

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“FRECUENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO EN EL PTERIGIÓN”**

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

B.E. LESLYE SÁMANO HERNÁNDEZ

Co-Directores

**Dr. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO
Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ**

Asesora:

Dra. ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

MÉXICO, D.F., ABRIL 2012.

COMITÉ TUTORAL

Co-director Externo

Dr. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO

Departamento de Microbiología y Proteómica Ocular

Unidad de Investigación.

Instituto de Oftalmología, Fundación Conde de Valenciana.

Co-Director Interno

Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

Departamento de Ciencias de la Salud,

División de Ciencias Biológicas y de la Salud,

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora

Dra. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

Departamento de Ciencias de la Salud,

División de Ciencias Biológicas y de la Salud,

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I 309-1) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia CONACyT PIFOP-CONACyT-SEP y cuenta con apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, en el área de Biología Celular, en el Laboratorio Expresión Génica y en el Instituto de Oftalmología, Fundación Conde de Valenciana-Unidad de Investigación, en el departamento de Microbiología y Proteómica Ocular.

BIOLOGIA
EXPERIMENTAL

“Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Frecuencia del Virus del Papiloma Humano en el Pterigión”**, con fecha 4 de Mayo del 2012.

JURADO DE EXAMEN

Presidenta:

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Departamento de Ciencias de la Salud.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Secretario:

Dr. Everardo Hernández Quintela.

Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado
Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal:

Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos.

Departamento de Ciencias de la Salud.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Vocal:

Dra. Irma Jiménez Morales.

Departamento de Ciencias de la Salud.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Dedicatorias

A mis Padres:

Dedico a ustedes este trabajo, por el apoyo incondicional que me brindaron, por la confianza, el amor, la paciencia, los sacrificios, por ser la principal fuente de inspiración en mi vida para realizar cualquier cosa y por darme el mejor regalo del mundo, la oportunidad de estudiar, en verdad es algo que valorare eternamente. Me enseñaron que no importa cuántos obstáculos se presenten en el camino, siempre es posible llegar hasta el final, solo es cuestión de actitud y compromiso. Quiero que sepan que los amo, los adoro y los admiro; y esta es la única manera que tengo para pagarles todo lo que me han dado.

A mi Hermano:

Fuiste mi ejemplo, ahora solo puedo decirte, gracias por apoyarme en esas situaciones difíciles y por estar a junto a mí sin decirlo. Recuerda que te amo y siempre tendrás a tu hermana a tu lado.

A los niños de mi vida:

Barbarita, Cris, Yoali, Carlos, Daniela y Lorena espero esto sirva de inspiración y motivación para que logren todo lo que se propongan en la vida, solamente recuerden algo, las cosas no pueden ser siempre fáciles, pero no existen imposibles. Quiero dedicarles este trabajo porque gracias a sus sonrisas, juegos y amor desinteresado me impulsaron en todo momento. Los amo pequeños (gosh).

A Omar Peralta:

Tu apoyo, tus consejos, tu cariño, tus sonrisas, todos esos momentos que me regalas día con día fueron el motor que me permitió cumplir este sueño. Gracias por llegar a mi vida, te amo.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Iztapalapa



Instituto de Oftalmología

"Fundación Conde de Valenciana IAP"

Agradecimientos

Al Instituto de Oftalmología. Fundación Conde de Valenciana:

Expreso mi sincera gratitud por todo el apoyo y las facilidades que se brindaron durante este proyecto de investigación

A CONACyT

Por el apoyo económico dedicado durante la realización de este trabajo. (Becario 224658).

A mis tutores:

Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio.

Agradezco infinitamente sus consejos, su paciencia, sus conocimientos, su inteligencia, su apoyo, su tiempo, su capacidad de resolver mil cosas al mismo tiempo siempre dando el máximo esfuerzo y su comprensión en mis problemas tanto académicos como personales. También agradezco la confianza que deposito en mí, así como el permitirme ser independiente en el laboratorio. Gracias por enseñarme a descubrir mi propio potencial. Con nada puedo pagar todas las enseñanzas que me brindo durante este tiempo. Mi gratitud y admiración eternas.

Dr. Humberto González Márquez.

Muchas gracias por aceptar ser parte de este sueño, lo conozco desde la licenciatura, y en este tiempo que tuve la oportunidad de convivir más con usted pude reafirmar lo que pensaba, simplemente es eminente como profesor y como ser humano, gracias por todo el conocimiento que compartió conmigo, por los regaños, por las felicitaciones, por escucharme, por entenderme, por los consejos, por el apoyo y por esa dedicación que muestra en cada proyecto. Gracias porque es de esa clase de personas que todo lo comprenden y dan lo mejor de sí mismos sin esperar nada a cambio. Mi admiración, cariño y respeto infinitos para usted hoy y siempre.

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz. Agradezco sus valiosas observaciones, consejos, sugerencias, el aceptar asesorar este trabajo, el darme la confianza de ser su alumna y por permitirme conocer a un gran ser humano con una enorme dedicación a la docencia.

A mis compañeros y amigos:

Agradezco a María de la Luz Ruiz, por emprender este viaje a mi lado, por alentarme cada vez que pensé en desistir, pasamos cosas muy difíciles juntas, las cuales finalmente marcaron un nuevo camino, pero nunca olvidare tu ayuda, tu apoyo y tus consejos.

También quiero agradecer a mis compañeros, Atzin Robles Contreras, Nadia Luz López Espinosa y Héctor Pérez Cano (súper jefe) por su ayuda desinteresada, comentarios, enseñanzas y consejos, los cuales me permitieron llevar este proyecto a su fin.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

Índice general

| | |
|---|-----|
| Índice general | iv |
| Índice de tablas | vi |
| Índice de figuras | vii |
| Abreviaturas | ix |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |
| Introducción | 1 |
| Anatomía del ojo | 1 |
| Túnica externa: córnea y esclerótica. | 2 |
| Túnica media o vascular: úvea, formada por iris, cuerpo ciliar y coroides. | 2 |
| Túnica interna: retina. | 2 |
| Aparato lagrimal. | 3 |
| Párpados. | 3 |
| Conjuntiva | 4 |
| Estructura de la conjuntiva | 5 |
| Función de la conjuntiva | 6 |
| Enfermedades de la conjuntiva..... | 6 |
| Pterigión. | 8 |
| Fisiopatología | 9 |
| Distribución | 10 |
| Histología | 10 |
| Factores de riesgo | 11 |
| Virus del papiloma humano (VPH)..... | 17 |
| Estructura..... | 17 |
| Clasificación | 20 |
| Papillomavirus y malignidad | 21 |
| Justificación | 22 |

| | |
|---|----|
| Pregunta de Investigación | 23 |
| Hipótesis | 23 |
| Objetivos | 24 |
| General..... | 24 |
| Particulares | 24 |
| Material y métodos | 25 |
| Obtención de Muestras | 25 |
| Criterios de inclusión..... | 25 |
| Extracción de ácidos nucleicos..... | 26 |
| Análisis de la presencia de VPH..... | 26 |
| Gen 18s rDNA..... | 26 |
| Determinación del genotipo de VPH por secuenciación | 27 |
| Western blot para el análisis de la proteínaL1 | 27 |
| Análisis estadístico | 28 |
| Resultados | 29 |
| Detección de VPH | 29 |
| Detección de VPH en conjuntiva sana | 30 |
| Identificación del genotipo de VPH. | 31 |
| Análisis estadístico | 33 |
| Western blot para el análisis de la proteínaL1 | 34 |
| Discusión | 35 |
| Conclusiones | 42 |
| Perspectivas | 43 |
| Referencias bibliográficas | 44 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Tipos de VPH y patologías relacionadas | 20 |
| Tabla 2: Oligonucleótidos universales para HPV | 26 |
| Tabla 3: Frecuencia de muestras de pterigión positivas a DNA de VPH..... | 30 |
| Tabla 4: Prueba X^2 de Pearson. | 33 |
| Tabla 5: VPH en Pterigión. Comparación bibliográfica. | 36 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Anatomía del globo ocular. | 1 |
| Figura 2: Conjuntiva. Es una membrana fina y transparente que cubre la esclerótica..... | 4 |
| Figura 3: Estructura de la conjuntiva. | 5 |
| Figura 4: Pterigión nasal y temporal, proliferación fibrovascular | 8 |
| Figura 5: El Pterigión puede presentarse como sintomático o asintomático..... | 9 |
| Figura 6: El pterigión se compone de colágeno subepitelial hialinizado con degeneración elastósica. En el vértice corneal de la cabeza del pterigión existe fragmentación y destrucción de la membrana de Bowman. (Atlas de oftalmología clínica) | 11 |
| Figura 7: Organización del genoma del VPH. El genoma de los papillomavirus es muy conservado. Los ORFs (marcos abiertos de lectura) E1, E2, E4, E5, E6 y E7 codifican para proteínas que son importantes en la replicación del DNA viral, así como de la expresión de los genes del virus. Los ORFs L1 y L2, codifican para las proteínas de la cápside del virus. La transcripción es regulada por las secuencias que se localizan en la LCR, en donde se unen diversos factores celulares, así como de la proteína viral E2. | 19 |
| Figura 8: Clasificación de los papillomavirus dependiendo el riesgo..... | 21 |
| Figura 9: Análisis por PCR del gen L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de pterigión primario, utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11. A) Muestras de pterigión positivas al gen L1 de VPH. La flecha azul indica la banda de 450 (pb). B) Amplicón del gen | |

constitutivo 18S, utilizando como control de carga. La flecha roja indica la banda de 299(pb); los primeros carriles presentan al testigo positivo, mostrando un patrón similar las muestras de Pterigi3n que ocuparon el resto de los carriles del gel29

Figura 10: An3lisis por PCR del gen L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de conjuntiva sana, utilizando los oligonucle3tidos MY09/MY11. A) Gel de agarosa (1.5%) del amplificado de PCR de la regi3n L1 del genoma del Virus del Papiloma Humano (VPH) mediante los oligonucle3tidos MY09/MY11. La flecha azul indica la banda de 450 (pb); a partir del carril 4 se colocaron las muestras de conjuntiva sana, las cuales no muestran amplificado (+). B) Gel de agarosa (1.5%) del amplificado de PCR del gen constitutivo. La flecha roja indica la banda de 299(pb); todas las muestras presentan amplificaci3n del gen 18s rDNA.31

Figura 11: Electroferogramas de muestras de pterigi3n positivas para VPH.....32

Figura 12 : Frecuencia del VPH en las muestras de pterigi3n.33

Figura 13: Western blot vs L1. Se observa una banda de 57kDa correspondiente a la prote3na L1 en las 2 muestras analizadas. GADPH fue utilizado como control constitutivo. Se colocaron 10 μ g de prote3na por pozo, en un gel de poliacrilamida; la transferencia se realiz3 usando membrana de nitrocelulosa con un voltaje de 120mA34

Figura 14: Degradaci3n de p53 mediada por E6.....39

Figura 15: Cambio en el control del ciclo celular generada por la prote3na E7 del VPH.39

Abreviaturas

- DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- RUV:** Radiación ultravioleta.
- VPH:** Virus del papiloma humano.
- PLD:** Fosfolipasa D.
- MMPs:** Metaloproteinasas.
- TIMPs:** Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.
- FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos.
- LOH:** Pérdida de heterocigosidad.
- LCR:** Región larga de control.
- pRB:** Proteína retinoblastoma.
- CaCu:** Cáncer cervicouterino.
- Mdm2:** Proteína murina doble minuto.
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- pb:** Pares de bases.
- kDa:** Kilo Daltons.
- mg:** Miligramos
- ml:** Mililitros.
- µg:** Microgramos.
- µl:** Microlitros.
- mM:** Mili molar.
- ng:** Nanogramos
- mA:** Miliamperio.
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- WB:** Western blot.

