

## Tesis de Posgrado

# Virus herpes simplex y papiloma en lesiones premalignas del cuello uterino

Alonio, Lidia Virginia

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Alonio, Lidia Virginia. (1987). Virus herpes simplex y papiloma en lesiones premalignas del cuello uterino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2042\\_Alonio.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2042_Alonio.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Alonio, Lidia Virginia. "Virus herpes simplex y papiloma en lesiones premalignas del cuello uterino". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2042\\_Alonio.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2042_Alonio.pdf)

TESIS:

2012

Ej. N° 2

Virús Herpes Simplex y Papiloma  
En Lesiones Prémalignas y Ma-  
lignas Del Cuello Uterino.

Lidia Virginia Alonic

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

"VIRUS HERPES SIMPLEX Y PAPILOMA EN LESIONES PREMALIGNAS  
Y MALIGNAS DEL CUELLO UTERINO"

Autora

LIDIA VIRGINIA ALONIO

Directora de Tesis

DRA. ANGELICA RITA TEYSSIE

Consejero de Estudios

DR. JULIO AZCURRA

Lugar de Trabajo

INSTITUTO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA "DR. CARLOS G. MALBRAN"  
DEPARTAMENTO DE VIRUS

Tesis - 2042 -  
ef. 2

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

- 1987 -

R20 2042



## Agradecimientos:

- Quiero agradecer ante todo a Dios, por cuya benevolencia ésta Tesis ha sido concluída.-
- A la Dra. Angélica Rita Teyssié, mi Directora, no sólo por las sugerencias, discusión y lectura crítica del manuscrito que contribuyeron al enriquecimiento de la Tesis, sino por sus consejos, aliento permanente guía y apoyo tanto en el aspecto científico como en el humano.-
- A los Dres. Delia Dalbert, Juan Mural, Ofelia Bartt y Graciela Bazán del Hospital Nacional A. Posadas de Haedo, por sus aportes en las observaciones colposcópicas, citológicas e histológicas, en especial a la Dra. Dalbert por su constancia en el aporte de especímenes de estudio.-
- Al Dr. Kenneth Powell de la Universidad de Leed (Inglaterra) por el gentil envío de inmunosuero anti ICP 11 /12 lo que permitió la obtención de resultados comparables.-
- Al Dr. Harald zur Hausen del Centro de Referencia de virus Papiloma de Heiderberg (Alemania), por el envío de los clones de virus Papiloma tipos 6 b,11, 16 y 18.-
- Al Dr. Pablo Bozzini y el Sr. René Galanti del Instituto Nacional de Microbiología, por el apoyo técnico en las tomas fotográficas.-
- A las Bioquímicas María Alejandra Picconi, Lic. Mariana Fernandez Cobo y Srta. Nancy Edith Fernández del Dto. de Virus del Instituto Nacional de Microbiología, por su asistencia en la preparación de reactivos biológicos.-
- A la Srta. Dora Beatriz Thumin de la Sección Patología del Instituto Nacional de Microbiología, por su colaboración en la preparación de especímenes histológicos para Hidridación.-
- A las Autoridades del Instituto Nacional de Microbiología, en especial a la Jefatura del Departamento de Virus, por el apoyo e infraestructura puesta a disposición para el estudio.-
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por los subsidios otorgados que apoyaron económicamente éste estudio.-

## INDICE

	<u>Pág.</u>
1.	INTRODUCCION ..... 1
1.1.	Caracterización del Epitelio Cervical Normal ..... 2
1.2.	Alteraciones del Epitelio Cervical ..... 4
1.2.1.	Lesiones Benignas ..... 4
1.2.2	Lesiones Malignas y Premalignas ..... 9
1.3.	Epidemiología del Cáncer de Cuello Uterino ..... 14
1.4.	Evidencia de una Relación de los Virus de la Familia Herpesviridae con el Cáncer de Cuello Uterino ..... 16
1.4.1.	Caracteres y Clasificación ..... 16
1.4.2.	Infecciones Herpéticas Asociadas con el Tracto Genital 18
1.4.2.1.	Virus Herpes Simplex (VHS) ..... 18
	I Epidemiología..... 18
	II Replicación Viral "in vitro" ..... 18
	III Infección "in vivo" ..... 22
	IV Herpes Simplex Tipo 2 y Carcinoma de Cuello Uterino ... 24
	a) Epidemiología ..... 25
	b) Presencia de Proteínas Virales..... 27
	c) Detección de ADN Viral ..... 29
	d) Detección del ARN Viral ..... 30
	e) Potencial Oncogénico ..... 31
1.4.2.2.	Virus Citomegalo y Cáncer ..... 33
	I Transmisión y Patología Asociada ..... 33
	II Virus Citomegalo y Cáncer ..... 34
1.5.	Virus Papiloma y Carcinogénesis ..... 34
1.5.1.	Clasificación y Estructura ..... 34
1.5.2.	Especificidad ..... 36
1.5.3	Caracteres de la Infección Viral ..... 36
1.5.4.	Bases Taxonómicas Moleculares ..... 38
1.5.5.	Organización y Expresión del Genoma Viral..... 41
1.6.	Potencial Oncogénico de los VP en Distintas Especies... 44
1.7.	Modelo de Oncogénesis Viral ..... 50
2.	OBJETIVO DE LA TESIS ..... 54
3.	INCIDENCIA DE LAS INFECCIONES HERPETICAS Y PAPILOMATO_ SAS ASOCIADAS CON LESIONES DEL CERVIX UTERINO ..... 56

	<u>Pág.</u>
3.1.	Pacientes, Materiales y Métodos ..... 56
3.2.	Resultados ..... 61
4.	INFECCIONES CONCOMITANTES VIRUS PAPILOMA-VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2: ESTUDIO DE LA LOCALIZACION DE LAS PROTEINAS VIRALES EN TEJIDOS INFECTADOS SIMULTANEA- MENTE POR AMBOS VIRUS ..... 77
4.1.	Materiales y Métodos ..... 78
4.2.	Resultados ..... 81
4.3.	Discusión ..... 84
5.	EXPRESION DE PROTEINAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURA- LES DE VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN LESIONES DEL CUELLO UTERINO: SU RELACION CON LA INFECCION CON VI- RUS PAPILOMA ..... 86
5.1.	Pacientes Materiales y Métodos ..... 87
5.2.	Resultados ..... 88
5.3.	Discusión ..... 90
6.	DISTINOS TIPOS DE VIRUS PAPILOMA (VP) EN LESIONES DEL CERVIX ..... 99
6.1.	Pacientes, Materiales y Métodos ..... 101
6.2.	Resultados ..... 105
6.3	Discusión ..... 107
7.	ESTUDIOS RETROSPECTIVO Y PROSPECTIVO DE LA EVOLUCION DE LESIONES CERVICALES PREMALIGNAS Y MALIGNAS. SU RELA CION CON LAS INFECCIONES HERPETICAS Y PAPILOMATOSAS.. 116
7.1.	Pacientes, Materiales y Métodos ..... 117
7.2.	Resultados ..... 118
7.3	Discusión ..... 121
8.	CONCLUSION Y DISCUSION ..... 134

1-	Preparación de especímenes de estudio.	
	- Biopsias.	
	- Células de descamación.	142.
2-	Tinción con hematoxilina- eosina.....	143.
3-	Tinción con ácido peryódico (Técnica PAS).....	144.
4-	Tinción Papanicolau.....	145.
5-	Purificación de virus Papiloma (VP).....	146.
6-	Tinción negativa para microscopio electrónico....	148.
7-	Titulación de VP por hemaglutinación.....	148.
8-	Preparación de inmunosuero anti VP.....	149.
9-	Propagación de virus Herpes simplex tipo 2 (VHS2)	151.
10-	Titulación de VHS2.....	152.
11-	Preparación de inmunosuero anti VHS2.....	153.
12-	Técnica inmunoperoxidasa.....	154.
13-	Técnica inmunofluorescencia doble rodamina-fuores- ceína.....	155.
14-	Preparación del inmunosuero anti proteínas tempranas.....	160.
15-	Propagación de VP clonados en el plásmido PBR 322.	164.
16-	Híbridización "in situ".....	175.
	BIBLIOGRAFIA.....	184.



## INTRODUCCION

En la etiología del cáncer genital, se consideran dos áreas: 1) El cuello uterino con la vagina y vulva como derivados del seno urogenital, donde los factores carcinogénicos parecerían ser exógenos y del tipo irritativo; 2) el cuerpo del útero junto con trompas y ovarios, donde los factores parecerían ser endógenos y de carácter hormonal (1).

El útero es un órgano en el cual se pueden desarrollar una gran variedad de tumores malignos con origen y comportamiento biológico diferente. Si bien existen variaciones geográficas en la incidencia de algunos de ellos, el siguiente orden de frecuencia puede aplicarse en general a la mayoría de los países: 1.- Carcinoma epidermoide de cuello uterino; 2.- Adenocarcinoma endometrial; 3.-Adenocarcinoma de cuello uterino; 4.- Corioepitelioma; 5.- Leiomiosarcoma; 6.- Tumor mixto mesodérmico; 7.- Mesonefoma; 8.- Sarcoma endometrial; 9.- Sarcoma Botrioides; 10.- Otros sarcomas de tejidos blandos. Los cuatro primeros son más frecuentes y los demás muy raros.

En la zona de transición entre el epitelio estratificado exocervical y cilíndrico endocervical (zona escamocolumnar) ocurren las alteraciones de la reproducción y diferenciación epiteliales, incluyendo displasias, metaplasias y carcinomas "in situ" e invasivos o epidermoides.

El adenocarcinoma cervical se origina en el epitelio mucoso del endocérvix; debido a esta localización, se lo detecta frecuentemente cuando la invasión tisular es considerable.

En los países donde la frecuencia del carcinoma epider-

moide es alta, la del adenocarcinoma es baja y viceversa; sin embargo, la frecuencia relativa parece depender más de la incidencia del epidermoide que del adenocarcinoma. Diversas observaciones sugieren que los factores etiológicos relacionados con estos dos tumores son distintos (2).

El presente estudio enfoca el carcinoma epidermoide y las etapas tempranas de la neoplasia de cuello uterino, analizando algunos aspectos probablemente etiopatológicos relacionados con las infecciones por los virus Papiloma (VP) y los virus Herpes simplex tipo 2 (VHS2).

#### 1.1. Caracteres del Epitelio Cervical Normal (1) (2) (3)

##### Epitelio Pavimentoso Normal

En el epitelio normal de la portio de la mujer sexualmente madura, se pueden reconocer tres capas con ordenación precisa: 1) Estrato Basal: es la capa más profunda; se compone de una sola hilera de células bien delimitadas, de forma cúbica y cilíndrica, con núcleos alargados y perpendiculares a la base del epitelio; 2) Estrato Espinoso: por encima del anterior, formando varias capas de células poligonales bien delimitadas y más voluminosas que las basales, con núcleos claros y con un solo nucleolo reconocible. En relación con la altura total del epitelio, este estrato es muy delgado. Los estratos basales y espinoso constituyen el estrato germinativo, aunque la renovación celular afectaría primariamente a las células parabasales, mientras que a las basales les correspondería una función de células de reserva; 3) Estrato Superficial:

las células de esta zona son grandes, con citoplasma claro cuando se las colorea con hematoxilina-eosina, ricas en glucógeno. Si bien se observa cierto refuerzo en las capas altas, la queratinización no forma parte del cuadro normal. En la base del epitelio, se presentan regularmente papilas estromales bajas que llegan hasta el estrato espinoso. La delimitación entre las células basales y la altura de las papilas estromales constituyen una medida de la estructura normal del epitelio.

#### Epitelio Cilíndrico Normal

Está formado por células altas prismáticas y delgadas, con núcleos entre ovalados y en forma de clavija, situados en la base epitelial; por encima de los núcleos, está la porción secretora de las células, existiendo entre el polo inferior del núcleo y la membrana basal un ribete citoplasmático más denso.

El límite entre el epitelio pavimentoso de la portio y el cilíndrico del conducto cervical presenta una amplia gama de variaciones, tanto en lo que se refiere a su localización como en su disposición. El caso ideal es cuando ambos tipos de epitelios se encuentran en la región del orificio externo del útero. Este orificio puede desplazarse tanto hacia el conducto cervical como en el sentido contrario, en cuyo caso se llama erosión o pseudo-erosión. El avance o desplazamiento de la mucosa endocervical (ectopia) es un proceso ligado a la madurez sexual, ocurriendo una retracción en la menopausia.

Ectopia Glandular: cuando en la retracción el epitelio cilíndrico superficial y algunas glándulas son sustituidas por

epitelio pavimentoso; no hay alteración topográfica de la mucosa, sino modificación de su recubrimiento externo. La última glándula cervical marcaría el punto donde limitan el epitelio pavimentoso de la portio y la zona mucoso-glandular.

#### Alteraciones del Epitelio Cervical (6) (7)

Las anormalidades del epitelio escamoso uterino se pueden agrupar en: 1) Sin potencial para progresar a neoplasma, hiperplasia basal o células de reserva; metaplasias maduras o inmaduras; condilomas. 2) Con potencialidades de progresar a neoplasmas invasivos; displasias y carcinomas "in situ".

#### Lesiones Benignas

Epitelio Atrófico: es delgado y las células basales ocupan una gran proporción del mismo. Los núcleos y nucleolos son prominentes; las figuras mitóticas sólo se observan en la capa basal y son normales.

Inflamaciones: las capas basales pueden presentar falta de maduración, aunque no en las superiores; se observan células infiltradas en el estroma y en el epitelio.

