prevention and knowledge of its etiology. *Salud Pública Mex* 2003; 45 Suppl 3: S297-298.
66. Luque J, Herráez A. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud*. España: Ediciones Harcourt; 2001.
67. Kim N, Piatyszek M, Prowse K, Harley C, West M et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2014.
68. Pinto J. Detección de la actividad de la telomerasa en muestras exfoliado cervical de pacientes con lesiones del epitelio cervical y cáncer invasor asociado a la infección por el Virus del papiloma Humano. *Trabajo de Tesis de Posgrado*. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela; 2003.
69. Rowen D, Lacey C. Toward a papillomavirus vaccine. *Dermatol Clin* 1998; 16: 835-838.
70. Da Silva DM, Elben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP et al. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 2001; 186: 169-182.
71. Comelison T. Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 466-473.
72. Schiller JT. Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer. *Mol Med Today* 1999; 5: 209-215.
73. Nardelli D, Roden RB, Benyacoub J, Sahli R, Kraehenbuhl JP et al. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun* 1997; 65: 3328-3336.
74. Vera R, Ocampo M, Urquiza M, García JE, Rodríguez LE et al. Human papillomavirus type 16 and 18 L1 protein peptide binding to VERO and HeLa cells inhibits their VLPs binding. *Int J Cancer* 2003; 107: 416-24.
75. García A. Vaccines against human papillomavirus and perspectives for the prevention and control of cervical cancer. *Salud Pública Mex* 2003; 45 Suppl 3: S437-442.

## Reimpresos:

Dra. Gloria Premoli. Centro de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Edificio el Rectorado. Calle 23 entre Av. 2 y 3. Mérida 5101, Mérida, Venezuela. Teléfono: 58-0274-240.2388. Fax: 58-0274-240.2438. E-mail: premoli@ula.ve. Este artículo puede ser visto en [www.medigraphic.com/adm](http://www.medigraphic.com/adm)