Resumen

El pterigión es una enfermedad en la que se presenta crecimiento anormal de la conjuntiva sobre la córnea; de origen desconocido, uni o bilateral, que se caracteriza por tener una forma triangular y consta de tres áreas: cabeza, cuerpo y cola. Diversos estudios han intentado describir su etiología utilizando diferentes evidencias moleculares, genéticas y/o epidemiológicas. Aunque los resultados han sido poco concluyentes, han permitido dilucidar nuevos factores de riesgo que pueden tener relación con la aparición de la enfermedad. Se ha sugerido que factores externos, como los virus, podrían desencadenar el desarrollo del pterigión, principalmente los virus del papiloma humano (VPH). Tomando en cuenta que en muchos estudios se propone a la radiación ultravioleta como un factor de riesgo, se ha propuesto un evento en el que la radiación UV generaría una primera alteración, a la cual podríamos sumar un segundo evento que altere la regulación del crecimiento normal de las células de la conjuntiva, que sería la infección por virus del papiloma humano. Existen reportes en los que se describe la presencia de virus de papiloma humano en muestras de pterigión, aunque los resultados no son tan concluyentes, nos permiten sentar las bases para realizar un análisis de la presencia de VPH en pterigión en México, un país con un alto índice de infecciones por virus de papiloma humano y con una mayor prevalencia de pterigión. En este estudio se evaluó la presencia del DNA de virus del papiloma humano en muestras de pterigión (n=40). Se obtuvieron muestras de conjuntiva sana (n=12) y se utilizaron como control. El DNA de VPH se detectó por PCR punto final, amplificando una región constante del gen L1, presente en casi todos los tipos del virus de papiloma humano. De las 40 muestras analizadas, 19 fueron positivas para VPH. Para identificar el tipo de VPH en estas muestras, se secuenciaron los fragmentos amplificados. Los tipos y frecuencias de VPH identificados fueron: el 11 (58%) y el 18 (42%). Ninguna muestra de la conjuntiva control fue positiva a VPH. Se realizó un WB para analizar la presencia de la proteína L1 en las muestras de pterigión VPH positivo, se observó la banda esperada de L1 (57kDa) en solo 2 muestras de 10 analizadas. En conclusión, estos resultados muestran un 47% de frecuencia del VPH en las muestras de pterigión. El VPH tipo 11 presentó 58% de prevalencia, mientras que el tipo, 18, solamente 42%. Aunque el porcentaje es alto, estos resultados no nos permiten definir si es el VPH un factor que desencadene la aparición del pterigión.

Abstract

The pterygium is a disease in which the conjunctiva over the cornea abnormally grows, generally of unknown origin, unilateral or bilateral, it is characterized by a triangular shape and consists of three areas: head, body and tail. Several studies have tried to describe its etiology using different molecular, genetic and / or epidemiological evidences, though the results have been slightly conclusive, they have helped to explain new factors of risk that may be related to the onset of the disease. It has been suggested that external factors, such as viruses, might unleash the development of the pterygium, especially the human papillomavirus (HPV). Given that many studies suggested that the ultraviolet radiation as a risk factor, it has been proposed that UV radiation could generate the first alteration, then a second event, deregulating normal growth conjunctival cells, that would be infection with human papillomavirus. There are reports in human that describe the presence of papillomavirus in samples of pterygium, although results are not conclusive, allow us to lay the groundwork for thinking about an analysis of pterygium in Mexico, a country with a high rate of infections human papillomavirus and a higher prevalence of pterygium. In this study it was evaluated the presence of the DNA of human papillomavirus in samples of pterygium (n=40). Samples of normal conjunctiva (n=12) were obtained as control. HPV DNA was detected by endpoint PCR, amplifying the L1 gene, a constant region, present in almost all types of human papillomavirus. Of the 40 samples analyzed, 19 were positive for HPV. To identify the HPV type in these samples, the amplified fragments were sequenced. The types of HPV identified were 11 (58%) and 18 (42%). None of the conjunctiva control was positive for HPV. A WB was performed to analyze the presence of the L1 protein in HPV-positive pterygium samples, was observed the expected band of L1 (57kDa) in only 2 of 10 samples analyzed. In conclusion, these results show a 47% of frequency of the HPV in the samples of pterygium. The HPV type 11 presented 58% of prevalence, whereas the type, 18, only 42%. Although the percentage is high, these results do not allow us to define if it is the HPV a factor that unleashes the appearance of the pterygium.

Introducción

El conocimiento del mundo circundante, la percepción de los objetos y la estimación de distancias, actividades básicas para el ser humano, están dados principalmente por el sentido de la vista. El fenómeno de la visión es un proceso complejo, que consiste, a grandes rasgos, en captar mediante los ojos la energía procedente de una fuente emisora, transmisora o reflectora de radiaciones luminosas. La energía puede ser cuantificada en esta etapa mediante el uso de la óptica y la fotometría. Esta energía luminosa es convertida en señales neurobiológicas desde la retina hasta el córtex (manto de tejido nervioso que cubre la superficie de los hemisferios cerebrales). El proceso termina con la interpretación y la comprensión de la señal inicial, es decir, la percepción del mundo que nos rodea (Jauregui, 2001) . El globo ocular a través de sus estructuras recibe los estímulos luminosos externos, los codifica y transmite a través de la vía óptica al cerebro, lugar donde se produce el fenómeno de la visión (Bartra y Arrondo, 2003).

Anatomía del ojo

Cada globo ocular es de forma irregularmente esferoidal, está formado por tres capas concéntricas: túnica externa, media e interna (fig. 1).

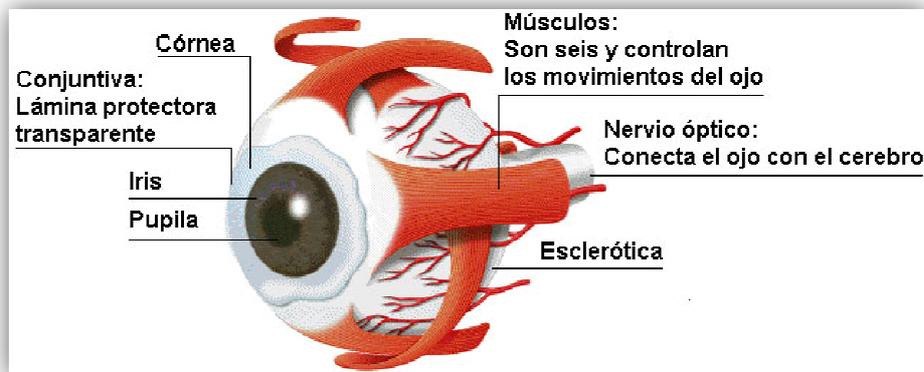


Figura 1: Anatomía del globo ocular.

Túnica externa: córnea y esclerótica.

La *córnea* es la estructura transparente que proporciona gran parte del poder refractivo necesario para enfocar la luz en la retina. La córnea está constituida por cinco capas que de afuera hacia adentro son: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. La membrana fibrosa resistente que protege los tejidos intraoculares, y que contribuye a mantener la forma y tono ocular recibe el nombre de *esclerótica*. (Alañón y col., 2001).

Túnica media o vascular: úvea, formada por iris, cuerpo ciliar y coroides.

Denominada úvea, consta de tres porciones bien diferenciadas: el *iris* presenta la forma de un disco perforado en su centro por un orificio circular, inmerso en el humor acuoso. Por otro lado, el *cuerpo ciliar* desempeña un papel importante en la secreción de humor acuoso. El cuerpo ciliar también contiene el músculo ciliar, el cual cambia la forma del cristalino cuando los ojos se enfocan en algo. La *coroides* es una membrana profusamente irrigada con vasos sanguíneos y tejido conectivo, la cual se encuentra entre la retina y la esclerótica del ojo, tiene como función mantener la temperatura constante y nutrir algunas estructuras del globo ocular (Blanco, 2005).

Túnica interna: retina.

La *retina* es la capa más interna del globo ocular, donde se inicia el proceso de la visión. La función de la retina es la de recoger, elaborar y transmitir sensaciones visuales, se encuentra en contacto con la coroides por fuera y con el vítreo por dentro (Graue, 2009). El *vítreo* es un gel transparente que ocupa la totalidad del espacio comprendido entre la superficie interna de la retina (Alañón y col. , 2001).

Aparato lagrimal.

El *aparato lagrimal* es el sistema de glándulas que se encuentran dentro y alrededor de los párpados, produciendo lágrimas que mantienen el ojo lubricado, limpio y sano. Se compone del *aparato secretor*: constituido por la glándula lagrimal principal y por las accesorias, encargadas de la formación de la lágrima. El *aparato excretor* está constituido por un sistema tubular que conduce la lágrima desde la superficie del ojo, hasta las fosas nasales. (Bartra y Arrondo, 2003).

Párpados.

La estructura músculo-membranosa cuya misión es proteger a los globos oculares recibe el nombre de *párpado*, debido a su capacidad de cierre, representa un factor importante en la protección del globo ocular frente a los agentes externos luz, calor, frío, polvo, etc. Los párpados aseguran una hidratación constante de la superficie ocular por sus continuos movimientos (parpadeos), que se consideran como el acto fisiológico más significativo del flujo lagrimal, renovando y distribuyendo la película lagrimal (Graue, 2009).

La conjuntiva es una delgada membrana mucosa vascularizada de aspecto normalmente brillante. Forma el saco conjuntival junto con la superficie de la córnea. Está ricamente vascularizada y contiene los componentes celulares inmunológicos necesarios para iniciar y mediar las reacciones inflamatorias y sintetizar las distintas inmunoglobulinas.

Debido a la importancia que representa la conjuntiva normal al constituir una barrera natural a la invasión por sustancias exógenas biológicas o inertes, dicha estructura se describirá de manera independiente.

Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que une el globo ocular a los párpados, revistiendo a la vez la cara posterior de los párpados y la parte anterior del globo ocular (fig. 2). En su parte anterior queda abierta a nivel de la hendidura palpebral, y en su parte posterior, su epitelio se continúa con el corneal, así como con el epitelio del aparato de drenaje lagrimal a través de los puntos lagrimales.

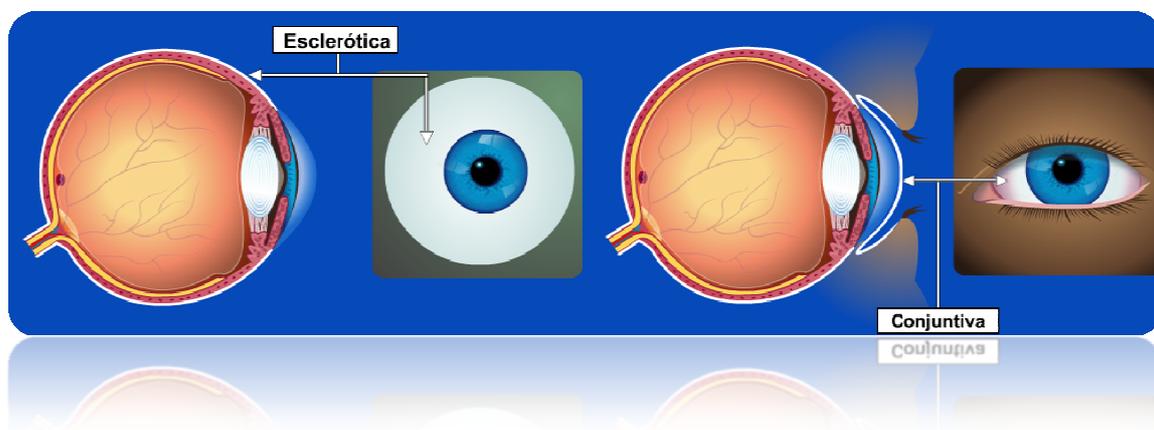


Figura 2: Conjuntiva. Es una membrana fina y transparente que cubre la esclerótica (túnica externa).

La conjuntiva anatómicamente presenta tres porciones:

La primera es la **conjuntiva palpebral** tapiza la superficie interna del párpado y está firmemente unida al tarso. La segunda es la **conjuntiva bulbar**, que recubre el globo ocular, débilmente unida a la esclera y más estrechamente unida al limbo de la córnea (fig. 3). Ahí el epitelio conjuntival se fusiona con el epitelio corneal. Al ser delgada y transparente permite ver fácilmente los vasos subconjuntivales y epiesclerales.