Metaplasia del Epitelio Pavimentosos: es un proceso por el cual el epitelio cilíndrico de la superficie y de las glándulas queda sustituido por epitelio pavimentoso, debido al crecimiento de otro tipo celular, o sea, sin transformación directa de las células cilíndricas diferenciadas. Es una neoforación por aparición y diferenciación de elementos celulares subcilíndricos o de reserva, los cuales sólo pueden identificarse en el momento en que aparece la metaplasia. La diferenciación de las células podría deberse a una irritación crónica y estar asociada con procesos de curación de una ectopia.

Metaplasia Escamosa Inmadura: no se observa pleomorfismo ni figuras mitóticas anormales; la imagen cromatínica es normal y la relación núcleo/citoplasma es baja; los rasgos anteriores y la presencia de células columnares secretoras constituyen las bases para un diagnóstico diferencial con las displasias, aunque la presencia de caracteres asociados con estas últimas indican una concomitancia de ambos.

Metaplasia Atípica: se observa aumento en el número de núcleos, polimorfia nuclear, multiplicación de nucleolos, policromasia e hiperchromasia.

Hiperplasia Basal: ocurre una proliferación de células limitadas a las capas basales hasta la mitad del epitelio pavimentoso; cuando la proliferación afecta toda la altura del epitelio y en los estratos inferiores hay un máximo de densidad, se habla de displasia, por lo cual existe la posibilidad que la hiperplasia basal pueda ser una fase del desarrollo de atipias epiteliales neoplásicas.

Condilomas o Verrugas Genitales: es una lesión ampliamente difundida desde la época grieco-romana, minuciosamente descrita en la antigua medicina. A través de los siglos, se las relacionó con enfermedades venéreas como sífilis o gonorrea, atribuíbles a relaciones homosexuales; recién en 1954, quedó confirmada la transmisión sexual de las mismas (8).

La naturaleza viral de los condilomas se comprobó en 1949 (9). Durante mucho tiempo, se pensó que las verrugas comunes, las planas, plantares, laríngeas y genitales eran causadas por un único virus, el Papiloma, y que las diferentes manifes-

taciones morfológicas estaban condicionadas por el tipo de tejido que infectaban. De acuerdo con esta teoría unitaria, las verrugas genitales eran una clase de verrugas de piel, con su apariencia modificada por el grosor del epitelio genital o por las condiciones de humedad y calor reinantes en el área. Este concepto fue revisado en años recientes debido al descubrimiento de varios tipos y subtipos de virus Papiloma, cada uno con localizaciones distintas (pág.41).

Debido al hallazgo de dos entidades histológicas en el cuello uterino, hubo una reevaluación de los conceptos relacionados con las verrugas genitales. Hasta el año 1976, el condiloma papilomatoso o acuminado era considerado la única manifestación morfológica de la infección por virus Papiloma; en ese año, dos grupos de investigadores (10) (11) trabajando independientemente descubrieron a los condilomas planos y los endofíticos, cuya etiología viral fue demostrada por la presencia de partículas virales observadas bajo microscopio electrónico (12) (13), la detección de antígenos virales por inmunohistoquímica (14) (15) y la comprobación de la presencia de información genética viral mediante estudios de hibridación (16) (17).

Condiloma Acuminado: el condiloma acuminado clínicamente detectable es raro en el cérvix y la infección está limitada a la vulva, ano y parte baja de la vagina. Colposcópicamente, se observa una proliferación blanquecina de forma redondeada o alargada, con contornos netos y superficie irregular papilomatosa o arborescente y escasa vascularización. Pueden ser únicos o múltiples y se ubican en la superficie del ectocérvix,

fondos del saco vaginal y región vulvoperianal. En ocasiones, la leucoplasia (mancha blanquecina) presenta una superficie áspera con un fino granulado blanco o bien con aspecto de proyecciones redondeadas muy pequeñas, apenas sobreelevadas, cada una con un capilar central, constituyendo el condiloma acuminado en su etapa inicial. Con el Test Shiller, la superficie celular presenta una positividad débil atigrada o puntuación oscura, con bordes menos definidos; la negatividad a dicha prueba es menos frecuente.

La infección por virus Papiloma de la mucosa o epidermis produce una proliferación con rasgos histológicos que asemeja una exageración de la arquitectura normal del epitelio; todas las capas están representadas pero distorsionadas por un crecimiento de las papilas epiteliales (papiomatosis) por la proliferación de las capas germinativas (hiperplasia de las células basales, acantosis) y un engrosamiento variable de las capas superficiales (hiper y paraqueratosis) o queratinización celular individual (disqueratosis) (18) (19).

La expresión histológica de la acción del virus (efecto citopático) en las capas superficiales tiene como resultado la degeneración de la cromatina, manifestada como un colapso irregular del núcleo y una vacuolización citoplasmática en las áreas circundantes (coilocitosis), formándose un halo perinuclear. Las células coilocitóticas tienen frecuentemente cuerpos de inclusión basófilos los cuales, como pudo demostrarse al microscopio electrónico, constituyen ordenamientos cristalinos de partículas virales. En las capas basales o parabasales no se observa un pleomorfismo nuclear marcado ni mitosis anor-

males.

Condiloma Plano: es la forma más frecuente en el cérvix, pero a menudo subclínico. Histológicamente, se observa como un foco acantótico, con elongación de las papilas dermales pero sin apariencia papilomatosa, mostrando un contraste marcado entre las capas profundas y las superficiales ocupadas por coilocitos. Es frecuente la disqueratosis intraepitelial (queratinización intracitoplasmática) con o sin presencia de núcleos pignóticos y la bi o multinucleación, aunque las figuras mitóticas siempre son normales.

Condiloma Invertido Endofítico: comparte las características anteriores, presentando un aspecto de pseudo-invasión en el estroma o glándulas, con lo cual tiene una apariencia de carcinoma.

Actualmente, a la lesión no papilomatosa, es decir, microscópicamente invisible, prefiere denominársela infección por virus Papiloma subclínica, aún cuando se haga referencia a las lesiones similares de vulva, vagina y pene. Colposcópica citológica e histológicamente, la infección subclínica se parece a las lesiones premalignas y usualmente, pueden coexistir adyacentes o yuxtapuestas, siendo sus rasgos histológicos indistinguibles en este caso y definiéndoselos como condiloma atípico, displasia condilomatosa, condilomas con atipías, condilomas con displasias (10) (21).

Metaplasia Escamosa Inmadura con Atipías (22): se trata de tejidos con células metaplásicas monomórficas, inmaduras o semimaduras, de polaridad conservada, con hipercromatismo



y pleomorfismo leve, con o sin coilositosis focal. Las figuras mitóticas son anormales y es frecuente la observación de cromocentros prominentes.

Se localiza en la zona de transformación o glandular. Esta entidad es la más recientemente relacionada con la infección con virus Papiloma, sobre la base de que comparten con los condilomas características morfológicas biológicas y epidemiológicas. Histológicamente, la lesión se presenta similar a las capas basales o parabasales de los condilomas, lo cual explica la ausencia de la coilocitosis y la pobre detección de antígenos virales, cuya expresión parece depender del grado de maduración epitelial.

#### 1.2.2. Lesiones Premalignas y Malignas (4) (7) (23-28)

Displasia: todos los trastornos de diferenciación en la capa epitelial escamosa, de las glándulas o del revestimiento superficial se clasifican como displasia; se tiene en cuenta la demarcación de los límites celulares y presencia de atipias nucleares. Se diagnostica displasia leve si las células no diferenciadas ocupan el tercio basal del epitelio; en cambio, si ocupan de uno a dos tercios, se consideran moderadas. Cuando ocupan más de dos tercios, se diagnostica displasia severa. Si la totalidad del grosor del epitelio está afectada, se habla de carcinoma "in situ". Se acepta que la displasia puede progresar al carcinoma "in situ", pero a menudo se supone que dicha progresión involucraría un cambio básico de una condición benigna a otra forma potencialmente maligna, lo cual presupone la concepción de dos etapas en la enfermedad, por lo cual una displasia no puede pasar al estado invasor sin pasar por el carcinoma "in situ". Sin embargo, estudios de la conducta bio-

lógica y de la historia natural de las displasias han destacado una anomalía celular básica y han enfatizado el hecho comprobado de que un carcinoma invasivo puede desarrollarse directamente de una displasia leve o moderada, sin la transición previa de un carcinoma "in situ", Por lo cual parece razonable descartar la evolución en dos etapas y aceptar que todos los grados de displasia son una forma de neoplasia intraepitelial e introducir el término neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para abarcar todos los grados de displasia y carcinoma "in situ". Este concepto define un espectro de cambios intraepiteliales, que comienzan con un neoplasma bien diferenciado clasificado tradicionalmente como displasia leve y termina en el carcinoma invasor.

#### Rasgos Histológicos de la Neoplasia Intraepitelial Cervical - (NIC).

NIC 1 (Displasia Leve): si bien todas las células del epitelio tienen anomalías nucleares, las de las capas medias y superiores presentan diferenciación citoplasmática. Todas las células tienen núcleos con nucleolos prominentes de trazado irregular, generalmente alargados e hipercromáticos con cromatina filamentososa o granular. En las capas inferiores, la estratificación es más desordenada, no observándose claramente los límites celulares; tienen una relación núcleo/citoplasma (N/C) elevada y núcleos apiñados.

Las capas medias y superiores tienen una estratificación variable con evidencias de maduración citoplasmática y una relación N/C menor. Las figuras mitóticas, generalmente confinadas a las capas inferiores, son normales.

Algunas veces, se observa queratinización.

NIC II (Displasia Moderada): con rasgos histológicos similares al anterior, excepto en que las células no diferenciadas con núcleos pleomórficos y alta relación N/C y la falta de estratificación se extiende hasta la última capa, sin afectarla, por lo cual la misma conserva la diferenciación citoplasmática y la estratificación, aunque las figuras mitóticas anormales son observables en los dos tercios inferiores del epitelio.

NIC III (Displasia Severa - Carcinoma "in situ"): se acentúan las características anteriores -indiferenciación, falta de estratificación, pleomorfismo, apiñamiento de células basales, figuras mitóticas frecuentemente anormales aún en las capas superiores del epitelio. Por otro lado, en ciertos casos leves se observa cierto grado de diferenciación, por lo cual se toman en consideración la limitación de la lesión a la superficie, con compromiso de todas sus capas, la ausencia de estratificación y diferenciación ordenada, la observación de los límites celulares, la pérdida de polaridad, la ausencia de glucógeno salvo en las células más superficiales, las cuales pueden contener una pequeña cantidad, el aumento de la relación núcleo/citoplasma y el hiperchromatismo nuclear.

Carcinoma "in situ" muy Indiferenciado: presenta una estructura uniforme; un tipo celular ocupa toda la altura del epitelio: son células pequeñas e iguales, semejantes a las células basales, con núcleo hiperchromático central, de forma variable, entre ovalados o redondos a delgados o fusiformes. El citoplasma es escaso y cianofílico; los bordes celulares se observan poco definidos, sin los llamados "puentes interce-

lulares". Las itosis son frecuentes y el glucógeno está ausente. Es el tipo de lesión clásica que ofrece menos discrepancia diagnóstica.

Carcinoma "in situ" con Cierta Grado de Diferenciación:

presenta células grandes, claras, con bordes nítidos y citoplasma eosinófilo y núcleo pleomórfico vesicular. Estas células corresponden a la morfología de las células intermedias o parabasales del epitelio escamoso normal. Es posible reconocer puentes intercelulares y a veces, focos de paraqueratosis. Presenta un cambio abrupto de la morfología por la maduración de otras dos capas de células aplanadas, en las cuales no es infrecuente la presencia de pequeñas cantidades de glucógeno.

Algunos autores sostienen que la lámina basal, cuya existencia fue probada al microscopio electrónico, debe estar intacta para sostener el diagnóstico de carcinoma "in situ"; sin embargo, cabe destacar que los procesos inflamatorios locales suelen destruirla o en ocasiones formar largas lenguas de invasión con la membrana basal intacta, lo cual probablemente indique un proceso invasor menos activo.

El carcinoma no infiltrante puede comprometer al epitelio glandular, por lo cual es importante establecer la continuidad del carcinoma "in situ" del epitelio escamoso y glandular, pues cuando los cortes de biopsias no muestran continuidad, se observan focos estromales que pueden llevar a la confusión con un carcinoma invasor.

El comportamiento del carcinoma "in situ" es tema de discusión. Numerosos estudios ultraestructurales, autorradiográficos y microespectrofotométricos hacen hincapié en la exis-

tencia de una unidad básica de anormalidad, basando sus conclusiones en el modelo de anormalidad; permanece constante a través de todo el espectro, desde displasia leve a carcinoma "in situ" mostrando las células el mismo grado de aberración cromosómica en términos de aneuploidía. Por otro lado, el carcinoma "in situ" exfolia células con caracteres de malignidad y en muchos casos, son idénticas a las del carcinoma invasivo. Esta identidad ha sido ratificada por estudios histoquímicos fotométricos y por cultivos de tejidos, por lo cual el carcinoma "in situ" es considerado una lesión potencialmente invasora.

Carcinoma Invasor: pueden reconocerse los siguientes estadíos:

I.a.1. Invasión Inicial del Estroma: pequeños cordones que comienzan a infiltrar el estroma, pero sin llegar a formar una masa carcinomatosa medible. Con frecuencia, hay focos de maduración paradójal en el estrato basal, justo en el punto en que va a comenzar la invasión. El estroma muestra una infiltración inflamatoria crónica y aumento de la vascularización.

I.a.2. Microinvasor: se observan pequeñas masas carcinomatosas que infiltran menos de 2-5 mm de profundidad y que miden menos de 7 mm de diámetro (según definición de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia), sin embolización sanguínea ni linfática.

I.b. Macroinvasor: carcinoma invasor mayor que el anterior, pero dentro de los límites del cuello.

Formas más avanzadas son estadíos II, III y IV, que involucran lesiones fuera de los límites del cuello, hasta metástasis en ganglios linfáticos.

### Adenocarcinoma "in situ" y Microinvasor del Cuello Uterino:

El crecimiento intraepitelial de los carcinomas de glándulas fue conocido antes que el carcinoma "in situ" del epitelio pavimentoso del cuello uterino. Los períodos preinvasores en general suelen escapar al diagnóstico clínico y colposcópico. El diagnóstico se basa en la demostración de atipías, tanto en el campo del epitelio cilíndrico superficial como en el glandular. Se observa un epitelio que sobrepasa en altura al normal vecino, con núcleos alargados u ovalados, con ausencia de nucleolos; por encima de la capa que contiene los núcleos, se observa un ribete citoplasmático. El adenocarcinoma microinvasor produce la formación de glándulas con alteraciones estromales.

### Epidemiología del Cáncer de Cuello Uterino

La etiología del cáncer cervical ha sido estudiada extensamente desde hace más de 140 años, cuando Rigoni-Stern (18), analizando los registros de fallecimiento por diversas causas en la ciudad de Verona, destacó que la frecuencia del cáncer de cuello uterino estaba en relación inversa al cáncer de mama y que en las mujeres solteras o enclaustradas el riesgo de desarrollar cáncer cervical era mínimo (29). Estas observaciones fueron confirmadas en otros países (30)(31) y en estudios que señalaron a la promiscuidad sexual y aún a las prácticas sexuales extramatrimoniales como elementos de alto riesgo (2)(33).

El factor masculino en la transmisión o desarrollo de la enfermedad ha sido enfatizado en estudios que registran múltiples casos de asociación de carcinoma de cuello uterino y de

pene entre matrimonios (34) (5).

Ha sido documentada una interrelación bastante consistente entre la edad temprana del primer coito, número de parejas y del cáncer cervical y de pene (la mayoría de los estudios no incluyen el vulvar, pero etiológicamente, podría pertenecer al mismo grupo) (34) (36).

Las primeras estadísticas mostraron una mayor frecuencia en los estratos sociales más pobres (37), aunque recientes investigaciones restan importancia al nivel socioeconómico o cultural (38). Por otro lado, la enfermedad es relativamente menos frecuente en el seno de sociedades cuyos miembros en general son sometidos a la circuncisión o en las que se realizan prácticas higiénicas relacionadas con ritos religiosos (30) (14). Sin embargo, estudios referidos al riesgo del cáncer cervical en Israel señalan que la conducta sexual más permisiva es el principal factor en la epidemiología de la enfermedad. Si bien la incidencia es todavía baja en relación con otras regiones, hay un aumento en la prevalencia de displasias y carcinomas "in situ", cuyos valores son comparables con los obtenidos en Inglaterra o Estados Unidos de Norteamérica (40).

La adicción al cigarrillo fue señalada como un factor de riesgo independiente de eventos infecciosos o sexuales (31).

La relación de agentes virales con esta patología está sustentada por numerosas investigaciones, aunque no pueden destacarse como cofactores potenciales las infecciones bacterianas, gonorrea, sífilis, tricomonas (40). En las dos últimas décadas, dos grupos virales han sido estudiados en relación con el carcinoma del cérvix uterino: los virus Herpes

simplex y los Papilomas. En las Secciones siguientes, se expone sintéticamente la información disponible.

1.4. Evidencia de una Relación entre los Virus Herpes y el Cáncer de Cuello Uterino

1.4.1. Caracteres y Clasificación (41) (42) (43) (44)

La familia Herpesviridae está constituida por virus ADN de alto PM y con envoltura. Todos contienen un núcleo constituido por ADN de doble cadena, rodeado por una cápside proteica de 95-100 nm de diámetro, compuesta por 162 capsómeros ordenados en una simetría icosaédrica 5:3:2. Envolviendo la cápside, se encuentra la envoltura compuesta por lipoproteínas virales y celulares que se forma luego de la brotación de los viriones, a partir de la membranas nuclear y citoplasmática. El diámetro del virión completo varía entre 120-250 nm, dependiendo sus dimensiones del tamaño de la envoltura.

Constituyen un grupo de virus genéticamente complejo, pues poseen información genética para alrededor de 100 proteínas de tamaño promedio; aunque sólo se conocen entre 30 y 50, es probable que parte del genoma codifique para enzimas necesarias para la duplicación de ADN y síntesis de proteínas virales.

La familia es heterogénea, observándose muy poca homología en la secuencia nucleotídica, con excepción de los virus Herpes simplex tipo 1 y 2. Una clasificación provisional basada en sus propiedades biológicas y físicas divide a esta familia en tres subfamilias: a) Alfa Herpesviridae, de replicación rápida y muy citopáticos, en los que el estado de latencia ocurre en los ganglios neurosensoriales. El rango de huéspedes es variable; esta subfamilia incluye los Herpes simplex, Vari-



cela zoster, que infectan al hombre y otros herpes que infectan distintas especies animales; b) Los Beta Herpesvirinae se caracterizan por un ciclo productivo largo, efecto citopático progresivo lento y un rango de huéspedes muy estrecho. La latencia ocurre en el sistema linfo-reticular. Esta subfamilia incluye al virus Citomégalo, algo más grande (diámetro total: 180-250 nm y núcleo de 60 nm); c). Los Gamma Herpesvirinae: replican en forma lenta o rápida en las células linfoides; la latencia ocurre en el mismo tipo celular. En este grupo, se incluyen los virus Epstein Barr, virus de Marek (agente etiológico del linfoma de aves) y virus Herpes de momos.

A pesar de las diferencias entre los miembros de esta familia, hay propiedades muy importantes que comparten, que son la latencia y la reactivación. A partir de la infección primaria, el virus permanece latente en el tejido nervioso (Herpes simplex, Varicela zoster) o en el linfoide (Epstein Barr, Citomégalo). Luego de un período variable de pocos días o varios años, puede ocurrir una reactivación de la infección por estímulos internos o externos, pudiéndose recuperar del paciente virus infectivos.

#### Transmisión

El modo de transmisión es: 1) por contacto directo: secreciones orales (virus Herpes simplex tipo 1) o genitales (virus Herpes simplex tipo 2 y Citomégalo); por vía sanguínea (virus Citomégalo y Epstein Barr) aún en infecciones subclínicas. 2) Transplacentaria o neonatal, produciendo desde infecciones locales hasta diseminadas, de grado variable de severidad con

un alto porcentaje de muertes de recién nacidos.

1.4.2. Infecciones Herpéticas Asociadas con el Tracto Genital

1.4.2.1. Virus Herpes simplex (VHS) (47)(48)

I. Epidemiología.

Entre 70-90% de las infecciones son causadas por el tipo 2 (VHS2), aunque se ha encontrado el tipo 1 (VHS1). Las zonas afectadas en la mujer son vulva, perineo, vagina y cérvix; en el hombre, glándula y pene; eventualmente, pueden infectar uretra, próstata y epidídimo.

La incidencia de las infecciones por VHS2 está inversamente relacionada con la madurez sexual; la seroconversión puede comenzar cerca de los 14 años, con un pico de incidencia alrededor de los 20 años.

La infección por VHS1 no protege contra el VHS2, a pesar de haber reacciones cruzadas de anticuerpos neutralizantes.

II. Replicación Viral "in vitro" (49)(50)

Se pueden distinguir dos estados en una célula infectada: el productivo y el no productivo; el primero da lugar a la progenie viral. Los VHS pueden también perpetuarse en la célula infectada, sin producción de progenie infecciosa o no infecciosa; este tipo de infección es diferente de las abortivas o restringidas en las cuales se pueden producir pequeñas cantidades de progenie viral o componentes estructurales del virus (49).

En la infección productiva o lítica, el virus penetra en la células y en el citoplasma pierde parte de sus cubiertas; luego, la nucleoproteína viral penetra en el núcleo celular, se disocia el ADN y se transcribe en ARN específico viral, que es transportado al citoplasma; allí, en contacto con polirribosomas libres o unidos a membranas, dirige la síntesis de proteínas no estructurales (no forman parte de la estructura del virión) y estructurales (integran la estructura de la partícula viral libre). No se conoce la totalidad y funciones de la mayoría de las proteínas no estructurales, aunque han sido identificadas algunas relaciones con el metabolismo de nucleótidos y la síntesis de ADN viral. (ver pág. 21 ).

Las proteínas estructurales entran en el núcleo y forman agregados con el ADN viral, formándose la nucleocápside; el ensamblado no es al azar y parece estar asociado con estructuras cercanas a la membrana nuclear.

La formación de la envoltura es tema de discusión; en general, se acepta que la misma puede formarse en la membrana nuclear, a nivel del aparato del Golgi en el retículo endoplasmático y en la membrana citoplasmática, de la cual emerge el virus, produciendo lisis celular.

a) Interacción Virus-Célula (50)

Como resultado de la infección, se produce: 1) Inhibición de la síntesis de ADN y proteínas celulares. La misma comienza al entrar el virus en la célula y se completa entre las tres y cinco horas post-infección; 2) Cambios estructurales, funcionales e inmunológicos en todas las membranas internas y externas

celulares, coincidiendo con la aparición de nuevas glucoproteínas virus-específicas.

b) Expresión y Regulación de Genoma Viral (51)

La expresión del genoma viral está controlada de modo que la misma ocurre en forma secuencial y en cascada. Los polipéptidos virales forman tres grupos: los alfa o muy precoces, los beta o precoces y los gamma o tardíos.

Funciones de los Polipéptidos Alfa

La expresión de las funciones virales comienza cuando el genoma viral llega al núcleo y es máxima a las dos horas post-infección, transcribiéndose 5 genes que dan lugar a la síntesis de 5 polipéptidos alfa en las células infectadas. En el VHS1 se han descrito las siguientes: ICP4, ICPO, ICP22, ICP47. (ICP = del inglés "infected cell polypeptide" = polipéptido de células infectadas. El número indica el orden de migración electroforética de los polipéptidos).

Cada gen es transcrito a partir de un promotor independiente, por la RNA polimerasa II celular, la cual es responsable de la transcripción de todos los genes virales. De las funciones de los polipéptidos alfa, la más estudiada es la ICP4, cuyo rol es el de activar la expresión de genes de las clases cinéticas posteriores. En cuanto a los demás, son poco conocidos, pero investigaciones recientes parecen indicar un rol similar de transactivador de genes ulteriores.

En el VHS2, se conocen 8 polipéptidos con cinética alfa: ICP5, ICP10, ICP11, ICP18 e ICP32.

Funciones de los Polipéptidos Beta

La transición a la síntesis de los polipéptidos beta requiere

la transcripción de novo de otras secuencias del genoma viral y la presencia de al menos uno de los polipéptidos alfa.

En relación con la función de los polipéptidos beta, la mayor parte están implicados en el metabolismo de nucleótidos o en la síntesis de ADN viral. Entre los primeros con actividades enzimáticas, se pueden citar ribonucleótido reductasa, desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa; entre los segundos, ADN polimerasa, ADNsa alcalina, una topoisomerasa y polipéptidos con propiedades de ligarse al ADN viral como el ICP8 o los ICP 12, 13, 15, 22, 34, y 35 del VHS2.

Aunque la mayoría de las funciones beta están relacionadas con la síntesis de ADN, también pertenecen a este grupo las glucoproteínas D y E estructurales regulatorias, relacionadas con la inhibición de las funciones celulares.

#### Funciones de los Polipéptidos Gamma

La expresión de los genes que codifican a los polipéptidos gamma requiera la presencia de algunos polipéptidos alfa y beta. Los polipéptidos son en realidad dos familias: los gamma 1, que son relativamente independientes de la síntesis de ADN viral y los gamma 2, que requieren de modo absoluto dicha síntesis. Este grupo incluye la mayor parte de los polipéptidos estructurales.

#### Proteínas del Virión

Se han identificado 30 proteínas estructurales:

Nucleocápside: contiene al menos 4 polipéptidos: VP5 (extraído de viriones purificados, es equivalente al ICP5 obtenido de células infectadas); el VP19 (ICP32); VP23 y el VP24. Otros dos, el VP21 y VP22 (ICP35) se observan en cápside

des que ya han incorporado el ADN viral.

#### Membrana:

Son glucoproteínas virales; se han descrito 6: gB, gC, gD, gE, gG y gH. Algunas, como la gD y gE, tienen cinéticas del tipo beta; las otras probablemente del tipo gamma.

Hay un grupo de proteínas que pueden ser extraídas de la membrana y la nucleocápside (tegumento); una de ellas, la VP16, podría activar la transcripción de los genes alfa.

#### Propiedades Transformantes (49)

Experimentos "in vitro" han demostrado que, si se daña el ADN viral infectante (por ej. con luz ultravioleta) la mayoría de las células infectadas continúan su desarrollo normal; algunas son transformadas y son capaces de formar tumores al ser injertadas en huéspedes susceptibles. En este caso, la transformación ocurre por integración de pequeños fragmentos de ADN viral al ADN celular, aunque no se sabe si se integran cromosomas completos de virus, como provirus, en el ADN celular.