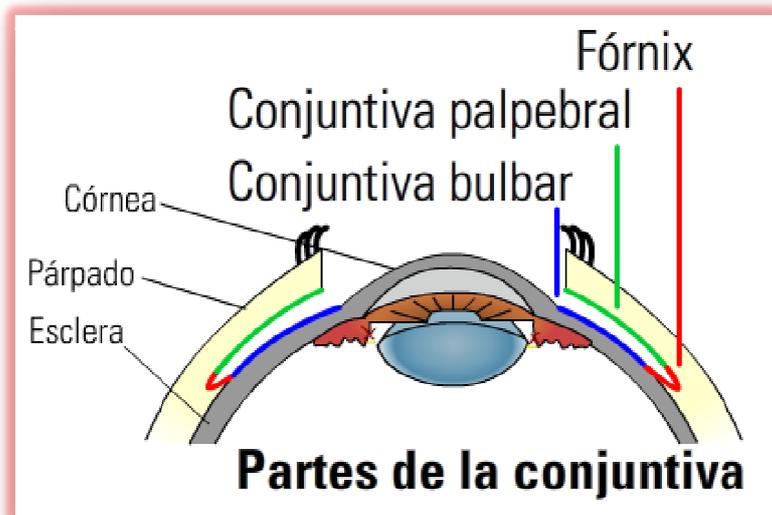


Figura 3: Estructura de la conjuntiva.

Finalmente, encontramos al *fórnix conjuntival*, que es una zona de transición entre la conjuntiva palpebral y la bulbar, donde se forman pliegues para permitir la movilidad normal del globo ocular (Lang y Lang, 2002).

Estructura de la conjuntiva

El epitelio de la conjuntiva presenta como característica principal ser de tipo cilíndrico estratificado, y varía según las zonas, teniendo células cilíndricas en profundidad, y planas en la superficie. El coriÓN se encuentra por debajo del epitelio conjuntival y está formado de tejido conectivo infiltrado de linfocitos y fibroblastos (Alañón y col. , 2001).

Las glándulas de *Henle* son invaginaciones del epitelio del coriÓN formadas por células caliciformes y segregan mucinas. Las glándulas *Krause* y *wolfring*, son glándulas lagrimales accesorias y están situadas próximas a los fórnix.

Función de la conjuntiva

La conjuntiva tiene dos cometidos principales: la *motilidad del globo ocular*, debido a la débil conexión entre la conjuntiva bulbar y la esclera en los fórnix permite que el globo ocular se mueva libremente en cada dirección de la mirada. La otra función importante es el contribuir como *capa deslizante*, ya que la superficie de la conjuntiva es suave y húmeda para permitir que las membranas mucosas se deslicen indolora y fácilmente entre ellas (Bartra y Arrondo, 2003).

Enfermedades de la conjuntiva

La conjuntiva bulbar es una zona expuesta continuamente a irritaciones ambientales: sol, aire, frío, calor, sustancias tóxicas, etc., que la afectan de modo constante (Lang y Lang, 2002). La conjuntiva responde a esos estímulos inflamándose; estas inflamaciones continuas producen cambios crónicos degenerativos que eventualmente pueden dar origen a la aparición de neoformaciones conjuntivales. Las cuales se describen brevemente a continuación

Pingüecula.

Es un engrosamiento amarillo grisáceo inocuo del epitelio conjuntival en la hendidura palpebral. Es la alteración conjuntival observada con más frecuencia. El engrosamiento de la conjuntiva es debido a la degeneración hialina del tejido colágeno subepitelial. La edad avanzada y la exposición al sol, viento y polvo favorecen la aparición de esta lesión (Graue, 2009) .

Melanosis conjuntival

Es el engrosamiento pigmentado del epitelio conjuntival. La melanosis conjuntival es rara, al igual que todos los tumores malignos o potencialmente malignos de la conjuntiva. Su patogenia es incierta. Habitualmente aparece después de los 40 años de edad. Los síntomas típicos son la pigmentación irregular difusa y el engrosamiento del epitelio que pueden ir y venir.

Pterigión

Es un trastorno degenerativo de los tejidos subconjuntivales, invade la córnea y la destruye; la lesión aparece como una invasión triangular de la conjuntiva sobre la córnea. (Stephen, 1993). Debido a la importancia que representa el pterigión en este trabajo, en la sección siguiente se definirán varios aspectos importantes acerca de esta patología.

Pterigión.

Es una enfermedad en que se presenta un cuadro de inflamación crónica, proliferación del tejido conectivo subconjuntival y la presencia de angiogénesis, provocando un crecimiento de tejido elastótico (llamado así porque sus fibras colágenas tiñen positivamente con las tinciones para tejido elástico pero no son sensibles a la digestión por elastasa), y de conjuntiva anormal sobre la córnea (Ochoa-Tabares, 2006).

Su descripción original se remonta a los tiempos de Hipócrates y al parecer su condición no ha cambiado desde tiempos antiguos, describiéndose como una membrana fibrovascular que avanza sobre la superficie de la córnea a menudo de forma triangular (con el vértice hacia el centro de la córnea) algunas veces bilateral y usualmente se origina de la conjuntiva bulbar nasal, aunque en ocasiones puede originarse de la conjuntiva temporal (fig. 4), (Detorakis y col., 2000).



Figura 4: Pterigión nasal y temporal, proliferación fibrovascular cuyos vértices invaden la córnea.

El pterigión presenta complicaciones, entre las que se cuenta mínima irritación ocular que puede agravarse provocando disminución de la agudeza visual y afectación de la córnea; pudiendo causar dificultad en la motilidad ocular o provocar diplopía. La agudeza visual es

probable que disminuya en etapas avanzadas debido a la participación del eje visual o astigmatismo (Gallagher y col., 2001; Piecyk-Sidor y col., 2009).

Fisiopatología

La radiación UV tipo B es uno de los probables factores etiológicos para desarrollar pterigión y tumores del limbo. El pterigión crece a partir del epitelio limbal, presenta una forma triangular (a menudo descrita como cabeza, cuerpo y cola). Un segmento de epitelio limbal, el limbo migrante invade la córnea en forma centripeta, seguido por el epitelio conjuntival.

La membrana de Bowman (está localizada entre el epitelio externo y el estroma, su grosor oscila entre 8 y 14 micras, está compuesta de fibras de colágeno y ayuda a la córnea a mantener su forma) se disuelve en el área cubierta por el borde del pterigión que invade la córnea. El pterigión tiene un alto grado de recurrencia (Ochoa-Tabares, 2006).

Los síntomas (fig. 5) suelen presentarse cuando la cabeza del pterigión amenaza el centro de la córnea y, por tanto, el eje visual. Las fuerzas de tensión que actúan sobre la córnea pueden causar un astigmatismo grave. Un pterigión que avanza firmemente y que incluye tejido conjuntival cicatricial puede, gradualmente, deteriorar la motilidad ocular; el paciente experimenta visión doble en abducción (Lang y Lang, 2002).

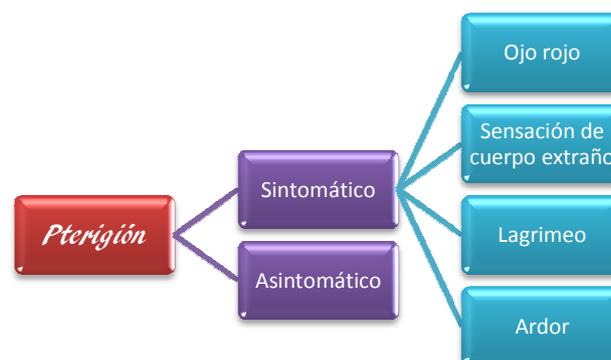


Figura 5: El Pterigión puede presentarse como sintomático o asintomático.

Distribución

El pterigión se presenta en todo el mundo. El predominio del pterigión aumenta con la edad, pero es más frecuente en grupos de población entre los 20 y 50 años de edad; no suele haber predominio entre sexos cuando las condiciones de vida son similares (Aragonés y Alemañy, 2009). Es más común en climas cálidos y secos. Su prevalencia es tan alta como un 22% en zonas ecuatoriales y menos de 2% en latitudes cercanas a los 40°.

El pterigión es más frecuente en las poblaciones situadas cerca del ecuador así como en los trabajadores que desempeñan labores al aire libre; es decir, existe una mayor prevalencia en los agricultores, pescadores, trabajadores de aserraderos y soldadores (John-Aryankalayil y col., 2006).

La prevalencia del pterigión está relacionada con la latitud geográfica se pone de manifiesto en los siguientes reportes: en la población china de Singapur es de 7%, en Victoria (Melburne, Australia) es de 6.7%; y en las Islas Marshall es de 14.5%. En Indonesia es de 16.8%, en Meitkila, en Myanmar Central es de 19.6%; en Barbados es de 23.4%. También puede haber discrepancias entre diferentes regiones de un mismo país, por ejemplo en Brasil, en la población urbana caucásica la incidencia es de 1.2% y aumenta hasta un 36.6%, en los indios adultos de las zonas rurales (Aragonés y Alemañy, 2009).

Histología

Conceptualmente, la histología del pterigión consiste en una masa de tejido subepitelial que ha sufrido degeneración elastótica (elastosis), llamada así porque las fibras colágenas degeneradas se tiñen basofílicamente y también positivamente con las tinciones para tejido elástico, pero no son sensibles a la digestión por elastasa; estos haces fibrosos se disponen sobre un fondo de degeneración hialina (Solomon y col., 2000). Se han descrito fibras de colágeno tipo 1 y 4 degeneradas, así como fibras de elastina inmaduras o fibras de elastina degeneradas. Los cambios epiteliales son variables e incluyen hiperqueratosis, paraqueratosis o acantosis. Los fibroblastos se extienden en el estroma corneal anterior (por debajo de la

membrana de Bowman), puede ser activado por RUV y puede causar la ruptura de la membrana, resultando en una adherencia firme del pterigión sobre el estroma corneal. Desde un punto de vista histoquímico, formas anormales de mucopolisacáridos, a menudo con una mayor cantidad de azúcares neutros y ácido siálico, se reportan en el pterigión junto con altos niveles de aminoácidos específicos como es la prolina; en comparación con la conjuntiva normal (fig. 6) (Detorakis y Spandidos, 2009).

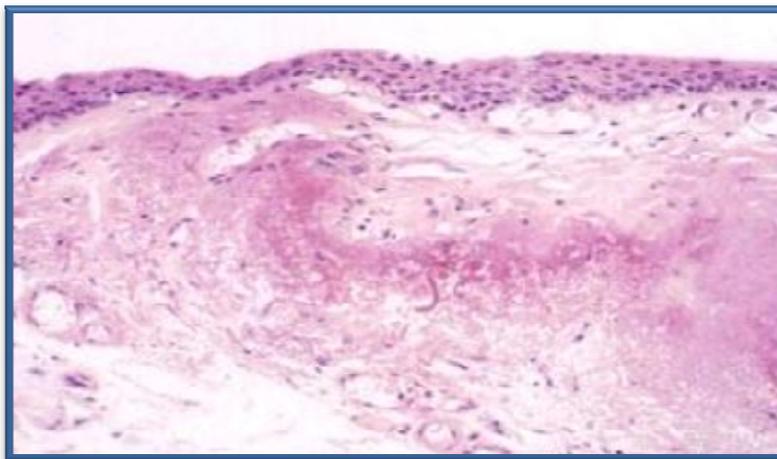


Figura 6: El pterigión se compone de colágeno subepitelial hialinizado con degeneración elástica. En el vértice corneal de la cabeza del pterigión existe fragmentación y destrucción de la membrana de Bowman. (Atlas de oftalmología clínica)

Factores de riesgo

Los factores de riesgo para el desarrollo de pterigión han sido evaluados en diferentes partes del mundo y han proporcionado pruebas de que un componente genético puede estar implicado en la patología de pterigión. También mecanismos anti-apoptóticos, citocinas, factores de crecimiento, los factores angiogénicos (Li y col., 2005), la remodelación de la matriz extracelular, los mecanismos inmunológicos, e infecciones virales han sido relacionados en su patogenia (Gallagher y col. , 2001; Di Girolamo y col., 2002).

Papel de radiación ultra-violeta (RUV)

Los estudios epidemiológicos indican que la exposición crónica a la radiación solar (RUV), incluida probablemente la radiación ultravioleta β (UV-B), es un factor importante en el desarrollo del pterigión. Se sabe que la RUV tiene un efecto cancerígeno, lo que resulta en daños en el DNA con la pérdida de control del crecimiento normal (Rodríguez y col., 2008).

La arquitectura periorbital, incluyendo la presencia del borde orbital superior, la presencia de las cejas y la prominencia nasal implica que los ojos están relativamente protegidos a la exposición directa de la luz solar. Por otro lado los ojos están relativamente sin protección de la luz proveniente de posiciones tanto lateral como inferior (Detorakis y Spandidos, 2009).