### III. Infección "in vivo"

#### a) Patogénesis de la Infección (41) (48) (52)

En el huésped infectado, los VHS replican en células parabasales e intermedias del epitelio, produciendo lisis celular y una respuesta inflamatoria local. La acción viral produce modificaciones metabólicas y morfológicas denominadas efecto citopático viral (ECV), observándose hipertrofia citoplasmática y nuclear, aparición frecuente de un halo perinuclear como consecuencia del agrandamiento del núcleo. El nucleolo también se agranda y vacuoliza. El contenido citoplasmático se hace denso y opaco. En una fase posterior, la desaparición del nucleolo coincide con la aparición de cuerpos de inclusión

intranucleares características, que marginan la cromatina. Se forman células multinucleadas, ya sea por fusión celular o como consecuencia de una elevada actividad mitótica que no permite la separación de los núcleos recién divididos. Otros cambios degenerativos incluyen la vacuolización de las membranas nuclear y citoplasmática. Las células infectadas se separan de las normales que las rodean y rápidamente se descaman.

b) Manifestaciones Clínicas (41)

Luego de un período de 2-7 días de incubación, aparecen lesiones vesiculares y ulceraciones en vagina, vulva y perineo; en el cérvix, tanto las infecciones primarias como las recurrencias pueden ser asintomáticas. La infección dura 2-3 semanas, pero durante el embarazo tienden a persistir por largos períodos, particularmente las infecciones primarias.

c) Patología Asociada (46)

La encefalitis herpética del recién nacido, mortal en el 50% de los casos, es la manifestación neurológica más dramática de infección primaria por virus Herpes simplex. La infección ocurre por contaminación del niño en el canal del parto. Otras manifestaciones incluyen meningitis, radiculitis y mielitis. Ciertas malformaciones congénitas podrían deberse a infecciones transplacentales por los VHS tipos 1 y 2.

d) Latencia y Reactivación

Luego de la infección primaria, el virus persiste indefinidamente en forma latente en los ganglios sacrociáticos, trigémino o vagal y puede ser reactivado dentro de un período variable ( de pocos días a varios años) por estímulos externos o internos.

Los mecanismos de la latencia y reactivación viral no han sido hasta el presente elucidados, aunque se ha postulado que pueden ser el resultado de una alteración de las células nerviosas, en la cual se halla el virus latente, que pasa de un estado no permisivo a otro permisivo. Además de esta alteración, otros mecanismos de inmunidad parecen estar involucrados.

e) Respuesta Inmune a la Infección (51)

La inmunidad está dirigida a la célula infectada, más que a la partícula viral. La respuesta está determinada por el modo de diseminación del virus: de célula a célula. Dicho rasgo le permite al virus evadir los anticuerpos neutralizantes del fluido extracelular durante las recurrencias. Sin embargo, el rol de dichos anticuerpos es importante en los mecanismos de defensa mediados por complemento o por células citotóxicas en presencia de anticuerpos.

La inmunidad celular específica es la defensa más importante contra la infección. Si bien la inmunosupresión favorece la reactivación viral, esta también ocurre en presencia de sistema inmune funcional. No es claro el papel del sistema inmune en el mecanismo latencia-recurrencia, pero sí es fundamental en el control de la diseminación de la infección.

IV. Virus Herpes simplex y Cáncer del Cérvix Uterino

La hipótesis de una asociación de los virus Herpes simplex tipo 2 (VHS2) con el desarrollo del carcinoma escamoso del cervix está basada en estudios epidemiológicos, serológicos, en el hallazgo de marcadores virales en células de tumor y en



células transformadas "in vivo" por el virus así como en el potencial oncogénico de dicho virus, demostrado en sistemas experimentales.

a) Seroepidemiología (45) (53) (54)

Más de 18 años han transcurrido desde los primeros hallazgos seroepidemiológicos que sugirieron una relación entre la infección herpética genital y el cáncer cervical. Esos estudios iniciales (45) (53) demostraron que las mujeres con carcinoma de cuello uterino tienen un mayor nivel de anticuerpos específicos contra el VHS2 en comparación con controles normales. En la mayoría de estas investigaciones, se han realizado pruebas de neutralización determinando el índice de anticuerpos neutralizantes para los VHS1 u VHS2 o absorciones previas de sueros de pacientes, con VHS1, llegando a conclusiones similares. En la Tabla 1 se resumen algunos de los resultados publicados.

TABLA 1: ESTUDIOS SEROEPIDEMIOLOGICOS

Lugar	Referencia	Porcentaje de Positividad de anticuerpos contra VHS2	
		Controles	Cáncer Cervical
EE.UU. (Georgia)	Nahmias et al, 1970 (53)	35	83
Checoslovaquia	Janda et al, 1973 (55)	21	50
EE.UU. (Maryland)	Royston et al, 1974 (56)	67	100
Yugoeslavia	Kessler et al, 1974 (57)	25	40
Sudáfrica	Freedman et al, 1974 (58)	64	87
Colombia	Muñoz et al, 1976 (59)	68	87
EE.UU. (Charleston)	Rawls et al, 1976 (60)	17	45

Salvo algunos casos, se observa en la mayoría títulos superiores en las pacientes con cáncer cervical que en los controles normales. Las diferencias entre los valores medios podría reflejar diferencias raciales o variaciones socioeconómicas.

Sin embargo, los casos negativos en estos estudios no han sido explicados a la luz de la hipótesis planteada. A pesar de ello, numerosos datos apoyan la interpretación de que la seropositividad al VHS representa un factor de riesgo de carcinoma de cuello.

La transmisión sexual de la infección y el factor masculino en el desarrollo de dicha patología ha sido destacado por numerosos estudios; la infección en el hombre es a menudo asintomática, aunque la frecuencia de aislamiento de VHS2 en pene se sitúa entre el 2-3% (1).

También ha sido descripta la presencia de anticuerpos no neutralizantes (fijadores de complemento) dirigidos contra proteínas de VHS2 que aparecen tempranamente durante la replicación viral. Los resultados son coherentes con los obtenidos en estudios de anticuerpos neutralizantes (Tabla 2).

TABLA 2: PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA PROTEINAS TEMPRANAS DE VHS2 EN PACIENTES CON CANCER CERVICAL Y EN CONTROLES NORMALES

Lugar	Referencia		Porcentaje de Positividad	
			Cáncer	Control
Maryland	Aurelian et al, 1973	(60)	85	12
Pennsylvania	Notter et al, 1976	(61)	78	29
North Carolina	Heise ey al, 1976	(62)	55	0
Japón	Kawana et al, 1976	(63)	75	14
Japón	Kawana et al, 1976	(64)	52	17
Australia	Arsenakis et al, 1980	(65)	75	15
Argentina	Teyssié et al, 1980	(66)	75	0

b) Presencia de Proteínas Específicas Virales en Lesiones Premalignas y Malignas del Cérvix

Se han detectado proteínas virales en lesiones precancerosas y cancerosas del cérvix. Empleando inmunosueros contra antígenos virales totales, se observó positividad en el 33% de los carcinomas, siendo los controles negativos (67). En otra serie de estudios realizados sobre células exfoliadas del cérvix, fueron detectados dichos marcadores virales en el 61-72% de las displasias, en el 90-100% de los cánceres invasivos, en tanto que en los controles la frecuencia osciló entre el 0 y 9% (68) (69) (Tabla 3).

En los primeros estudios sobre proteínas virales tempranas, se emplearon inmunosueros contra antígenos constituídos por proteínas extraídas de células infectadas en las etapas previas a la conclusión del ciclo viral. Aurelian, empleando un antisuero denominado Age, demostró positividad en el 73% de los carcinomas y en el 63% de las displasias, resultando los controles negativos (69). Posteriormente, se mostró que el Age estaba constituído por las proteínas ICSP 12 y 14 (pág. 20). Los estudios aplicando los inmunosueros preparados frente a esas subunidades proteicas lograron resultados similares (73) (75).

Una de las proteínas virales alfa más ampliamente estudiadas es la ICSP10 (PM160.000), antigénicamente relacionada con la Ag4, un antígeno asociado al tumor, caracterizado por Strand (78), hallándose expresada en el 80% de los tumores

examinados y en células transformadas por fragmentos de ADN viral, obtenido por clivaje con la endonucleasa Bgl (79).

La proteína no estructural denominada VP143 (PM 143.000) fue identificada en células de rata transformadas por VHS2 y en células de carcinoma cultivadas "in vitro" (76) (77).

El modelo de transformación por virus de simio 40 (SV40), en el que se demostró que los antígenos tumorales (T) son proteínas tempranas con propiedades de ligarse al ADN, alentó estudios de aislamiento y caracterización de polipéptidos virales de VHS, empleando metodologías basadas en estas propiedades. Algunos polipéptidos no estructurales, identificados como ICP11 (alfa), ICP12 (beta), ICP34/35, han sido demostrados en células transformadas por el VHS2 inactivado con luz ultravioleta. Las dos primeras están codificadas por secuencias nucleotídicas ubicadas en el mapa genético en la zona que en el VHS1 tiene carácter transformante (82).

Los polipéptidos ICP 11-12 y VP 143 presentan similitudes antigénicas (77), por lo cual se consideran parte de la misma proteína purificada por distintos métodos. Se las halló, al igual que la ICP 34-35, en el 10% de las displasias y en el 40% de los carcinomas invasores examinados (74) (77).

TABLA 3: DETECCION DE PROTEINAS DE VHS2 EN CELULAS DISPLASICAS  
Y CANCEROSAS DEL CERVIX

Referencia	Antisuero contra	Porcentaje de Casos Positivos		
		Normal	Displasia	Cáncer
Aurelian	(68) VHS2	0	71	91.6
Aurelian	(69) Age	0	61.5	72.7
Pacsa	(70) VHS2	9,4	61	94
Adelusi	(71) VHS2	0	*	100
Minhui	(72) VHS2	9	*	100
Smith	(73) Age	0	72.6	91.4
Smith	(73) ICP 12	0	61.5	100
Smith	(73) ICP 14	0	58.3	75
Athanasiu	(67) VHS2	0	*	33.3
Dressman	(74) ICP 11/12	0	10.6	40
Gupta	(75) VHS2, ICP 12, ICP 14, Age	0.9	56-75	9-94
Melnick	(76) VP 143	*	*	15
Melnick	(77) VP 143, ICP 11/12, ICP 34/35	0	22	42
Aurelian	(79) ICP 10	*	*	80

\* No examinado.

### c) Detección del ADN Viral

La presencia de ADN viral en lesiones cancerosas ha sido muy difícil, debido principalmente a limitaciones en las metodologías empleadas, la cantidad de masa tumoral disponible para estudiar y el número de células tumorales en relación con el estroma subyacente. Frenkel (80) informó la detección de 3.5 copias de ADN por células, que correspondía al 40% del genoma total en una biopsia de carcinoma cervical de 70 g. de peso, con aproximadamente el 50% de células neoplásicas; el tumor también contenía mRNA complementario del 5% del genoma viral.

Otros estudios fracasaron en probar la presencia de ADN viral, aún con metodologías que permitían detectar 0.1 genoma por célula tumoral (81).

Sin embargo, más recientemente Galloway et al. (82) (83) lograron identificar fragmentos de ADN viral en tres carcinomas sobre un total de nueve. En uno se demostró la presencia del fragmento Bgl II N (obtenido por clivaje del ADN viral con enzimas de restricción; está ubicado en el mapa físico viral en la posición 0,58-0,63), en el otro fragmento, Bgl II J (0,32-0,40) y en el tercero, ambos fragmentos. También se incluyeron en el estudio tres adenocarcinomas; en uno de ellos, se halló el fragmento Bgl II N. Este resultado fue sorprendente, si se tiene en cuenta la epidemiología distinta respecto del carcinoma escamoso de cérvix.

Las dificultades en la detección de ADN viral no invalida la hipótesis planteada, por cuanto ha sido demostrado en experimentos de transformación efectuados con fragmentos o secuencias de VHS2 que las mismas no necesariamente persisten en la célula transformada (82).

#### d) Detección del ARN Viral

Otros intentos de identificación de marcadores virales no involucraron la detección de mRNA viral en biopsias cervicales, empleando hibridización "in situ", obteniéndose positividades del 32 al 72% (Tabla 4). Cuando los mRNA expresados en las células tumorales fueron mapeados por hibridación con secuencias de ADN viral, se demostró que la transcripción estaba

limitada a los fragmentos que correspondían a las posiciones (0,07-0,40, (0,58-0,63) y (0,82-0,85); los dos primeros corresponden a secuencias transformantes, pero ninguno estuvo invariablemente presente en todos los especímenes estudiados (82) (84) (86) (87).

TABLA 4: PRESENCIA DE mARN VIRAL: NUMERO Y PORCENTAJE DE BIOPSIAS POSITIVA POR HIBRIDACION "IN SITU"

Referencias	Células Normales	Displasias	Carcinomas escamosos	Adeno-carcinomas
Jones et al. (84)	0.3 ( 0%)	-	5/8 (62%)	-
Mac Dougall et al. (85)	6/9 (32%)	25.41(61%)	0/5 ( 0%)	-
Eglin et al. (86)	1/56 ( 2%)	31/43(72%)	21/35(60%)	1/11 ( 9%)
Maitland et al. (87)	6/13 (43%)	18/30(60%)	8/11 (72%)	-
Mc Dougal et al. (82)	6/50 (12%)	19/50(38%)	8/25 (32%)	-

Ocasionalmente, los experimentos de hibridación mostraron marcaciones inespecíficas, por lo cual algunos resultados podrían no ser totalmente válidos (82). Otra objeción que podría plantearse se refiere a que ninguno de los fragmentos citados se observó en el 100% de los casos, sugiriendo una pérdida de dichas secuencias o una etiología distinta de la planteada.

e) Potencial Oncogénico de los VHS

Todos los virus de la familia Herpes humanos han demostrado propiedades oncogénicas; los VHS, tipo 1 y 2 (88) (89), Citomegalo (90) y Varicela zoster pueden alterar las propiedades de crecimiento de células de roedor en cultivo, confiriéndole

un fenotipo transformado. Experimentalmente, se ha demostrado el potencial oncogénico de los VHS2, parcialmente inactivados por luz ultravioleta sobre células de roedor y hámster (2) (93).

Los genes responsables de la transformación en los VHS2 están localizados en dos regiones que corresponden al fragmento denominado Bgl II N (0,5-8-0,63) y el otro al Bgl II C (0,43-0,58), en el cual pueden distinguirse dos funciones transformantes: un extremo es capaz de immortalizar células diploides de hámster, pero ambos son necesarios para obtener el fenotipo transformado. Estas secuencias no son homólogas ni están ubicadas en la misma posición que el fragmento transformante en el VHS1 (82) (83).