Existen reportes que plantean la posibilidad de que la exposición a la luz solar actúe en combinación con la exposición al polvo o la arena, lo que conduce a la superficie ocular a una inflamación crónica. Sin embargo, la alta prevalencia del pterigión en marineros o pescadores que viven en ambientes que carecen de polvo, lleva a deducir que estas personas solamente fueron expuestas a cantidades mayores de luz dispersada por superficies reflectantes, como la superficie del mar, apuntando hacia una participación del albedo en la formación del pterigión. (Ochoa Tabares, 2006)

En un nivel molecular, la RUV se asocia con la creación de radicales libres activos que atacan moléculas como el DNA y desactivan otras. Sin embargo, en el ojo, los radicales libres pueden ser desactivados por las proteínas de la película lagrimal incluyendo la lactoferrina (Weinberg, 2003).

Se propone que la RUV puede ser el disparador inicial que active las células epiteliales basales (no superficiales) del limbo a producir citocinas como IL-6 e IL-8 así como factores de crecimiento. Estas proteínas multifuncionales activan una cascada de eventos que incluyen; inflamación con aumento de infiltración leucocitaria, proliferación con incremento de linfocitos T, fibroblastos y miofibroblastos, angiogénesis con precursores como el óxido nítrico, la aparición de capilares en el tejido epitelial, y antiapoptosis por acción del interferón

gama. Estas citocinas inducen la expresión de metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs), afectando indirectamente el índice de remodelamiento tisular, promoviendo que un segmento del epitelio del limbo invada la córnea en forma centripeta, seguido por el epitelio conjuntival, acompañado de la vascularización que ocurre en la conjuntiva adyacente al pterigión.

Esto provoca la destrucción de la membrana de Bowman por acción de colagenasas (MMPs) y la invasión del pterigión por acción del factor de crecimiento fibroblástico beta (FGF β) y factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Ochoa-Tabares, 2006).

Superficie ocular

Estudios previos han reportado una asociación entre el pterigión y cambios en el ojo seco, como la reducción de lágrima y ruptura de la película lagrimal. Estos hallazgos indican que el pterigión puede ser la manifestación de una disfunción generalizada de la superficie ocular incluyendo una reacción inflamatoria crónica. Una sobreexpresión de la expresión de las α -defensinas humanas en fluidos lagrimales de pacientes con pterigión proporciona un indicador adicional para establecer una conexión entre el pterigión y la inflamación crónica de la superficie ocular (Detorakis y Spandidos, 2009).

Otro estudio reporta la sobreexpresión de la fosfolipasa D (PLD) tipo 2, 3 y 4 en el pterigión en comparación con conjuntiva normal. La PLD está involucrada en varios procesos incluyendo inflamación, diferenciación celular, apoptosis y cicatrización de la herida; la detección de alteraciones de PLD apoya su posible papel en la patogénesis del pterigión (Tong y col., 2008).

Estrés oxidante

El aumento en la RUV asociada con el estrés oxidante ha sido reportado en el pterigión, ya que comparado con la conjuntiva normal, las conjuntivas con pterigión presentan una inducción de proteínas como survivina. Esto último ha sido correlacionado con la oxidación del DNA y una baja regulación de p53. Se ha sugerido también que la presencia de depósitos de hierro en la cabeza del pterigión puede indicar estrés oxidante, afectando células locales epiteliales y resultando un importante daño al DNA (Maxia y col., 2008).

Factores de crecimiento y citocinas

La expresión abundante de IL-8 y la infiltración leucocitaria son consistentes con su actividad quimiotáctica y sugiere que la acumulación de neutrófilos en el pterigión puede deberse, por lo menos en parte, a la expresión de esta interleucina (Ansel y Zivony, 2001).

Alteraciones genéticas

La etiología genética se propone ya que en algunos estudios se ha encontrado la pérdida de heterocigosidad (LOH abreviado en inglés) de genes supresores de tumores en el tejido de pterigión. La estrecha asociación de LOH con pterigión apunta hacia una participación de los genes supresores de tumores en el desarrollo del pterigión (Detorakis y Spandidos, 2009). Por ejemplo, se ha reconocido que la RUV es un factor que produce la mutación del gen supresor de tumores p53, y se ha reportado una expresión anormal de p53 en pterigión, pingüecula y tumores del limbo (Ochoa-Tabares, 2006).

Por lo anterior, el mecanismo de muerte celular programada dependiente de p53 se ve alterado ya que la expresión anormal de este gen causa la aparición de células de pterigión y una interacción anormal entre fibroblastos y células T, mediada a su vez, por $INF\beta$ el cual tiene efectos antiproliferativos y antiapoptóticos.

Estos eventos contribuyen por lo tanto al desarrollo de inflamación crónica y a la promoción de cicatrización conjuntival persistente (Tan y col., 2000)

Asimismo, mutaciones en otros genes pueden adquirirse progresivamente en las células basales limbales alteradas. Así, alteraciones en los genes de p67 y p73 cuyas proteínas están implicadas en la diferenciación celular se han relacionado con anomalías sistémicas y oculares (Yang y col., 1998).

Papel de la herencia

Reportes previos mencionan la posibilidad de un patrón hereditario autosómico dominante, basado en casos de familias que presentan pterigión. Sin embargo, no se ha podido verificar si el pterigión por sí mismo es heredado, como un carácter independiente o si los individuos afectados tienen mayor susceptibilidad a los efectos oculodermales de la luz solar (Detorakis y Spandidos, 2009).

Con base en esto, se ha sugerido una hipótesis de "dos eventos", la cual propone que el pterigión es causado por la combinación de un daño genético pre-existente producido por la RUV o bien por factores hereditarios y un agente oncogénico ambiental. Dentro de los factores ambientales que se han considerado son de interés, los virus, en especial aquellos que han demostrado potencial oncogénico, como el virus del papiloma humano (VPH) (Detorakis y col., 2000; Detorakis y col., 2001).

Participación de los virus

Varios estudios han investigado la participación del VPH en el desarrollo del pterigión, sin embargo, los resultados obtenidos no son concluyentes (Detorakis y Spandidos, 2009).

Algunos de estos estudios han mostrado que existe una gran variabilidad geográfica en la proporción de los pterigiones positivos para VPH (Gallagher y col., 2001; Piras y col., 2003). Por ejemplo, en análisis realizados en Taiwán y Estados Unidos, no se identificó al VPH en las 65 muestras de pterigión, estudiadas del primer país ni en las 13 del segundo.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*



Instituto de Oftalmología
"Fundación Conde de Valenciana IAP"

Sin embargo, otros estudios realizados en Grecia, Gran Bretaña, e Italia, demostraron porcentajes positivos para VPH presentando un 30% para el primer país, 50% para el segundo y 100% para el tercero, siendo en este último caso positivo para VPH tipo 16 (Dushku y col., 1999; Chen y col., 2003; Piras y col. , 2003)

Virus del papiloma humano (VPH)

El género *Papillomavirus* está encuadrado dentro de la familia *Papovaviridae*. En este género se han descrito más de 200 tipos distintos. Se llaman Papillomavirus porque ciertos tipos pueden causar verrugas o papilomas que son tumores benignos. El aspecto de las lesiones que producen varía según el tipo del virus, la localización y el estado inmunológico del huésped. Estas circunstancias dan lugar a diversas formas clínicas, entre las que se destacan verrugas vulgares, verrugas planas, verrugas plantares y verrugas genitales o condilomas. Algunos tipos son oncogénicos y concretamente, la asociación entre el VPH y el cáncer de cuello uterino está bien establecida (Serrano y col., 2003). El VPH también se ha asociado con tumores epiteliales de la conjuntiva, incluyendo papiloma conjuntival (Sjo y col., 2001) y carcinoma conjuntival (McDonnell y col., 1992).

Estructura

Son virus desnudos de 45-55 nm de diámetro, con DNA bicatenario circular. Este genoma está rodeado por una cápside icosaédrica de 72 capsómeros formada principalmente por la proteína L1 de 57 kDa y que constituye el 80% del peso del virión y por otra proteína de 76 kDa, L2, en menor proporción. Se han podido obtener determinantes antigénicos específicos de especie ubicados en la superficie del virión (Serrano y col., 2003). El genoma tiene aproximadamente 8000 pares de bases y está funcionalmente dividido en dos regiones (fig. 7).

La región temprana codifica proteínas responsables de las funciones de transformación y replicación viral. En la región temprana (denominada E), se incluyen fragmentos que tienen un papel importante en la transformación de células sanas a células malignas, ya que codifican proteínas conocidas como E5, E6 y E7 que interfieren con las funciones de la célula que normalmente previenen la división sin control.

La región tardía (denominada L), codifica las proteínas estructurales de la cápside. Contiene las secuencias de genes que codifican para proteínas de la cápside, L1 y L2, que formarán los

viriones; y una región reguladora, denominada región larga de control, LCR (por sus siglas en inglés Locus Control Región), que comprende de 400 a 1000 pb, dependiendo del tipo viral (Seedorf y col., 1987).

La LCR contiene secuencias reguladoras de la transcripción de los genes virales. La transcripción de los genes de VPH se realiza en una sola dirección y genera una gran cantidad de transcritos. Estos transcritos se traducen como proteínas de fusión o bien como productos policistrónicos (Collier y Oxford, 2000).

En lesiones no malignas, el DNA de VPH es extra cromosómico, sin embargo, en la mayoría de los cánceres invasivos asociados con esta infección viral, su DNA está integrado en el genoma de la célula huésped. En infección por VPH 16 y 18 ocurre integración del DNA, no así en infecciones por VPH de bajo riesgo 6 y 11 (Zur Hausen, 1994).

El proceso de integración del VPH al genoma de la célula, se relaciona con el proceso de transformación celular. Cuando el DNA viral se integra, se da una ruptura en el marco abierto de lectura de los genes E1 y E2, y los sitios en los que se inserta son diversos. Sin embargo, se ha descrito que el DNA del VPH se integra en posiciones cercanas a la localización de protooncogenes como *myc*, *c-raf*, *c-src* y otros (Ocadiz y col., 1987).

La proteína E6 incrementa la degradación de la proteína humana p53, mientras que E7 antagoniza la función de la proteína pRb (Retinoblastoma). Los productos de los genes E6 y E7 son importantes en el establecimiento y mantenimiento del cáncer cérvico uterino, así se ha demostrado en modelos celulares de queratinocitos y fibroblastos, que han sido transfectados con los genes E6 y E7 (Sánchez y col., 2005).

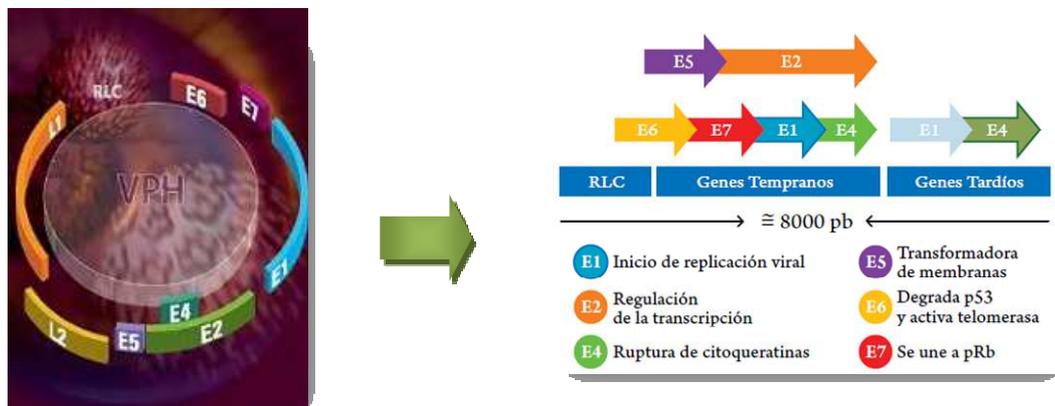


Figura 7: Organización del genoma del VPH. El genoma de los papillomavirus es muy conservado. Los ORFs (marcos abiertos de lectura) E1, E2, E4, E5, E6 y E7 codifican para proteínas que son importantes en la replicación del DNA viral, así como de la expresión de los genes del virus. Los ORFs L1 y L2, codifican para las proteínas de la cápside del virus. La transcripción es regulada por las secuencias que se localizan en la LCR, en donde se unen diversos factores celulares, así como de la proteína viral E2.

El VPH puede transformar a la célula por la interacción de los productos de los genes E6 y E7 sobre las proteínas p53 y pRB, respectivamente. La proteína E6 se asocia con proteínas celulares como E6AP, una ligasa de la vía de proteólisis por ubiquitina. Los complejos E6/E6AP se unen a la proteína p53, lo que deriva en una degradación de p53 por el proteasoma y esto provoca un aumento en la inestabilidad genética. Por otra parte, se ha descrito que E7 se une a la proteína Rb y a miembros de la familia de pRb (Dick y Dyson, 2002).

La unión de E7 con pRb, se da en la forma hipofosforilada de pRb, lo que deriva en la liberación del factor de transcripción E2F activo y esto induce la expresión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular. La consecuencia de esto es la desregulación en la proliferación y diferenciación celular, y también una inhibición del proceso de apoptosis.

Otro mecanismo de transformación celular descrito para los genes E6 y E7 de VPH, es mediante la capacidad de regular positivamente la actividad de genes celulares, así como la inducción de la actividad de la telomerasa. Estos mecanismos descritos pueden participar en la evolución del cáncer cérvico uterino, incluyendo alteraciones de uno o más oncogenes para generar la transformación e inmortalización celular, así como el desarrollo de un estado de inmunosupresión local (Stanley y col., 2007).

Clasificación

En la actualidad se conocen más de 200 tipos diferentes de VPH, llamados por números: VPH-1, VPH-2, VPH-3, etc. Los tipos se determinan según el grado de homología del DNA (porcentaje de hibridación cruzada) ya que no se diferencian serológicamente. Por definición, la secuencia de nucleótidos de E6, E7 y L1 de un nuevo tipo de VPH no debe poseer más del 90% de homología con las secuencias correspondientes de tipos conocidos de VPH. A su vez, dentro del mismo tipo de VPH pueden existir diferentes subtipos cuando poseen del 90-98% de secuencia del DNA similar al tipo correspondiente, o variantes cuando muestra no más de un 98% de homología en la secuencia del prototipo.

Basados en su asociación con cáncer cervical y lesiones precursoras, los VPH pueden también agruparse en tipos de alto y bajo riesgo (Serrano y col. , 2003).

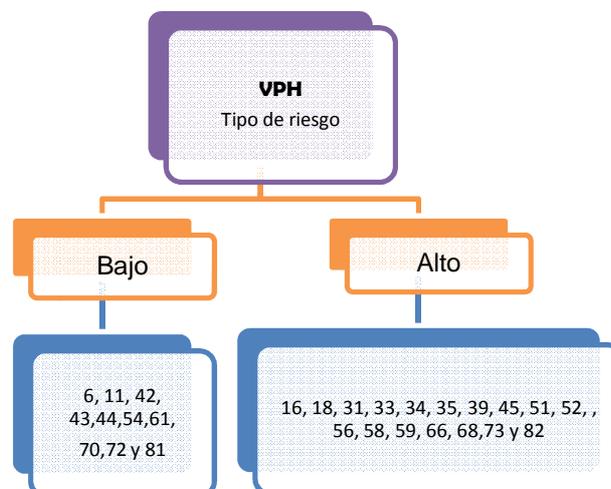
Tabla 1: Tipos de VPH y patologías relacionadas

| Localización | Tipo de VPH | Patología |
|-------------------------|--|---|
| Planta del pie | 1 | Verruga plantar y palmar profunda |
| Manos | 2,4,7 | Verrugas comunes |
| Brazos | 3,10 | Verrugas comunes y planas en inmunosuprimidos |
| Cabeza, tronco y brazos | 26,29,34,57,5,8,9,12,14,15,17,19,25,36,37,38,46,50 | Hiperplasia epitelial |
| Cavidad oral | 13,32,57 | Carcinoma laríngeo |
| Laringe | 30, 40 | Condilomas |
| Genitales y ano | 6,11,16,18,31,33,34,35,39,40,41,42,45,51,53,54,55,56,58. | Carcinomas |

Papillomavirus y malignidad

La infección genital por VPH es de considerable importancia, ya que en los últimos años se ha acumulado una gran evidencia de la implicación de un número variable de tipos específicos de VPH como posibles agentes causales de lesiones proliferativas escamosas en cérvix, vulva, ano, pene, laringe, lengua y conjuntiva. Especialmente, se han asociado los papillomavirus con el desarrollo de carcinoma de cérvix, donde, al menos en el 92% de los carcinomas cervicales invasivos se detecta DNA de VPH genital, lo que ha hecho pensar a la mayoría de investigadores que la infección de VPH es necesaria para el desarrollo de cáncer cervical. Los papillomavirus genitales son clasificados comúnmente como de alto y bajo riesgo, dependiendo de la frecuencia con la que estos estén presentes en los carcinomas (fig. 8) (Serrano y col. , 2003).

Figura 8: Clasificación de los papillomavirus dependiendo el riesgo.



Justificación

El pterigión es una lesión de fibrovascular de la superficie del ojo que tiende a aumentar en tamaño y reaparecer después de la extirpación quirúrgica. La membrana de Bowman y las capas superficiales de la córnea por debajo de la lesión están dañadas. Es probable que la agudeza visual disminuya en etapas avanzadas debido a la interferencia del eje visual o por astigmatismo (Piecyk-Sidor y col. , 2009) .

Se cree que la formación del pterigión es un proceso en el que la genética y factores ambientales (principalmente la radiación solar), así como la infección de un virus (VPH), son susceptibles de participar. Esto se relaciona con la aparición de los cambios histológicos tales como displasias locales, suministro de sangre adicional y la recidiva después de la cirugía de eliminación de la lesión. El VPH está implicado como un factor causal en neoplasias benignas y malignas del cuello del útero, las vías respiratorias, la piel y la mucosa oral, también el DNA del VPH se ha detectado en el carcinoma de células escamosas de la conjuntiva (McDonnell y col. , 1992), las neoplasias epiteliales del saco lagrimal, la displasia conjuntiva, el papiloma de la conjuntiva, y la pingüecula. Algunas de las características patológicas del pterigión son similares a las inducidas por el VPH en otros epitelios, por lo que se ha planteado la posibilidad de que el VPH puede estar involucrado en la patogénesis de pterigión (Gallagher y col. , 2001). Se ha propuesto que una primera alteración debida a la exposición a la luz UV más una segunda alteración como por ejemplo la infección con VPH puede ser detonante de la desregulación del crecimiento de las células conjuntivales debida a la infección por el virus del papiloma humano por lo menos en algunos casos de pterigión. Sin embargo, el enunciado anterior aun no es concluyente ya que algunos estudios han demostrado la presencia de VPH en pterigión, mientras que otros no encuentran VPH asociado al pterigión (Detorakis y Spandidos, 2009). En México no se conoce si existe frecuencia de aparición del VPH en el pterigión. El establecimiento de esta aparición, permitirá conocer con mayor detalle en el futuro los orígenes de este padecimiento.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es la frecuencia del Virus del Papiloma Humano en el pterigión?

Hipótesis

La presencia del virus del papiloma humano se ha reportado conjuntamente con la aparición de pterigión, pero su asociación con esta enfermedad no ha sido probada por lo que, si se evalúan la presencia de DNA del virus y la expresión de sus proteínas se podrá determinar, en la población mexicana su frecuencia de asociación con el pterigión.

Objetivos

General

Determinar la frecuencia del VPH en muestras de pterigión.

Particulares

Determinar la presencia del VPH y establecer el tipo de virus presente en el pterigión.

Determinar la expresión del gen L1 de los tipos de VPH, presentes en los pterigiones positivos.

Material y métodos

Obtención de Muestras

Las muestras se obtuvieron de 40 pacientes, que acudieron al Instituto de Oftalmología. Fundación Conde de Valenciana, para la resección quirúrgica del pterigión.

Después de la resección las muestras se colocaron en solución salina balanceada estéril (PBS). En una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel III. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS y finalmente con la misma solución con gentamicina (1mg/ml).

Se obtuvieron 12 muestras de conjuntiva sana (conjuntiva palpebral) de pacientes que decidieron someterse a intervención quirúrgica, para la resección de pterigión (consentimiento informado). Estas muestras de conjuntiva que se tomaron como control y fueron sometidas a los mismos procedimientos (Extracción de ácidos nucleicos, análisis de presencia de VPH) que las muestras de Pterigión.

Criterios de inclusión

Pacientes de cualquier edad, sin distinción de género que, al acudir a consulta solicitaron la resección del pterigión primario, sin importar la presencia de alguna enfermedad crónica degenerativa o la ingesta de fármacos; mediante consentimiento informado. Obteniendo conjuntiva sana de los mismos pacientes que solicitaron la resección del pterigión.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción del DNA se realizó según el protocolo de QuickGene culture cells HC (Quick Gene, Life Science, Fujifilm Co; Holliston, MA). El material genético (DNA) fue almacenado a -70°C hasta su procesamiento.

Análisis de la presencia de VPH

Para la identificación del VPH, se amplificó por PCR en un termociclador Perkin Elmer, utilizando Hotstar Taq DNA polimerasa (Taq Hs, Qiagen PCR), la región L1 del genoma de VPH utilizando dos oligonucleótidos universales MY09/MY11 (tabla 2) (Manos y col., 1989), para la amplificación de un fragmento de 450 pb. El programa de amplificación que se empleó fue, un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 15 min, seguido por 40 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min, finalizando con un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en una cámara Horizon 58 (life Technologies Gibco Co. Burlington, ON) en un gel de agarosa al 1.5% y las bandas del amplificado se cortaron del gel y se purificaron utilizando el estuche Qiaex II kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Tabla 2: Oligonucleótidos universales para HPV

| Nombre | 5' --- 3' | Tamaño del amplicón |
|--------|----------------------|---------------------|
| MY09 | CGTCCMARRGGAWACTGATC | 450 pb |
| MY11 | GCMCAGGGWATAAYAATGG | 450 pb |

Gen 18s rDNA

Este gen constitutivo se utilizó como control interno en las muestras de pterigión y en las muestras de conjuntiva sana.

Determinación del genotipo de VPH por secuenciación

Se efectuó por secuenciación automatizada directa, utilizando el oligonucleótido MY09 del gen L1, por el método de terminadores fluorescentes (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). La secuenciación se realizó en un secuenciador Applied Biosystems (USA), para esto se utilizaron 20ng del DNA purificado.

Las secuencias obtenidas se compararon mediante el algoritmo BLAST contra las secuencias del banco de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para poder tipificar la cepa de VPH presente en cada una de las muestras de pterigión.

Western blot para el análisis de la proteínaL1

Las muestras de pterigión se resuspendieron en 500 µl de buffer de lisis: Tris pH 7.5 (20mM), EDTA (1mM), NaCl (0.15mM), NaF (50mM), Triton x-100 (1%), Na₃NO₄ (4mM) e inhibidores de proteasas (Roche). Las muestras de pterigión fueron lisadas por congelaciones repetidas en N₂ líquido. Las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE al 12 %. Se adicionaron 30 µg de proteínas por pozo. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca Scientific C.O (U.S.A).

La membrana se bloqueo durante 1 hr con 3% de leche descremada en PBS con 0.02% de azida de sodio, y 0.02% de Tween 20. Para estos estudios la dilución de los anticuerpos fue la siguiente: anti-L1 (1:100), anticuerpo secundario, anti-ratón conjugado con biotina (DAKO, Inc.) (1:20 000) y anti-biotina conjugado con HRP (1:5000) en PBS con 0.1% de Tween-20 y 0.02% de azida de sodio.

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario a 4°C, durante toda la noche. Después se realizaron 3 lavados (cada lavado duro 10 minutos) con PBS adicionado de Tween 20. Se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el segundo anticuerpo. Se realizaron tres lavados y se incubó con el último anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo con quimioluminiscencia (ECL Western blotting detection system, Amersham,

Biosciences. UK). Se utilizó como control constitutivo a GAPDH, en una dilución 1:5000 (IgM, ZYMED, Inc.). Las imágenes de quimioluminiscencia fueron capturadas con el fotodocumentador Diversity (Syngene, UK).