En las células transformadas, han sido identificadas varias proteínas virus específicas, aunque ninguna se halló invariablemente en las mismas.

Se ha demostrado que las secuencias transformantes no son necesarias para mantener el fenotipo transformado, por lo cual se han postulado diversas hipótesis para explicar los mecanismos de transformación; una de ellas considera la activación de oncogenes celulares; otra, la activación mutagénica por integración o ruptura del ADN celular (83). La primera debe probarse; en cuanto a la segunda, hay evidencias de la mutagenicidad de los VHS parcialmente inactivados por la luz ultravioleta (93). Por otro lado, los virus de la familia Herpes inducen alteraciones cromosómicas, incluyendo rupturas, roerdenamientos y modificación de los patrones de condensación cromatínica (94) (95). Tales alteraciones parecen depender de



la expresión de funciones virales tempranas, a las que sigue una intensa reparación del ADN celular (96). Además, ha sido descrita en un cultivo de células de hámster chino transformadas con el SV40 e infectadas con VHS, una amplificación génica selectiva de las secuencias del virus transformante; la amplificación ocurre en ausencia de la replicación de ADN celular y sin expresión de las proteínas estructurales del SV40 (97).

La inducción de alteraciones cromosómicas, la reparación del ADN celular y la actividad mutagénica son caracteres que comparten los VHS con los carcinógenos físicos y químicos (iniciadores) y apoyan el concepto de un rol iniciador de estos virus en el cáncer cervical (98).

#### 1.4.2.2. Virus Citomégalo (44) (99)

##### I. Transmisión - Patología Asociada

El modo de infección y transmisión más común es por la vía orofaríngea; sin embargo, dado que la vagina, el cérvix, las vías urinarias, heces y semen pueden contener y eliminar virus infectivo en alto título, no puede descartarse una transmisión venérea de la infección.

La patología asociada a la infección primaria por virus Citomégalo (VCM) es la enfermedad del recién nacido; la contaminación puede ocurrir por: a) vía transplacentaria, afectando principalmente el sistema nervioso central, los pulmones, el hígado y otros órganos fetales, induciendo lesiones nuclea-

res típicas que le han dado el nombre al agente etiológico;

b) vía canal del parto: es muy rara la diseminación visceral o al sistema nervioso central; en general, las manifestaciones clínicas son semejantes a una mononucleosis o resultan asintomáticas, pudiendo presentar como secuelas la pérdida variable de la audición.

## II. Virus Citomégalo y Cáncer

El virus estimula la síntesis de ADN, ARN y proteínas en la célula infectada (61) y es capaz de transformar "in vitro" células de hámster y humanas. Las células transformadas, inoculadas en huéspedes susceptibles, dan lugar al desarrollo de tumores (90) (100).

El virus puede aislarse de semen (102), habiéndose sugerido su asociación con el cáncer de próstata (103) (104). Asimismo, ha sido detectado en pacientes con sarcoma de Kaposi (105) (101) aunque estos pacientes, generalmente inmunosuprimidos, pueden ser huéspedes oportunistas. También se ha informado su aislamiento en tumores de colon (104).

Estudios serológicos han señalado alguna relación entre el virus CM y el carcinoma cervical (105), pero las evidencias no son del todo convincentes, pues otras investigaciones aportan resultados contrarios a dicha hipótesis (106) (107).

### 1.5. Virus Papiloma

#### 1.5.1. Clasificación y Estructura (108) (109)

La familia Papovaviridae está constituida por pequeños

virus ADN que replican en el núcleo celular de vertebrados superiores, con caracteres físico-químicos estructurales comunes. El término PAPOVA fue propuesto por Joseph Melnick y está constituido por las dos primeras letras de los nombres de tres virus: Papiloma, Polioma y Vacuolating (del inglés, vacuolizante o formador de vacuolas).

El primer virus Papiloma (VP) fue descrito por Shope en 1933 (110) como agente infeccioso filtrable de verrugas de conejos salvajes. Gross (111) demostró en 1953 la producción de tumores en ratones C3H por virus Polioma. Por último, el virus Vacuolating 40 de simios (SV40) fue aislado por Sweet y Hilleman en 1960 (112).

En la familia se distinguen dos géneros: Papiloma y Polioma (que incluye a los Polioma, SV40, BK y JC).

En la Tabla siguiente, se muestran algunas diferencias entre ambos grupos:

---

	<u>Género Papiloma</u>	<u>Género Polioma</u>
Cápside:	55 nm	45 nm
Genoma:	8000 pares de bases	5200 pares de bases
Potencial oncogénico:	En estudio	Sí, en determinadas condiciones.

---

#### Estructura de los Virus Papiloma

Presentan un cápside icosaédrica proteica de 72 capsómeros, que encierra una molécula de ADN de doble cadena circular,

cerrada y superenrollada, asociada con proteínas celulares (histonas) modificadas o no por el virus.

Se han identificado 5 proteínas en viriones VP extraídos de verrugas humanas, bovinas y de conejo. La proteína principal del capsómero constituye el 75% del contenido proteico; las cuatro restantes son derivadas de histonas del huésped.

#### Especificidad (113) (114)

Los VP infectan un amplio rango de especies que incluyen humanos, caballos, perros, bovinos, conejos, elefantes, pinzones, etc. Son altamente específicos de especie, aunque no se descarta la posibilidad de infecciones cruzadas, ya que se ha demostrado que un tipo de VP bovino puede infectar caballos. Muestran un tropismo exclusivo por células epiteliales de mucosa o piel, aunque algunos son capaces de infectar fibroblastos.

Se han descrito en bovinos, conejos y humanos lesiones con morfología y localización específica dependientes del tipo viral infectante.

#### Caracteres de la Infección por VP

Los VP pueden infectar células epiteliales o más raramente, fibroblastos. Como resultado de la infección, se produce una proliferación epitelial o fibroblástica en la piel o mucosa. Los virus epiteliotrópicos producen una hiperplasia de las células de la capa espinosa (acantosis), hiperqueratosis y papilomatosis (ver pág. 7). Algunas células muestran vacuolización -la misma es menos pronunciada en las capas superiores-

y alteraciones nucleares en la capa granular. Las partículas virales se observan tanto en las células en degeneración como en las queratinizadas (109).

Los fibropapilomas inducen un papiloma cutáneo con un fibroma hacia las capas internas del tejidos conectivo, pero los efectos son muy variables; por ej., en ciervos, los VP inducen una estimulación a nivel fibroblástico con poco compromiso de las capas epiteliales superiores, en las cuales se observa hiperplasia y leve acantosis, mientras que en un VP bovino, la proliferación epitelial es más acentuada con signos de acantosis e hiperqueratosis (115).

Los mecanismos precisos por los cuales los VP inducen la formación de verrugas, el control de la expresión génica viral y la replicación en queratinocitos no son totalmente conocidos. Uno de los modelos más ampliamente estudiado es el de los VP de conejo, en el que se observó un incremento de la síntesis de ADN viral en las capas poco queratinizadas, en tanto que la síntesis proteica viral ocurre en las capas superiores del estrato granuloso (116); luego, dicha síntesis depende de la ocurrencia de cierto grado de diferenciación de las células que infecta.

Las verrugas tienen un crecimiento limitado y regresan bajo la influencia del sistema inmune (117). Los VP inducen una inmunidad mediada por células y humoral; estudios efectuados usando tests cutáneos sugieren que la susceptibilidad a la infección está relacionada con defectos en la inmunidad mediada por células (118).

Por otro lado, estos virus pueden ocasionalmente inducir la transformación maligna de los tejidos que infectan (119); un análisis más detallado de este aspecto se presenta en la Sección 1.6.

#### 1.5.4. Bases Taxonómicas Moleculares

Una peculiaridad de este grupo de virus es su heterogeneidad ampliamente distribuída; no se observa reactividad serológica entre virus que infectan distintas especies o en la misma especie, aunque existen determinantes antigénicos comunes a todos los VP, que pueden ponerse en evidencia al disociar partículas virales con detergentes y calor (120). Existe por otro lado, una variación antigénica entre tipos virales que infectan una misma especie animal. Estas variaciones intra e interespecíficas son el resultado de una gran heterogeneidad genética.

La replicación de los VP es, como se mencionó previamente, dependiente de la diferenciación de queratinocitos, por lo cual no es posible propagar el virus "in vitro" (108). Las verrugas son la fuente natural de partículas virales, pero la eficiencia en la producción de viriones por parte del tejido infectado parece ser propiedad del tipo viral presente; en muchos casos, es imposible aislar una cantidad suficiente para los análisis proteicos, de ADN y para estudios serológicos. En relación al ADN viral, el problema se ha resuelto por el uso de técnicas de clonado molecular de material genético viral en plásmidos bacterianos, los cuales, por carac-

terísticas autoreplicativas pueden amplificar el material de estudio, permitiendo establecer el grado de homología entre los ADN's de distintos VP.

La clasificación se basa en el rango de huésped y el grado de homología del ADN. Cada virus se llama primero por su huésped natural (el cual es inequívoco, pues el rango de huésped es estricto). Los virus que infectan una misma especie se clasifican en tipos y subtipos. Los tipos independientes son aquéllos que comparten menos del 50% de homología y los subtipos, los que exceden dicho porcentaje. Cuando dos virus aislados sólo difieren en algunos sitios de clivaje por endonucleasas se denominan cepas. La extensión de la hibridación cruzada está determinada por la reasociación de ADN heterólogo en fase líquida. Las cadenas solas se remueven por digestión enzimática y se expresa la reacción cruzada como porcentaje de hibridación estandarizado al 100% para ADN homólogo. Dichos valores no representan a homologías puntuales a nivel nucleotídico, pues las secuencias de homología entre ADN's de VP son difusas (108) (121).

Sobre la base de 50% de hibridación cruzada, pueden diferenciarse 6 tipos bovinos, 1 tipo de conejo, 42 tipos de VP humanos (122), aunque en estos, los 3 últimos tipos no han sido caracterizados totalmente.

En condiciones normales o estrictas, no se obtiene hibridación cruzada entre ADN's de distintos tipos de VP pero, en condiciones más relajadas (en las cuales se reducen la concen-

tración salina o de formamida, a través de fórmulas matemáticas que tienen en cuenta el porcentaje de citocina y guanina en el ADN viral), se observan regiones de homología parcial (cerca del 75%).

Bajo condiciones no estrictas de hibridación, los VP humanos 1, 4, 18 y 30 no muestran homologías con otros tipos. Los restantes forman cuatro grupos cuyos miembros presentan reacciones de hibridación cruzada (121) (Tabla 1).

TABLA 1: AGRUPACIÓN DE LOS VP HUMANOS SEGUN EL GRADO DE HOMOLOGIA CRUZADA

I	IIa	IIb	III	IVa	IVb	IVc	V	VI	VII	VIII	
1	2	6	4	5	9	24	7	16	33	18	30
	3	11		8	15			31			
	10	26*	13	12	17			34			
	28	27*	32	14							
	29			19	37**						
				20	38**						
				21							
				22							
				23							
				25							
				36							

\* Se hallan relacionados con los VP de los grupos IIa y IIb

\*\* Se hallan relacionados con los VP de los grupos IVa y IVb

No cabe la menor duda que la homología del ADN es el mejor indicador de la relación evolutiva y no sorprende que los tipos virales que presentan cierto grado de hibridación cruzada exhiban propiedades patogénicas similares. (122). Así, los



que infectan mucosas pueden formar un subgénero, por ej.: los tipos 16 y 18 están significativamente más relacionados con los 6 y 11 que aquéllos que infectan piel, como el 1 y el 8 (Tabla 2).

TABLA 2: RELACION ENTRE EL TIPO VIRAL Y LA LOCALIZACION DE LA LESION

Localización de la Lesión	Tipo Viral Detectado en Humanos
<u>PIEL</u>	
Verrugas cutáneas comunes	1, 2, 3, 4, 7, 10, 31, 32
Keratosis cutánea	36
Epidermodisplasia verruciforme	3, 5*, 8*, 9, 10*,12*. 14*, 15*, 17*, 19* al 29
Keratoacantoma	37
Melanoma	38*
Enfermedad de Bowen	34
<u>MUCOSA</u>	
Cavidad bucal	13
Laringe	6, 11, 30
Genital	6. 11, 16*, 18*, 30, 31, 33*, 35
* Asociados con tumores malignos VP 1-31, revisado por Pfister (121); VP 32 (123); VP 33 (124); VP 34 (125); VP 35 (126); Vp 36 (127); VP 37 y 38 (128).	

A pesar de la heterogeneidad, los tipos individuales no parecen sujetos a la deriva genética, pues tipos virales aislados y clonados en diversas partes del mundo tienen mapas de clivaje por endonucleasas muy similares (129).