Análisis estadístico

Se hizo una prueba de X^2 de Pearson, considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

Resultados

Detección de VPH

Se analizaron 40 muestras de pterigión primario, obtenidas de pacientes que acudieron al Instituto de Oftalmología. Fundación Conde de Valenciana, para ser intervenidos quirúrgicamente y reseca el pterigión. Las muestras fueron analizadas por PCR para la detección de DNA de VPH, utilizando un par de oligos degenerados, mismos que están diseñados para amplificar una región muy conservada del gen L1 de la mayoría de los tipos de VPH descritos (Manos y col. , 1989). Al analizar las muestras de pterigión para la presencia del VPH, se observó que 19 de las muestras amplificaron el fragmento esperado de 450 pb (fig. 9), mismo que correspondía en tamaño al control positivo (DNA de células HeLa). Se analizó el gen constitutivo 18S como control de carga interno en las muestras de pterigión.

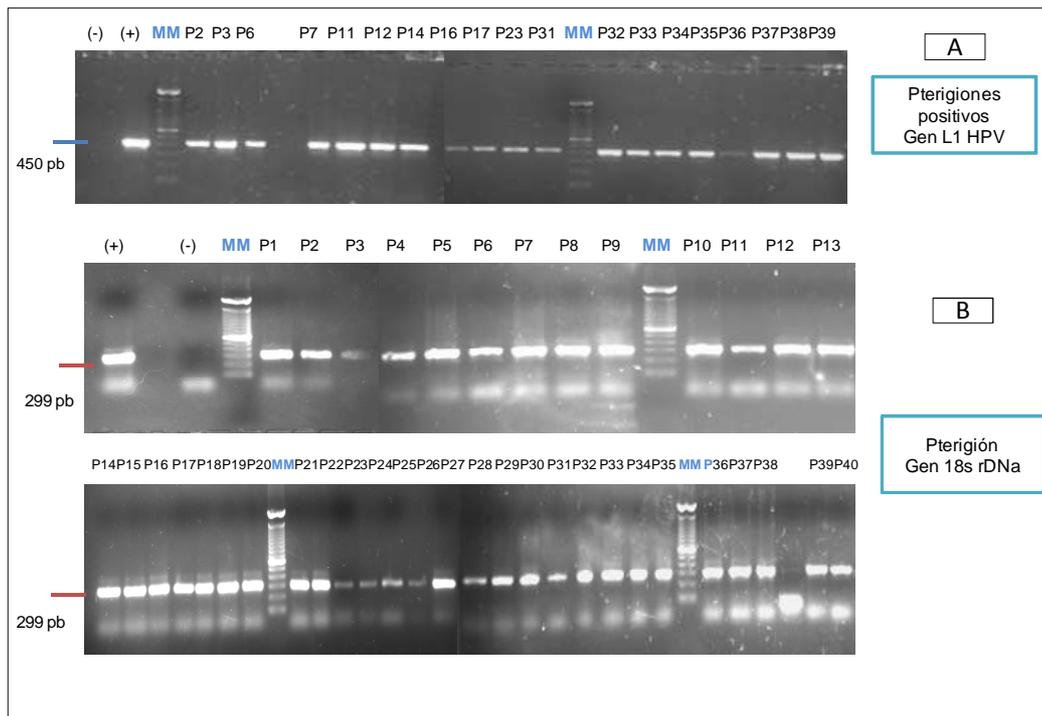


Figura 9: Análisis por PCR del gen L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de pterigión primario, utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11. A) Muestras de pterigión positivas al gen L1 de VPH. La flecha azul indica la banda de 450 (pb). B) Amplicón del gen constitutivo 18S, utilizando como control de carga. La flecha roja indica la banda de 299(pb); los primeros carriles presentan al testigo positivo, mostrando un patrón similar las muestras de Pterigión que ocuparon el resto de los carriles del gel

De las 40 analizadas muestras, 19 de estas fueron positivas a la presencia del DNA de VPH, lo que representa una el 47%, mientras que en las 21 restantes (53%) no se detectó la presencia del DNA del virus (tabla 3).

Tabla 3: Frecuencia de muestras de pterigión positivas a DNA de VPH

| VPH positivas | VPH negativas | Número total de muestras |
|----------------------|----------------------|---------------------------------|
| 19 (47%) | 21(53%) | 40 (100%) |

DetECCIÓN DE VPH EN CONJUNTIVA SANA

Se obtuvieron muestras de conjuntiva sana de pacientes que acudieron al Instituto de Oftalmología. Fundación Conde de Valenciana, los cuales fueron intervenidos quirúrgicamente para la resección de pterigión, obteniendo en ese momento un fragmento de conjuntiva palpebral sana, dichas muestras representaron el grupo control en el análisis, para poder detallar si la presencia del DNA de VPH solo llega presentarse en el padecimiento (pterigión), o también puede afectar al tejido conjuntival que no presenta alteraciones por dicha enfermedad.

Se analizaron 12 muestras de conjuntiva sana de las cuales ninguna presentó amplificación del gen L1 (450 pb), en contraste con el control positivo (células HeLa), como se observa en la figura 10. También se analizó el gen constitutivo 18S como control de carga interno.

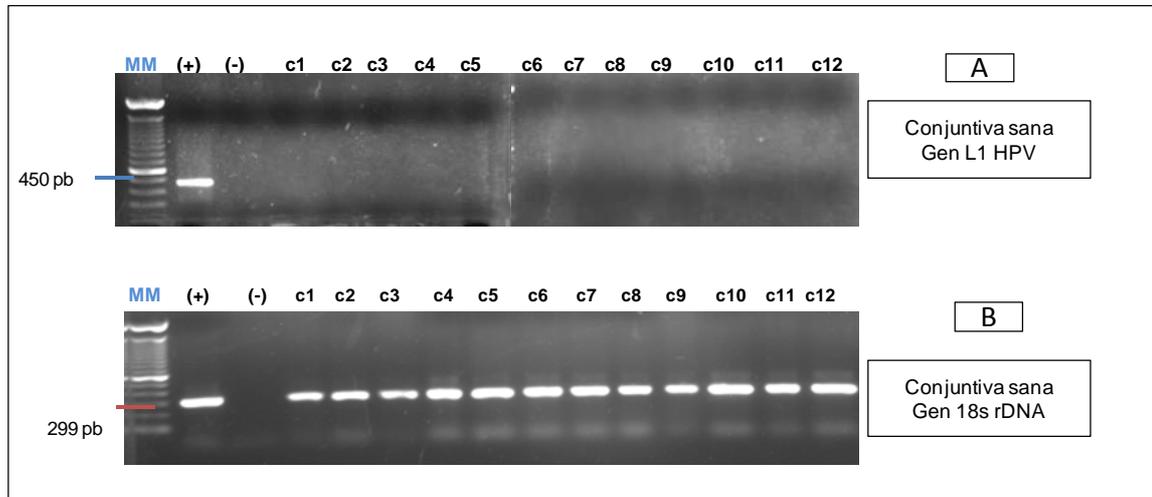


Figura 10: Análisis por PCR del gen L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de conjuntiva sana, utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11. A) Gel de agarosa (1.5%) del amplificado de PCR de la región L1 del genoma del Virus del Papiloma Humano (VPH) mediante los oligonucleótidos MY09/MY11. La flecha azul indica la banda de 450 (pb); a partir del carril 4 se colocaron las muestras de conjuntiva sana, las cuales no muestran amplificado (+). B) Gel de agarosa (1.5%) del amplificado de PCR del gen constitutivo. La flecha roja indica la banda de 299(pb); todas las muestras presentan amplificación del gen 18s rDNA.

Identificación del genotipo de VPH.

Las muestras que fueron positivas para la presencia de DNA del VPH fueron secuenciadas por el método de terminadores fluorescentes para determinar el genotipo del VPH. Las secuencias obtenidas se compararon mediante el algoritmo BLAST contra las secuencias del banco de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), lo que permitió tipificar la cepa de VPH presente en cada una de las muestras de pterigión (fig. 11).

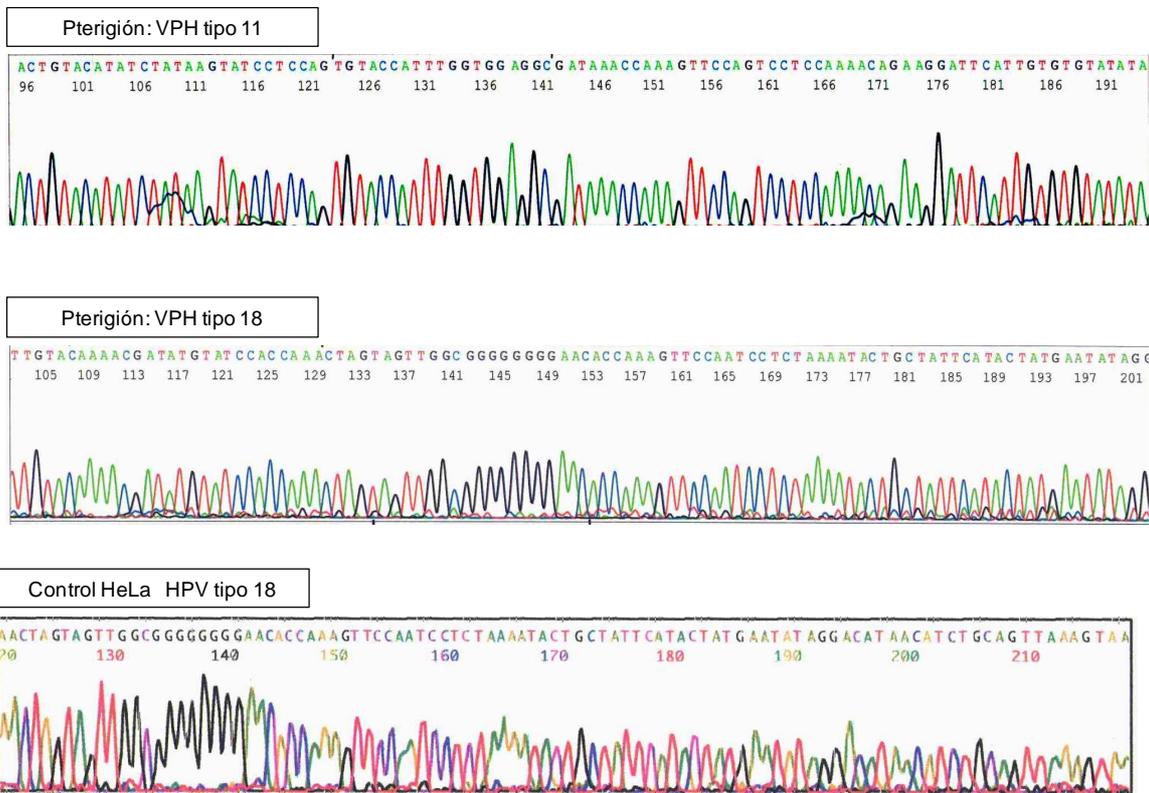


Figura 11: Electroferogramas de muestras de pterigión positivas para VPH.

Los tipos de VPH encontrados en las muestras de pterigión corresponden a los tipos 18 y 11, estos virus presentan un riesgo oncogénico alto y bajo respectivamente.

De las muestras que dieron positivo para VPH, en 11 se identificó el VPH tipo 11, mientras que en 9 muestras se identificó al VPH tipo 18, lo que da frecuencias de 58% y 42% respectivamente (fig. 12). El tipo de VPH 11 que es de riesgo oncogénico bajo fue el de mayor proporción.

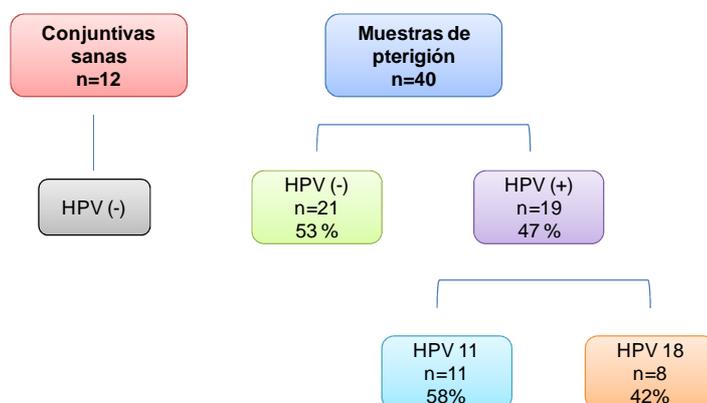


Figura 12 : Frecuencia del VPH en las muestras de pterigión.

Análisis estadístico

El resultado para la conjuntiva sana es de cero por ciento, por lo que fue necesario realizar una corrección denominada “corrección de levene”, que asume que el cero es igual a 0.05.

Hecha la corrección, se realizó la prueba de X^2 de Pearson, en donde solo se tomaron en cuenta los valores positivos. El resultado de la prueba se resume en la siguiente tabla:

Tabla 4: Prueba X^2 de Pearson.

| VPH | Pterigión VPH Pos | Conjuntiva Sana | P |
|-----|-------------------|-----------------|-------|
| | 19 (47%) | 0 (0%) | 0.001 |

El riesgo relativo, es de 175 veces mayor en los pterigiones positivos que en la conjuntiva sana.

Resultando en una asociación alta entre pterigión y VPH, por otro lado, aquel paciente que sea positivo a VPH su riesgo es mayor que aquellos que no lo tienen.

Western blot para el análisis de la proteína L1

Los resultados muestran la presencia de la banda correspondiente a L1 (57kDa) en 2 de las muestras analizadas (n=10). Se utilizó GAPDH como control constitutivo, revelando de igual manera una banda, de 42 kDa (fig. 13).

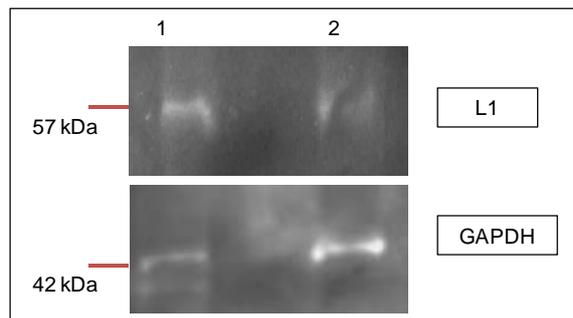


Figura 13: Western blot vs L1. Se observa una banda de 57kDa correspondiente a la proteína L1 en las 2 muestras analizadas. GAPDH fue utilizado como control constitutivo. Se colocaron 10 μ g de proteína por pozo, en un gel de poliacrilamida; la transferencia se realizó usando membrana de nitrocelulosa con un voltaje de 120mA

Discusión

El pterigión es una de las enfermedades más frecuentes en oftalmología. Esta lesión se caracteriza por una neoformación fibrovascular de la conjuntiva bulbar hacia la córnea. El pterigión se ha considerado una enfermedad degenerativa crónica. Aunque la patogenia de la pterigión no se entiende aún claramente (Garfías y col., 2009).

El aumento de su prevalencia y los costos derivados de su atención, hacen que sea considerado como un problema de salud pública.

En el año 2000 se propuso un modelo de formación del pterigión, en donde virus oncogénicos como el VPH, probablemente se encuentren involucrados en el desarrollo del Pterigión, mediante la inducción de cambios en el genoma, y/o tal vez por cambios causados por la exposición a rayos UV, así como factores hereditarios (Detorakis y col. , 2000).

El pterigión se desarrolla predominantemente en el lado corneal nasal del ojo, se propone que la radiación UV incide tangencialmente y que se enfoca hacia el limbo nasal, siendo este el factor principal de su génesis. Debido a su longitud de onda corta y alta energía, la RUV puede comenzar reacciones fotoquímicas que conllevan cambios del tejido, que predisponen la formación del pterigión. En otra teoría se plantea que la reflectividad del terreno, podría explicar la predilección nasal del pterigión, ya que la RUV se refleja fuera de la piel de la nariz y de las regiones faciales adyacentes hacia el lado nasal del ojo. La reflexión nasal y temporal de luz incide y es refractada por la córnea, causando la exposición de RUV, incluso en presencia de gafas de sol y sombrero. (Aragonés 2009)

Estudios epidemiológicos han establecido que la RUV tipo B es un factor etiológico para Pterigión. La RUV se ha reconocido como un factor que produce mutaciones en el gen supresor de tumores p53. Se ha reportado una expresión anormal de p53 en pterigión, generando un daño al mecanismo de apoptosis, por lo que el factor de crecimiento

transformante β se produce en mayores cantidades, originando aumento en la expresión de las colagenasas, migración celular y angiogénesis (Ochoa Tabares, 2006).

Algunos informes mencionaron la posibilidad de un patrón hereditario autosómico dominante, basado en casos de familia que presenta pterigión. Sin embargo, no se ha podido verificar si el pterigión por sí mismo es heredado, como un carácter independiente o si los individuos afectados tienen mayor susceptibilidad a los efectos oculodermales de la luz solar. (Detorakis y Spandidos 2009)

En nuestro estudio la presencia de DNA de VPH en el pterigión se confirmó en 47% de los casos. Se presentan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de pterigiones positivos. Observando una p menor a 0.001, lo que indica una diferencia muy grande.

Algunos autores han reportado la presencia de virus oncogénicos en el Pterigión.

Tabla 5: VPH en Pterigión. Comparación bibliográfica.

| Número de casos | VPH (+) | Tipo de VPH | Autor |
|-----------------|-----------|-----------------|--------------------------|
| 100 | 4 | VPH 6 | Sjö (2007) |
| 36 | 0 | | Schellini (2006) |
| 10 | 5 (50%) | VPH 38 y 11 | Ateenyi-Agaba (2004) |
| 32 | 4 (12.5%) | No identificado | Rodriguez-Cabrera (2004) |
| 17 | 17 (100%) | VPH 52,54 y 90 | Piras (2003) |
| 24 | 5 (21%) | | Piras (2003) |
| 65 | 0 | | Chen (2003) |
| 10 | 5 (50%) | VPH 6,11 y 16 | Gallagher (2001) |
| 50 | 12 (24%) | VPH 18 | Detorakis (2001) |
| 3 | 0 | | Piras (2003) |
| 40 | 19 | VPH 11 y 18 | Sámamo 2012 |

En la mayoría de dichos estudios el VPH se determinó mediante la técnica de PCR, y la incidencia mostrada fue del 4.4 al 100% (Detorakis y col. , 2001; Gallagher y col. , 2001).

Los diferentes tipos de VPH se pueden dividir de acuerdo con la habilidad potencial de causar lesiones neoplásicas. No es común encontrar tipos de VPH llamados de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44) en neoplasias; mientras que los virus comúnmente encontrados son los llamados de alto riesgo (16, 18, 31, 45, 56) (Di Girolamo y col. , 2002; Baseman y Koutsky, 2005).

Los genotipos de VPH de alto riesgo causan cáncer cervical, estos mismos tipos de VPH parecen ser los responsables de lesiones anogenitales y de cáncer de cuello y cabeza (Zur Hausen, 2002).

Los tipos oncogénicos de VPH de alto riesgo tienen la capacidad de inmortalizar queratinocitos humanos. Aunque existe la posibilidad de transformación neoplásica de células infectadas con VPH de bajo riesgo, dependerá de la afinidad de proteínas oncogénicas y probablemente este hecho sea condicionado por factores físicos o químicos (Piecyk-Sidor y col. , 2009).

En este estudio, también se encontró la presencia de virus oncogénicos en el pterigión y se determinó la presencia del virus mediante PCR, los tipos de VPH encontrados en este trabajo fueron el 11 y 18, de bajo y de alto riesgo oncogénico respectivamente.

Las infecciones por el virus del papiloma humano (VPH) se encuentran distribuidas en todas las poblaciones alrededor del mundo. No tienen incidencia estacional, es una de las infecciones más frecuentes de las transmitidas sexualmente, y los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 han sido implicados en el desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCu). Alrededor del mundo se reporta que los genotipos 16 y 18 están más implicados en el desarrollo de CaCu. En México, las frecuencias reportadas de infección por VPH son heterogéneas y oscilan entre 14.4% y 51.7% (Canal y col., 2010).

Gracias a diferentes estudios (incluyendo este trabajo) en donde se encontró la presencia de DNA de VPH en casos de pterigión, es que se intenta descifrar como actúa el VPH sobre este tejido.

Se conoce que las proteínas del VPH pueden actuar sobre proteínas como p53 y pRb, alterando procesos importantes como la apoptosis y el ciclo celular. Tomando en cuenta las características de las proteínas E6 y E7 del VPH, se ha descrito que pueden inactivar a p53 y pRb (Piecyk-Sidor y col. , 2009).

La proteína E6 se asocia con el gen supresor de tumores p53 y lo marca para su degradación (fig. 14). Es probable que la acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo sea inhibir la función de p53, mediante su degradación por la vía de la ubiquitinación. Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a Mdm2 (murine double minute 2), que en células normales no infectadas es quien degrada a p53. E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación. En consecuencia E6 inhibe la capacidad de p53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de p53. Por otro lado la mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo no se unen a p53 o lo hacen débilmente y no lo degradan (López y Lizano, 2006).

Otra proteína de suma importancia en la infección por VPH es E7, la cual se une específicamente al producto del gen represor de tumores Rb. La proteína Rb fue descubierta y caracterizada en el retinoblastoma, y es un factor regulador del ciclo celular, ya que se une directamente al factor de transcripción E2F, que a su vez induce la transcripción de elementos involucrados con la replicación celular; la familia pRB controla la replicación celular (Zur Hausen, 2002).

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 (fig. 15). De esta manera E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células, produciendo tumores cervicales a largo plazo (Sánchez y col. , 2005).

Mecanismo de E6

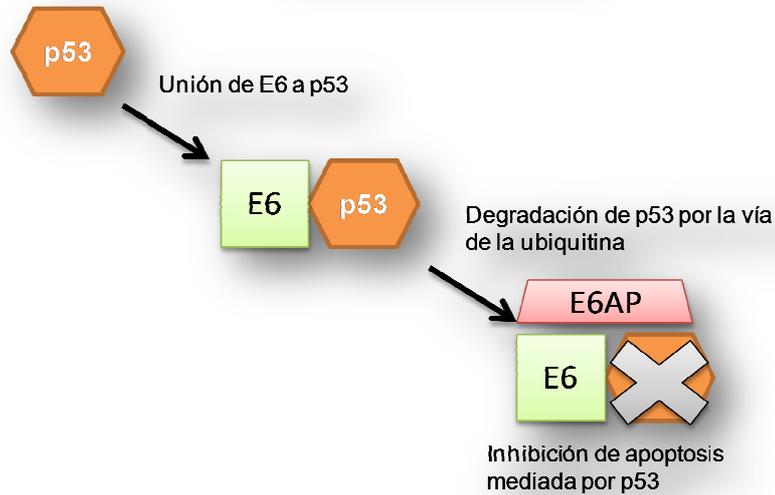


Figura 14: Degradación de p53 mediada por E6.

Mecanismo de E7

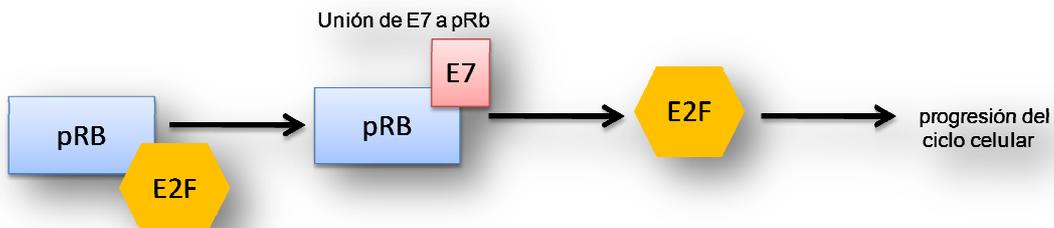


Figura 15: Cambio en el control del ciclo celular generada por la proteína E7 del VPH.

En este estudio se realizó una comparación entre el grupo control (conjuntivas sanas) y el grupo de casos de Pterigión, donde los resultados mostraron que en el grupo control no se

encontró DNA de VPH; mientras que en el grupo de Pterigión de los 40 casos analizados, 19 de estos fueron positivos para la presencia de DNA de VPH.

Los casos de pacientes con Pterigión y las muestras correspondientes a conjuntivas sanas fueron recolectadas en el Instituto de Oftalmología. Fundación Conde de Valenciana.