#### 1.5.5. Organización y Expresión del Genoma Viral (108) (130) (131)

El genoma consiste en una doble cadena de ADN con una

longitud de 8000 pares de bases; el rasgo más saliente es que toda la información genética se halla en una sola cadena, vale decir que únicamente se transcribe una sola de ellas (108),

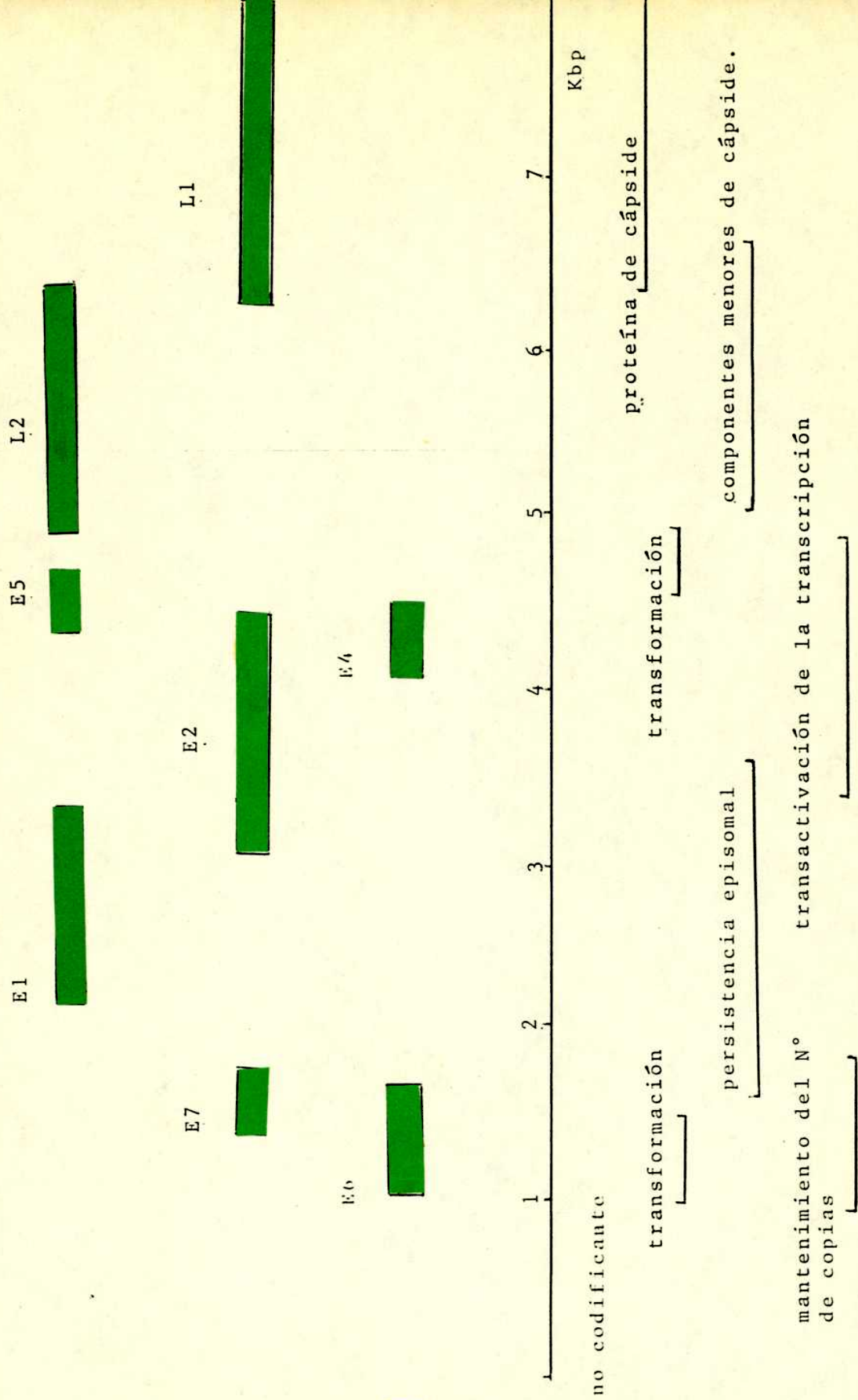
En la mayoría de los virus ADN, es posible clasificar los genes en tempranos, los cuales se expresan antes del comienzo de la replicación del ADN viral y los tardíos, que se expresan luego de dicha replicación. Como los VP no pueden ser cultivados "in vitro", no es posible hacer una división funcional del genoma, pero por analogía con otros Papovaviridae, se supone que "temprano" es sinónimo de genes que están expresados en células transformadas por el virus; así, se observa en experimentos de transformación de células de ratón con VP bovino tipo 1 que un fragmento del genoma viral que abarca el 69% del genoma es responsable de la transformación, por lo cual se lo denomina E (del inglés "early" = temprano), y al resto L (del inglés "late" = tardío).

Los VP, como otros virus de la familia Papovaviridae, tienen una organización genómica muy compacta, con pocos nucleótidos sin función codificante (aproximadamente del 10% del total del genoma).

La organización genómica de los VP humanos 1, 6, 11 y 16, de los bovinos 1 y 2 y de los de conejo y zorro es muy similar, con estructuras comparables en tamaño y posición, como lo revelan estudios de la secuencia nucleotídica.

En el VP tipo 1, se reconocen 8 subregiones en la región E; las E1, E2, E4, E6 y E7 parecen tener sus equivalentes en todos los VP secuenciados hasta ahora (130) y probablemente,

GRAFICO 1 Organización genómica de los virus Papiloma.



codifican polipéptidos funcionales. La E2 es importante para mantener el fenotipo transformado en células de ratón, pero se requiere la totalidad de la región E6 y E7 para inducir la transformación.

En la región L, se distinguen dos subregiones: L1 y L2, que codifican para proteínas de cápside. La primera está muy conservada (aproximadamente 50% de conservación); la segunda es más variable. En la L1 está codificada la proteína común del género Papiloma; las regiones divergentes podrían tener un rol en la especificidad de huésped y tejido.

Estudios de transformación de células de ratón por transfección de ADN de VP bovino tipo 1 o en la línea derivada de carcinoma de conejo VP, inducido por VP en esa especie, demuestran que el genoma viral se mantiene en forma episómica y sólo se transcribe una sola cadena; estas propiedades los diferencian de los virus Polioma, cuyo genoma se halla integrado en las células transformadas y en los cuales, en el ciclo lítico, son copiadas ambas cadenas. Sin embargo, la persistencia del material genético viral en la forma episómica no es la única, ya que en la línea celular HELA (derivadas del carcinoma de cuello uterino) presentan los tipos 16 y 18 en forma integrada y amplificada de 1 a 5 veces; a pesar de los múltiples pasajes, muy pocas deleciones se observan en esas unidades repetitivas (130).

En lesiones genitales, la forma episómica se presenta en las displasias, en tanto que en las lesiones malignas y líneas derivadas, el genoma se encuentra en forma integrada. Se observan dos formas de integración: como copias únicas o múlti-

ples en tandem; a veces, la copia única está amplificada junto con las secuencias celulares adyacentes. La zona de unión al ADN siempre ocurre por la región E1 y E2, dando por resultado la ruptura de dichas regiones, lo que podría ser un paso importante en la transformación maligna.

#### 1.6. Potencial Oncogénico de los VP en Distintas Especies

Los VP son normalmente específicos de especie, aunque los VP inductores de fibroma, que incluyen a los bovinos tipo 1 y 2, de ciervo y de oveja son capaces de inducir fibromas y sarcomas en huéspedes heterólogos (109) (113) (114). Además, los VP de ante y bovino 1 y 2 transforman fibroblastos de ratón "in vitro", lo que sugiere que la transformación podría estar relacionada con la proliferación fibroblástica "in vivo", aunque recientemente se pudo lograr transformación con el VP tipo 4, que es epiteliotropo.

##### Transformación "in vivo"

Los VP bovinos tipo 1 y 2 son capaces de inducir sarcomas (en forma heteróloga) en caballos; en estos tumores, no se detectan partículas virales, aunque sí proteínas relacionadas con el estado transformado. La mayoría de los ADN virales se encuentran en la forma monomérica no integrada, salvo en algunas células derivadas de tumores inducidos por el VP bovino tipo 1, en las que se observa integración, pero se ha demostrado que la misma no es necesaria para la transformación (133).

##### Transformación "in vitro"

La habilidad de los viriones y ADN viral (VP humanos tipos 1, 5, 11 y 16 el bovino tipo 1)(132)(133)(134)(135) de inducir transformación en cultivos celulares resulta particularmente útil, especialmente en ausencia de un sistema productivo "in vitro". Diversos estudios muestran que las células transformadas no poseen inhibición por contacto, crecen independientes del medio y son tumorígenas en ratones atímicos, lo que las diferencia de las derivadas de fibromas inducidos por el virus (136).

Se desconocen los mecanismos de transformación, pero se sabe que el mantenimiento del fenotipo transformado depende de la presencia del genoma viral, aunque en ningún caso se ha observado la producción de partículas virales (136).

#### Virus Papiloma de Conejo o de Shope

Es uno de los primeros virus identificados como inductores de tumores en mamíferos (110). Aunque el conejo "cotton tail" es el huésped natural, la mayoría de los estudios se efectuaron con conejos domésticos, en los que la infección es semejante pero produce virus. En el conejo cotton tail, la progresión hacia el tumor es una secuencia ordenada y predecible de eventos, donde varias lesiones papilomatosas progresan independientemente (con producción de partículas virales). Entre 10-40% de esas lesiones desaparecen espontáneamente; el resto puede permanecer como tumores benignos o transformarse en carcinomas escamosos en los que ya no se detectan partículas virales pero sí en copias múltiples del genoma viral (109).

Cuando se infectan conejos doméstico, la frecuencia del desarrollo de carcinomas escamosos es tres veces más alta que

en el huésped natural. Por otro lado, la presencia viral disminuye el umbral de la concentración de carcinógenos químicos requerida para inducir tumores en estos conejos; reduce el período de latencia, lo cual demuestra la acción sinérgica con otros agentes en la inducción de tumores malignos (113) (119).

#### Papiloma de Tracto Alimentario de Bovinos

Las verrugas en el tracto alimentario constituyen una enfermedad muy común en el ganado bovino, pero la conversión maligna de tales proliferaciones parece depender del tipo viral infectante (Vp bovino tipo 4) y la ingestión en la alimentación del ganado de cierto tipo de helecho, en el que se ha demostrado la presencia de carcinógenos (136) (119).

#### Epidermodisplasia Verruciforme de Humanos

Es una enfermedad rara, en la que parecen existir componentes inmunológicos y genéticos de carácter autosómico y recesivo. Se caracteriza por presentar lesiones verrugosas planas diseminadas, rojizas o incoloras. La tercera parte de los pacientes afectados desarrollan carcinomas escamosos luego de un promedio de 24 años desde el inicio de la enfermedad. La conversión maligna ocurre preferencialmente en las lesiones expuestas a la luz.

En las lesiones benignas, pueden encontrarse partículas virales pero no así en las carcinomatosas. Numerosos tipos virales han sido identificados en las lesiones benignas; por el contrario, en las malignas sólo se detectan los ADN de VP ti-

po 5 (o los relacionados con este tipo) y más raramente, con el tipo 8. El VP humano tipo 5 se encuentra en forma oligomérica no integrada y las moléculas presentan deleciones. Por lo tanto, factores genéticos, inmunológicos y ambientales podrían influir en la susceptibilidad de los pacientes con epidermodisplasia verruciforme a ciertos VP que estarían relacionados con la evolución hacia la malignidad.

#### Papiloma Laríngeo (138) (139)

Los papilomas escamosos de laringe son los tumores benignos más comunes en niños, aunque también se los halla en adultos. Son un serio problema clínico por su resistencia al tratamiento y por las recurrencias. Si bien hay poca información de desarrollo de carcinomas a partir de papilomas juveniles, hubo casos con antecedentes de tratamientos radioterapéuticos que podrían haber inducido la transformación maligna.

En adultos, el papiloma laríngeo representa una lesión precancerosa con una frecuencia de conversión maligna del 20%, generalmente asociada con hábitos fumadores.

El tipo viral asociado con la lesión benigna es el VP 11, aunque no pudo encontrarse en los carcinomas estudiados hasta el presente.

#### Infecciones Genitales

La infección con VP ha surgido como la enfermedad de transmisión sexual prevalente, con un incremento de la incidencia en las dos últimas décadas que, según algunas estadísticas, llega al 700% (140). Por otro lado, hubo un cambio en la



en la consideración de la infección, la cual era observada como inductora de lesiones verrugosas en piel y mucosas de vagina y vulva. Posteriormente, se demostró que el cérvix uterino también estaba involucrado, ya que el 50% de los condilomas se detectaban en ese sitio. A diferencia de los de vulva y vagina, resultaban difíciles de reconocer morfológica e histológicamente y presentaban más atípías celulares, por lo que eran clasificadas como lesiones de neoplasia intraepitelial (NIC). El rasgo más destacado de las infecciones por VP, el coilocito, fue descrito por primera vez por Koss (141), aunque su etiología viral recién fue reconocida en el año 1976 cuando se lo relacionó con el condiloma (10) (142). La presencia del virus fue demostrada al microscopio electrónico y mediante la detección de antígenos por la técnica inmunoperoxidasa (143) (144). Ferency (145) detectó partículas virales al microscopio electrónico en el 25% de los coilocitos y antígenos virales en el 48%; el fracaso en demostrar la expresión génica tardía (producción de proteínas de cápside y ensamblado de viriones) fue relacionada con la replicación semipermissiva, hipótesis apoyada por numerosos estudios que demostraron ADN viral en coilocitos antígeno-negativos.

En los últimos años, la clasificación de lesiones de neoplasia intraepitelial (NIC) ha variado, pues estudios retrospectivos revelaron que el 70% de las NIC no son lesiones precancerosas en el sentido estricto, sino condilomas planos (147). Esta observación es importante, no sólo porque asocia a los VP

con NIC, sino porque hay diferencias que los distinguen. La más destacable es que mientras que los condilomas son poliploides y regresan frecuentemente, las NIC son generalmente poliploides o aneuploides y a menudo progresan (147). La relación entre ambas lesiones es destacada en numerosas investigaciones que muestran una asociación de los condilomas planos con las NIC de mayor severidad en el 25% de los casos examinados (149). Walker demostró antígenos virales en el 39% de las NIC 1 o 2 y en el 17% de las NIC 3 (150).

La demostración de secuencias de ADN viral en un espectro de lesiones, incluyendo condilomas, precancerosas y carcinomas, sugiere que los VP podrían estar relacionados con el desarrollo del cáncer cervical (119).

Los VP tipo 6 y 11 fueron encontrados más frecuentemente en lesiones condilomatosas puras (en el 90% de los casos, en tanto que en carcinomas de pene, cérvix y vulva se hallaron el tipo 16 (en el 50% de los casos) y el tipo 18 (en el 20% de los casos) (151). Estudios de carcinomas cervicales procedentes de diferentes áreas geográficas han demostrado variaciones en la prevalencia de ambos tipos virales (129). Otros tipos, como el 6, 11, 10, 31, 33, 35 y 42, fueron destacados en menor proporción (151) (152).

Aunque la infección con VP tiene la misma frecuencia en ambos sexos, la incidencia del cáncer de pene es mucho menor; una razón podría estar relacionada con el estado físico del ADN viral en las células infectadas, mientras que los VP tipos 6 y 11 de condilomas y el 16 de la papilosis bowenoide (considerada la contrapartida masculina del carcinoma "in situ"

femenino) (153) se hallan en forma episódica, en los carcinomas de cuello uterino y líneas celulares derivadas de ellos, los tipos 16 y 18 se los halla frecuentemente integrados al genoma celular. La integración ocurre en múltiples sitios, los cuales podrían incluir regiones de control; la excisión del ADN viral podría remover las zonas de control adyacentes (131).

Se ha especulado que la presencia de los VP tipos 16 y 18 en lesiones precancerosas podría constituir un riesgo en la progresión hacia lesiones de mayor severidad (152). Sin embargo, la presencia de los mencionados tipos virales en células descamadas del cérvix, sin anomalías, indicativo de una infección subclínica podría señalar la presencia de otros factores predisponentes que pudieran actuar sinérgicamente en la evolución hacia la malignidad (131).

#### Modelo de Oncogénesis Viral

El estudio de una probable etiología viral del cáncer presenta dificultades inherentes al concepto de causalidad, factores generados en el huésped, la ausencia de modelos animales válidos, contradicciones introducidas por la entidad infecciosa y la naturaleza crónica de la enfermedad (79). Algunos de los problemas que se presentan para establecer una posible relación son: 1) un largo período de incubación entre la exposición al agente infeccioso y el desarrollo del cáncer; 2) una incidencia relativamente baja del cáncer en relación con la frecuencia de las infecciones virales; 3) la posibilidad

de que las células malignas puedan presentar una mayor susceptibilidad a los virus sospechosos de oncogenicidad; 4) el rol del medio y/o cofactores genéticos, hormonales, inmunológicos, etc.; 5) la dificultad de reproducir la enfermedad en modelos animales adecuados; 6) la imposibilidad por obvias razones éticas de experimentar con seres humanos.

Cuando la asociación de virus con tumor ha sido establecida, queda aún por probar la oncogenicidad. Algunas evidencias podrían indicar que un virus es oncogénico (154), aunque no lo prueban en un sentido estricto, son: 1) asociación del virus con el tumor por la presencia del mismo o marcadores virales tales como proteínas, ADN o ARN y respuesta inmunológica antiviral (anticuerpos, etc.); 2) inducción de tumores en animales de experimentación; 3) transformación de cultivos celulares "in vitro".

En relación con el cáncer de cuello uterino, los VHS2 y los VP parecen cumplimentar los requisitos mencionados en forma independiente; la mayoría de los estudios y líneas de evidencia se basan en las propiedades iniciadoras y/o promotoras de ambos virus.

En el mecanismo de inducción tumoral por virus, se han definidos los siguientes roles (155):

Efector: cuando implantan genes funcionales, cuya expresión es requerida para iniciar o mantener el estado transformado.

Iniciador: cuando tienen efectos mutagenizantes.

Promotor: cuando son inductores de la proliferación celular.

No son carcinogénicos cuando actúan en ausencia de iniciadores. pero aplicados concomitantemente o subsecuentemente con iniciadores, reducen el umbral de carcinogenicidad y el período de latencia antes de la aparición del tumor.

En el cuadro siguiente, se señalan algunas funciones adjudicadas a los VHS2 y VP, apoyadas por evidencias experimentales (79) (155).

	F U N C I O N E S		
	Efectoras	Iniciadoras	Promotoras
VHS2	SÍ*	SÍ	No
VP	SÍ*	en estudio	SÍ

\* Demostrado por la presencia de genes transformadores.

En condiciones naturales o experimentales, los VP inducen lesiones verrugosas con cierta tendencia a convertirse en carcinomas escamosos; en la mayoría de los casos, dicha conversión parece requerir la presencia de carcinógenos (119) y de ciertos tipos virales, p. ej.: en la epidermo-displasia verruciforme, hay una mayor frecuencia de transformación maligna en las zonas expuestas a la luz solar e infectadas con los VP tipos 5 y/u 8 (137). En los papilomas laríngeos, la conversión maligna está relacionada con radioterapia, siendo destacable que el tipo viral más frecuente es el VP tipo 11, presente también en los condilomas atípicos de cérvix (156).

Por último, el cáncer de tracto alimentario de bovinos parece ser el resultado de la interacción del VP bovino tipo 4 y de la ingestión por el ganado de cierto tipo de helecho (119).

Teniendo en cuenta estas interacciones, los VP se asemejarían a los promotores, induciendo la proliferación celular la cual, en presencia de mutágenos, conducirían a una rápida conversión maligna (155). La presencia de determinados tipos virales en carcinomas podría sugerir diferencias en el "potencial oncogénico" de los mismos. Factores genéticos, hormonales e inmunológicos del huésped limitarían o podrían prevenir el desarrollo tumoral (157).

Sin embargo, en la hipótesis VP-cáncer cervical, es necesario destacar todas las evidencias que se acumularon en relación con la asociación de los VHS2 con patología tumoral cervical (79) (serológicas, epidemiológicas, bioquímicas y virológicas -propiedades transformantes y mutagénicas) (155). Conciliando ambas líneas de investigación, podría plantearse una interacción de VP y VHS2 en la patogénesis del cáncer de cuello uterino. La acción sinérgica entre eventos iniciadores (mutagénicos) y la infección con algunos tipos de VP podrían inducir la transformación maligna de los tejidos infectados (157). Los eventos mutagénicos podrían tener lugar en las infecciones herpéticas recurrentes, aumentando el riesgo de la conversión maligna. El modelo planteado no implicaría a los VHS2 como la condición necesaria y suficiente para el desarrollo de cáncer cervical, pues otros iniciadores podrían estar actuando (157), tales como cigarrillo, infecciones bacterianas u otros virus. Los casos de serología negativa y la falta de marcadores de VHS2 en carcinomas de cuello, así como las dificultades en demostrar VP en la totalidad de las lesio-

nes precancerosas y cancerosas del cérvix señalan la necesidad de ampliar el estudio de algunos aspectos relacionados con las funciones virales tempranas, los cuales han sido relacionados con eventos de carcinogénesis (154).

#### OBJETIVOS DE LA TESIS

Existiendo la posibilidad de una interacción de los VHS2 y VP en relación con el desarrollo del cáncer de cuello del útero, se propuso estudiar a un grupo de pacientes que mostraba una alta incidencia de patologías cervicales de distinto grado de severidad, incluyendo lesiones no displásicas, condilomatosas, displásicas y carcinomatosas. La colposcopia efectuada en algunas pacientes mostraba las imágenes de condilomatosis asociadas con las sospechosas de malignidad. Por otro lado, el estudio histopatológico de las piezas de conización efectuado en puérperas demostró con cierta frecuencia la regresión de lesiones displásicas y carcinomatosas, por lo cual se incluyeron en el estudio pacientes embarazadas, a fin de detectar la presencia de agentes infecciosos asociados con las lesiones del epitelio cervical, probablemente favorecidas por modificaciones inmunológicas (relacionadas con el embarazo) tratando de establecer si existe una correlación entre infección viral y evolución de las lesiones del cérvix y enfocando la posible infección concomitante de VHS2 y VP.

Los objetivos de estudio fueron EVALUAR:

1. La incidencia de las Infecciones papilomatosos y herpéticas

mediante:

a) Diagnóstico colposcópico de las lesiones condilomatosas asociadas ó no con imágenes sospechosas de malignidad.

b) La evaluación histo patológica de biopsias del cérvix, considerando los rasgos morfológicos atribuidos a la infección viral.

c) La detección de antígenos relacionados con VP y VHS2 en biopsias y extendidos citológicos del cérvix uterino.

2. La infecciones concomitantes o asociadas, examinando:

a) La localización de las respectivas proteínas virales en los tejidos simultáneamente afectados por ambos virus.

b) La expresión de proteínas no estructurales (tempranas) de VHS2 en tejidos cervicales, con o sin evidencias histopatológicas de infección con VP.

3. La presencia de secuencias de ADN específicas de los tipos de VP asociados más frecuentemente con lesiones del cérvix.

4. Estudiar retrospectivamente y prospectivamente la evolución de las lesiones del cérvix en relación con las infecciones virales precitadas, a través de:

a) Seguimiento ginecológico completo (citología, colposcopia, histopatología).

b) Exámen histológico de las piezas de conización.

c) Seguimiento inmuno-virológico.



INCIDENCIA DE LAS INFECCIONES HERPETICAS Y PAPILOMATOSAS  
ASOCIADAS CON LESIONES DEL CERVIX UTERINO.

Pacientes, Materiales y Métodos

I. Grupo de Pacientes

Se estudiaron 301 pacientes (172 embarazadas y 129 no embarazadas, provenientes del Servicio de Ginecología y Obstetricia, Sección Patología Cervical del Hospital Nacional "Alejandro Posadas", Pcia de Buenos Aires), con diagnóstico de:

Displasia leve: 20; displasia moderada: 33; displasia severa: 31; carcinoma "in situ": 35; carcinoma invasor: 11; condiloma: 21; lesiones no displásicas (cervicitis crónica, metaplasias maduras e inmaduras, acantoqueratosis) 105; control (pacientes colposcópica e histológicamente sanas): 45.

Las edades de las pacientes embarazadas oscilaron entre 15 y 35 años, mientras que las de las no embarazadas entre 19 y 55 años (Tabla 1). El grupo exhibió un nivel cultural y económico de medio a bajo.

Las pacientes fueron sometidas a un examen ginecológico completo que incluyó citología, colposcopia, histopatología y estudio inmunoviroológico del cérvix.

II. Citología: examen de rutina de células descamadas de cérvix por la técnica Papanicolau (Anexo 4, pág. 145).

III. Colposcopia: empleando la metodología habitual: embrocación del cérvix con ácido acético al 3% para clarificar la imagen y test de Shiller (con solución yodo-yodurada)

para detectar la acumulación de glucógeno, indicativa de la normalidad del tejido.

Se efectuó biopsia dirigida de las zonas sospechosas de condilomatosis y/o de malignidad. Las muestras obtenidas fueron orientadas sobre papel y se fijaron con formol al 10% por 6 horas.

#### Criterios Colposcópicos (19):

Manchas blancas tipo condiloma: se observaron placas blanquecinas, pequeñas, redondeadas, lisas o discretamente sobre-elevadas, de bordes netos.

#### Leucoplasia, mosaico y puntillado tipo condiloma:

La leucoplasia se observa como una imagen blanquecina, a veces de bordes netos, de superficie levemente sobre-elevada, presentando distintas formas y medidas. Pueden ser únicas y se ubican en la vecindad del límite interepitelial. El mosaico tipo condiloma se presenta en forma irregular con losetas blancas de distintos tamaños y espesor; las calles vasculares pueden tener forma irregular o de puntillado grueso.

Puntillado o base tipo condiloma: es característico el puntillado rojo grueso que se destaca sobre un fondo claro con bordes bien definidos. Pueden hallarse aislados o asociados con imágenes de leucoplasia y mosaico condilomatoso.

Están constituídos por asociación de las imágenes descriptas en el párrafo anterior; suelen ser la expresión colposcópica de condiloma plano o endofítico (fig. 1 y 2).

Condilomatosis florida: proliferación blanquecina arborescente (fig. 3).

#### IV. Histopatología:

Se aplicaron técnicas corrientes en histología: inclusión en parafina, cortes seriados de las biopsias, coloración con hematoxilina, eosina (figura 4) y en algunos casos, con ácido periódico de Schiff ( para la demostración de células glucogenadas) (Anexo 3, pág.144)..

Se efectuó la revisión diagnóstica de 754 biopsias (470 provenientes del grupo de embarazadas y 287 de las no embarazadas), para destacar la expresión histológica de los efectos citopáticos atribuidos a la infección con VP (EC-VP) (coilocitosis, acantopapilomatosis, disqueratosis, binucleación, etc.) (pág. 7 ).

#### V. Estudios Viroológicos (158) (18)

##### Virus:

a) Virus Papiloma (VP): (Anexo 5, pág.144) fueron obtenidos a partir de fibropapilomas bovinos por tratamientos enzimáticos y purificados en varias etapas por ultracentrifugación y gradientes de densidad (120). Las partículas virales fueron observadas al microscopio electrónico por coloración negativa (Anexo 6, pág.148) (fig.6c).