En el 2003 se analizaron 88 muestras de conjuntiva sana en Taiwán, en ninguna se detectó DNA de VPH (Chen 2003). En un estudio similar realizado en el Bascom Palmer Eye Institute, no se reportó presencia de DNA de VPH en ningún caso de conjuntiva sana (Scott y col., 2002). Aunque también hay reportes de muestras recolectadas en Grecia, que demuestran la presencia de DNA de VPH hasta en un 32% de los casos de conjuntiva sana, detectándose el VPH tipo 18 (Detorakis y col. , 2001).

El hecho de que el VPH tipo 16 fue encontrado en conjuntiva de pacientes asintomáticos con diagnóstico de VPH cervical, sugiere que el virus en las lesiones de la superficie ocular, se adquiere por autoinfección, tomando en cuenta que el virus se encuentra en otra parte del organismo (Buggage y col., 2002).

Debemos destacar que el método de transmisión del VPH a los tejidos del ojo no ha sido explicado aún. Es necesario recordar que el VPH se transmite principalmente por contacto sexual (Baseman y Koutsky, 2005). La infección requiere la disponibilidad de células epiteliales de la epidermis o la mucosa, que todavía son capaces de la proliferación (células de la capa basal) (Zur Hausen, 2002).

Uno de los probables modos de transmisión de la infección es cuando el feto pasa a través del canal de parto (Buggage y col. , 2002; Cason y Mant, 2005). También se sugiere que el VPH puede propagarse a través de la sangre (Bodaghi y col., 2005).

En este trabajo se encontró la proteína L1, en dos de las muestras de pterigión; encontrando una banda de aproximadamente 57KDa, correspondientes a dicha proteína.

La infección por VPH puede dividirse en: una infección latente, que se caracteriza solo por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin alguna manifestación de enfermedad. El DNA del virus podría ser detectado por técnicas como PCR. Posteriormente se da la infección subclínica en donde hay cambios microscópicos en el epitelio, estos cambios se asocian ya a una infección con VPH y una posible lesión premaligna.

Finalmente la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles, encontrando en esta etapa gran cantidad de tejido positivo para VPH. Encontrándose el virus viable y con capacidad de infectar otros tejidos (Lizano y col., 2009).

En este trabajo no solo se pudo determinar la presencia del VPH de riesgo oncogénico bajo y alto en muestras pterigión, también pudimos determinar la presencia de la proteína L1 en dos de las muestras de pterigión y parece indicar que el VPH infecta las células de la conjuntiva y podría ser, al menos en parte, causante de los cambios en el ciclo celular, esto significaría que el DNA del VPH se integró al DNA de la célula hospedera, generándose una interacción del DNA viral con el DNA cromosómico.

Conclusiones.

En el presente trabajo se determinó la presencia de DNA de VPH en el pterigión mediante PCR, confirmándose en 47% de los casos.

Los tipos de VPH encontrados en las muestras de pterigión analizadas fueron el tipo 11 de bajo riesgo oncogénico y tipo 18 de alto riesgo oncogénico.

En ninguna de las muestras de conjuntiva sana (grupo control) analizadas, se detectó presencia de DNA de VPH.

Se observó la presencia de la proteína L1 (57kDa) mediante la técnica Western blot (Wb).

Perspectivas

Después del presente estudio surgen nuevas preguntas que se intentarán dilucidar posteriormente, en donde se procurará determinar si existe una asociación entre la infección por VPH de las células conjuntivales y la aparición del pterigión, correlacionándolo con el microambiente inmunológico local y sistémico.

Para lo cual se pretende realizar un análisis por inmunoblot de las proteínas oncogénicas E6 y E7 y de sus proteínas blanco (p53 y pRb) en tejido extraído de conjuntiva que presenta pterigión.

Determinar la concentración de las citocinas $IFN\gamma$, $IFN\alpha$, $IFN\beta$, IL-4, IL-10, IL-17 en el suero de pacientes con pterigión VPH positivos, VPH negativos y controles.

Correlacionar la presencia o ausencia de VPH con las variables inmunológicas locales y sistémicas.

Analizar el perfil proteómico de lágrimas de los pacientes con pterigión VPH positivo, VPH negativo y controles.

Dichos estudios proporcionarán resultados que aportaran conocimientos para determinar con precisión si el VPH es un factor etiológico en el desarrollo del pterigión.

Referencias bibliográficas

- Alañón, F. M., Cárdenas, L. M. y Martos, A. A. (2001). Anatomía y fisiología del aparato ocular. en *Oftalmología en atención primaria*. F. Alcalá. Barcelona: pp. 11-45.
- Ansel, J. y Zivony, A., (2001) UV induces human corneal epithelial cell NF-B activation and results in the production of proinflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-8 and TNF., *Invest. Ophthal vis Sci.*, **42**: 575.
- Aragonés, C. B. y Alemañy, M. J., (2009) Relación de la radiación ultravioleta y el pterigión primario *Revista cubana de oftalmología*, **22**: 9.
- Bartra, T. J. y Arrondo, M. E. (2003). Anatomía ocular. en *Actualización en alergia ocular* tomo I. Esteve. Barcelona: pp. 23-30.
- Baseman, J. G. y Koutsky, L. A., (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections, *J Clin Virol*, **32 Suppl 1**: S16-24.
- Blanco, A. M. (2005). Cuidados enfermeros a las personas con trastornos del aparato ocular. en *Enfermería médico-quirúrgica. Necesidad de comunicación y seguridad*. Masson. Barcelona: pp. 47-52.
- Bodaghi, S., Wood, L. V., Roby, G. y col., (2005) Could human papillomaviruses be spread through blood?, *J Clin Microbiol*, **43**: 5428-5434.
- Buggage, R. R., Smith, J. A., Shen, D. y col., (2002) Conjunctival papillomas caused by human papillomavirus type 33, *Arch Ophthalmol*, **120**: 202-204.
- Canal, J., Rosado, I., Suárez, N. y col., (2010) High prevalence and low E6 genetic variability of human papillomavirus 58 in women with cervical cancer and precursor lesions in southeast México., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **105**: 144-148.
- Cason, J. y Mant, C. A., (2005) High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood, *J Clin Virol*, **32 Suppl 1**: S52-58.
- Collier, L. y Oxford, J. (2000). *Human Virology*. USA.
- Chen, K. H., Hsu, W. M., Cheng, C. C. y col., (2003) Lack of human papillomavirus in pterygium of Chinese patients from Taiwán, *Br J Ophthalmol*, **87**: 1046-1048.
- Detorakis, E. T., Drakonaki, E. E. y Spandidos, D. A., (2000) Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium, *Int J Mol Med*, **6**: 35-41.

- Detorakis, E. T., Sourvinos, G. y Spandidos, D. A., (2001) Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium, *Cornea*, **20**: 164-167.
- Detorakis, E. T. y Spandidos, D. A., (2009) Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic pterygium: trends and perspectives (Review), *Int J Mol Med*, **23**: 439-447.
- Di Girolamo, N., Kumar, R. K., Coroneo, M. T. y col., (2002) UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**: 3430-3437.
- Dick, F. A. y Dyson, N. J., (2002) Three regions of the pRB pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins, *J Virol*, **76**: 6224-6234.
- Dushku, N., Hatcher, S. L., Albert, D. M. y col., (1999) p53 expression and relation to human papillomavirus infection in pingueculae, pterygia, and limbal tumors, *Arch Ophthalmol*, **117**: 1593-1599.
- Gallagher, M. J., Giannoudis, A., Herrington, C. S. y col., (2001) Human papillomavirus in pterygium, *Br J Ophthalmol*, **85**: 782-784.
- Garfias, Y., Bautista-De Lucio, V. M., Garcia, C. y col., (2009) Study of the expression of CD30 in pterygia compared to healthy conjunctivas, *Mol Vis*, **15**: 2068-2073.
- Graue, W. E. (2009). *Oftalmología en la práctica de la medicina general*. México, Interamericana McGraw-Hill.
- Jauregui, L. (2001). *Fotogrametría*. Facultad de Ingeniería. Venezuela, Universidad de los Andes: 34.
- John-Aryankalayil, M., Dushku, N., Jaworski, C. J. y col., (2006) Microarray and protein analysis of human pterygium, *Mol Vis*, **12**: 55-64.
- Lang, G. K. y Lang, G. E. (2002). *Conjuntiva*. en *Oftalmología texto y atlas en color*. Masson. Barcelona pp. 67-115.
- Li, T. T., Zhao, L. N., Liu, Z. G. y col., (2005) Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene, *World J Gastroenterol*, **11**: 931-937.
- Lizano, M., Carrillo, A. y Contreras, A., (2009) Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis., *Cancerología*, **4**: 205-216.
- López, A. y Lizano, M., (2006) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina., *Cancerología*, **1**: 31-55.

- Manos, M., Ting, D., Wright, A. y col., (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus., *Molecular diagnostics of Human Cancer. Cancer cells*, **7**: 209-214.
- Maxia, C., Perra, M. T., Demurtas, P. y col., (2008) Expression of survivin protein in pterygium and relationship with oxidative DNA damage, *J Cell Mol Med*, **12**: 2372-2380.
- McDonnell, J. M., McDonnell, P. J. y Sun, Y. Y., (1992) Human papillomavirus DNA in tissues and ocular surface swabs of patients with conjunctival epithelial neoplasia, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **33**: 184-189.
- Ocadiz, R., Saucedo, R., Cruz, M. y col., (1987) High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix, *Cancer Res*, **47**: 4173-4177.
- Ochoa Tabares, J., (2006) Génesis del pterigión. Una aproximación desde la biología molecular., *Revista Mexicana de Oftalmología*, **80**: 318-324.
- Pieczk-Sidor, M., Polz-Dacewicz, M., Zagorski, Z. y col., (2009) Occurrence of human papillomavirus in pterygia, *Acta Ophthalmol*.
- Piras, F., Moore, P. S., Ugalde, J. y col., (2003) Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions, *Br J Ophthalmol*, **87**: 864-866.
- Rodrigues, F. W., Arruda, J. T., Silva, R. E. y col., (2008) TP53 gene expression, codon 72 polymorphism and human papillomavirus DNA associated with pterygium, *Genet Mol Res*, **7**: 1251-1258.
- Sánchez, J., Huerta, M., Rivera, J. y col., (2005) Infección por VPH y cáncer cervicouterino., *Revista Mexicana de Patología Clínica*, **52**: 222-233.
- Scott, I. U., Karp, C. L. y Nuovo, G. J., (2002) Human papillomavirus 16 and 18 expression in conjunctival intraepithelial neoplasia, *Ophthalmology*, **109**: 542-547.
- Seedorf, K., Oltersdorf, T., Krammer, G. y col., (1987) Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells, *EMBO J*, **6**: 139-144.
- Serrano, S. J., Cobo, M. F. y Toledano, L. R. (2003). Infecciones producidas por papillomavirus. en Enfermedades infecciosas virales. F. Alcalá. Barcelona: pp. 41-57.
- Sjo, N. C., Heegaard, S., Prause, J. U. y col., (2001) Human papillomavirus in conjunctival papilloma, *Br J Ophthalmol*, **85**: 785-787.

- Solomon, A., Li, D. Q., Lee, S. B. y col., (2000) Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**: 2154-2163.
- Stanley, M. A., Pett, M. R. y Coleman, N., (2007) HPV: from infection to cancer, *Biochem Soc Trans*, **35**: 1456-1460.
- Stephen, J. H. (1993). Enfermedades de la conjuntiva, Enfermedades de los ojos de Parsons. I. McGraw-Hill. México: pp. 133-153.
- Tan, D. T., Tang, W. Y., Liu, Y. P. y col., (2000) Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium, *Br J Ophthalmol*, **84**: 212-216.
- Tong, L., Li, J., Chew, J. y col., (2008) Phospholipase D in the human ocular surface and in pterygium, *Cornea*, **27**: 693-698.
- Weinberg, E. D., (2003) The therapeutic potential of lactoferrin, *Expert Opin Investig Drugs*, **12**: 841-851.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y. y col., (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities, *Mol Cell*, **2**: 305-316.
- Zur Hausen, H., (1994) Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types, *Curr Top Microbiol Immunol*, **186**: 131-156.
- Zur Hausen, H., (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat Rev Cancer*, **2**: 342-350.