Luego, fue disociado por calentamiento con 2 marcaptopetanol y dodecylsulfato de sodio, que permitió liberar a los antígenos comunes al género Papiloma (presente en todas las subclases de virus Papiloma humanos y de otras especies animales) (120).

b) Virus Herpes simplex tipo 2 (VHS2): La cepa, proporcionada por el Instituto Pasteur (París) fue propagada en células RK 13 (línea continua de riñón de conejo No. 13) y titulado por valoración de efecto citopático viral sobre células Hep 2 (línea continua de carcinoma de laringe humana) (Anexo 9 y 10, pag.15)

#### Inmunosueros

a) Suero Anti-VP: se inmunizaron conejos con la proteína viral obtenida (16). El inmunosuero se absorbió con homogenato de piel bovina normal durante 24 hs a 37°C, a fin de eliminar reacciones inespecíficas. La reactividad del mismo fue demostrada por la técnica inmunoperoxidasa (IP), considerando como reacción positiva la presencia de un precipitado granular marrón oscuro en los núcleos de las capas intermedias y superficiales del epitelio (59). Como control positivo, fueron incluída secciones de biopsias de verrugas plantar y plana, ricas en contenido viral. Como control negativo, se procesaron biopsias de lesiones de piel no verrugosas (carcinoma de células basales, queratosis seborreica, carcinoma epidermoide); piel humana normal y epitelio cervical humano (escamoso y bien glucogenado) (Anexo 8, pág. 149).

b) Suero anti VHS2: (Anexo 11, pág.152) fué obtenido en conejos (160) y absorbido en células RK 13 y Hep 2. Con el objeto de demostrar su especificidad por IP, se prepararon portaobjetos con células RK 13 y Hep 2 infectadas con VHS2 durante 4 hs (para evaluar una posible reactividad hacia proteínas virales tempranas) o por 24 hs (para la reactividad frente a antígenos virales totales) y con células no infectadas. Todas las

células fueron fijadas en acetona fría.

c) Suero Pre-inmune: previo a la inmunización, se procedió al sangrado de todos los conejos. El suero fue ensayado sobre células Hep 2 y RK 13 infectadas y no infectadas, piel humana normal, epitelio cervical humano normal y verrugas plantares.

Técnica Inmunoperoxidasa (IP) (Anexo 12, pág.154):

Biopsias: se procesaron 754 biopsias fijadas y embebidas en parafina. De cada una de ellas, se prepararon tres protaobjetos con cortes seriados de 4-5  $\mu\text{m}$ , que luego de desparafinar e hidratar, se preincubaron con peróxido de hidrógeno al 3% para remover la peroxidasa endógena. Se lavaron brevemente y se incubaron con diluciones 1/100 de suero preinmune (control negativo), suero anti VHS2, suero anti VP, respectivamente, durante 24 hs a 4°C (161). Los cortes lavados se incubaron secuencialmente (intercalando lavados) con suero anti-inmunoglobulina de conejo (preparado en cerdo, Dakopatts), dilución 1/80 y con el complejo suero de conejo anti peroxidasa-peroxidasa (Dakopatts), dilución 1/200. Las incubaciones se efectuaron durante 30 min. a temperatura ambiente.

La reacción fue revelada con 3' diamino bencidina al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en Tris HCl (pH 7.6). Se efectuó una coloración de contraste con hematoxilina débil y se montó en la forma habitual.

Fueron ensayados simultáneamente y como controles positivos secciones de biopsias de verruga plantar y células Hep 2

infectadas con VHS2.

Células de hisopado cervical: fueron obtenidas al mismo tiempo que la biopsias; se fijaron con acetona fría durante 20 min y luego de hidratadas, fueron procesadas de la misma manera que las biopsias.

### Resultados

Pacientes: de las 301 pacientes estudiadas 119 estaban afectadas por lesiones premalignas y malignas del cérvix; el resto presentaba otras alteraciones cervicales. En el primer grupo, 82 pacientes (70%) tenían menos de 30 años. La edad de iniciación sexual fue similar en ambos grupos, salvo en los casos de carcinoma invasor, que muestran un comienzo más temprano. (Tabla I).

### Relación en Colposcopia e Histología

Sobre un total de 301 pacientes, por observación colposcópica 151 fueron diagnosticadas como lesiones condilomatosas; en el resto, las imágenes colposcópicas se interpretaron como no condilomatosas, pero como blanco potencial de la infección con VP (leucoplasia, mosaico, etc.).

En el primer grupo (151 casos) el diagnóstico de condilomatosis fue histológicamente confirmado en 136 casos (90%) (Tabla II). En la mayoría, las imágenes colposcópicas de leucoplasia (frecuentemente con un granulado fino o rugosidad en la superficie), aparecieron asociadas con mosaico y puntuación. Los condilomas floridos, en su etapa inicial estuvieron caracterizados por pequeñas proyecciones levemente sobre-

elevadas con un capilar central. El condiloma plano, luego de la embrocación del cérvix con la solución de lugol (prueba de Shiller) demostró una positividad débil atigrada o puntuación oscura yodada, que podría ser interpretada erróneamente como del tipo colpitis (fig.1 y 2); la yodonegatividad (áreas claras) completa fue más rara.

La asociación de lesiones condilomatosas con otros rasgos benignos o con lesiones premalignas (fig.8,11,12) se presentan en la Tabla IIa.

En el otros grupo (150 casos) diagnosticados como lesiones no condilomatosas, 33 (22%) mostraron evidencias histológicas de infección con virus Papiloma.

En síntesis, de las 301 pacientes, en 169 casos fue confirmada histológicamente la infección VP, de los cuales, 136 (80%) habían sido previamente identificados por colposcopia como condiloma acuminado o plano.

#### Re-evaluación Histológica en las Subpoblaciones de Embarazadas y no Embarazadas

El grupo total estudiado mostró una alta incidencia de infección con VP; la Tabla III muestra que los efectos citopáticos clásicos (EC-VP) fueron detectados en 164 (64%) de 256 pacientes y en 5 (12%) de los 45 controles. Por otros lado, en el 18% de las 119 displasias y carcinomas se observaron EC-PV en la lesión principal o en áreas adyacentes a ella.

No se hallaron diferencias en la incidencia de EC-PV en la población de embarazadas (55%) y en las no embarazadas (57%) (Tabla III).

Mientras que los signos histopatológicos relacionados con la infección por VHS2 (vesículas intraepiteliales, áreas ulceradas, cuerpos de inclusión, etc.) no fueron observados, los efectos que pueden atribuirse tanto a una como a la otra infección (bi y multinucleación, hiperplasia basal, etc.) fueron detectados corrientemente.

Se registró todo un espectro de efectos citopáticos (Tabla IV), desde la coilocitosis hasta la observación de la totalidad de ellos.

#### Estudios Inmunoviroológicos

##### a) Ensayos de Especificidad de los Inmunsueros:

El suero anti VP mostró especificidad hacia antígenos virales presentes en verrugas (fig. 6) (plantares y planas), pero no mostró reactividad hacia lesiones no verrugosas, piel normal o epitelio cervical normal. Si bien mostró por IP un título superior a 1:250, fue utilizada la dilución 1:100.

El suero anti VHS2 mostró reactividad en células infectadas con VHS2 durante 4 y 24 hs. En las primeras, la positividad fue localizada en el citoplasma y en la membrana citoplasmática, mientras que en las segundas, la reacción fue nuclear y citoplasmática. La positividad desapareció cuando el inmunsuero fue absorbido con suspensión viral. Otros ensayos sobre piel normal, epitelio cervical normal y células no infectadas confirmaron la especificidad del mismo.

El título (por IP) fue de 1:250, pero fue empleado corrientemente en la dilución 1:100.



El suero preinmune mostró reactividad frente a las mismas muestras, por lo cual fue usado como control negativo (dilución 1:100).

#### Localización de los Antígenos Virales..

Los antígenos de VP se demostraron por IP en un número variable de núcleos del epitelio cervical; la positividad fue observada en focos cerca de la superficie epitelial, con una distribución uniforme en las capas superiores o intermedias (fig. 5, 11, 13) .

La positividad de la IP asociada con VHS2 fue nuclear (50%) (fig. 7a, 8 ), o bien nuclear y citoplasmática. A menudo, la reacción positiva se observó en áreas de cromatina agrumada o tenían la apariencia de inclusiones nucleares. En ocasiones, el núcleo positivo revelaba un desplazamiento de la cromatina hacia la periferia, observándose una zona clara central y un engrosamiento de la membrana nuclear (fig. 7b, 13 ). La reactividad citoplasmática localizada cerca de la membrana nuclear se presentaba como un fino granulado de color marrón y forma de media luna (fig. 7b). Las células positivas estaban distribuidas uniformemente o en parches en todos los estratos del epitelio, inclusive en el basal (fig. 8).

La localización de antígenos de VHS2 en las capas medias y superficiales a veces coincidió (en preparados paralelos) en la misma área con la positividad para VP. La atipia coilocitótica, así como otros EC-VP estuvieron asociados con IP positiva para VP pero también para VHS2.

La IP realiza en células exfoliadas del cérvix aportó resultados en general coincidentes aunque en algunos casos, se obtuvieron falsos negativos (citología negativa y biopsia positiva), por lo que se prefirieron las biopsias como material de estudio que aportaba resultados más confiables.

#### Frecuencia de la Detección de Antígenos Virales en el Grupo Estudiado

Los antígenos de VP y de VHS2 fueron detectados más frecuentemente en pacientes con lesiones cervicales que en los controles (34-37% frente a 4-9%) (Tabla V). Además, se observó la concomitancia de antígenos de VHS2 y EC-VP en un total de 79 pacientes (31% del total), aunque sólo se demostró la presencia de ambos antígenos virales en 37 (14%).

La Tabla VI muestra que no hubo diferencia en la detección de antígenos virales asociada con el embarazo.

#### Correlación entre el Diagnóstico Histológico y la Presencia de Antígenos Virales

La frecuencia de antígenos de VP y VHS2 en pacientes con lesiones de distinto grado se muestra en la Tabla VII, demostrando la localización en la lesión principal o en áreas adyacentes con lesiones menos severas.

La fig.10 muestra un perfil de la presencia de antígenos virales detectados por IP en diferentes lesiones cervicales: es evidente que la frecuencia de detección decrece desde la displasia moderada al carcinoma invasor.

## DISCUSION

La colposcopia resultó un método eficaz en la diferenciación de las imágenes debidas a la infección con VP de aquéllas propias de las displasias y carcinomas "in situ"; en particular, la prueba de Shiller tradicional es una ayuda válida, como lo demuestra el alto porcentaje de confirmación del diagnóstico colposcópico por histopatología.

El cérvix de las embarazadas presenta modificaciones vasculares (vasodilatación y edema), cambios deciduales y procesos inflamatorios que dificultan, en general, el diagnóstico colposcópico de las lesiones condilomatosas.

La infección papilomatosa se diagnosticó por la observación de alteraciones citológicas e histológicas (coilocitosis, plegamiento de la membrana nuclear, bi y multinucleación, disqueratosis, acantosis, etc.). Las evidencias de este efecto citopático fueron halladas en el 64% de las pacientes (y el 11% de los controles), pero considerando solamente las lesiones premalignas y malignas, este porcentaje asciende a 78%. Sin embargo, los antígenos de VP fueron descubiertos en el 57% de los condilomas, en el 56% de las displasias y carcinomas "in situ" asociados con lesiones condilomatosas (adyacentes o yuxtapuestas).

Con respecto a los antígenos VHS2, se hallaron en el 37% de las pacientes y en el 9% de los controles. La frecuencia de detección aumentó desde los controles, hasta las displasias leves (fig. 10) y luego decreció con el aumento de la severidad de las lesiones. Sin embargo, en el presente estudio no

se detectaron EC-VHS2, salvo algunos signos que podrían estar también asociados con la infección con VP, por lo que se piensa que se trata de infecciones subclínicas o de infecciones donde hay una expresión incompleta del ciclo viral y los resultados podrían englobar la detección de antígenos totales y tempranos de VHS2; es quizás oportuno destacar que el suero empleado mostró reactividad hacia células infectadas durante las 4 y 24 horas, lo cual podría deberse a que el antígeno inoculado en conejos se preparó a partir de un suspensión viral clarificada, obtenida de células infectadas y lisadas. La absorción del suero con células no infectadas logró eliminar la reactividad hacia proteínas celulares normales, conservando las relacionadas con la infección viral. Sobre la base de los resultados de los ensayos de reactividad del suero, es posible sugerir una especificidad del mismo por proteínas tempranas y totales de VHS2. Estudios posteriores (Capítulo 5), relativos a proteínas tempranas de VHS2 en tejidos cervicales permitirán clarificar este aspecto.

Esta etapa del estudio demostró en las lesiones precancerosas una relación inversa entre la frecuencia de detección de antígenos virales y el grado de severidad de la atipia, lo cual podría estar asociado con una disminución de la capacidad del tejido para expresar tales antígenos (por ej., para antígenos de VP: de 52% en los casos de displasia moderada a 9% en los cánceres invasores; para antígenos de VHS2: de 65% en los casos de displasia leve a 9% de los cánceres invasores). La aneuploidía, característica de tejidos premalignos y malignos

(148) podría afectar dicha expresión. En el caso de VP, algunos factores inherentes a la biología del virus podrían incidir, ya que ha sido demostrado que la expresión de proteínas virales puede disminuir con el tiempo, aún con permanencia de las alteraciones morfológicas inducidas por la infección (162). Por otro lado, la transformación neoplásica produce modificaciones celulares diversas que podrían impedir el ciclo viral completo, ya que se ha establecido que las proteínas de cápside sólo se sintetizan en células con cierto grado de diferenciación. Por último, numerosos estudios de displasias y carcinomas antígeno negativos han demostrado la presencia de ADN de VP. Tal negatividad de antígenos podría ser el resultado de la destrucción de proteínas virales durante las fijaciones y el procesamiento posterior de las biopsias lo que, sumado a la escasa cantidad de partículas virales, podría hacerlas indetectables. Por lo tanto, la frecuencia o falta de positividad de la IP podrían no reflejar realmente la incidencia de la infección papilomatosa, aunque dicha técnica constituye un arma valiosa y accesible para laboratorios hospitalarios.

La demostración de ambas infecciones en una misma biopsia resultó notable, aunque no inesperada; la incidencia de esta doble detección asciende al 14% de las pacientes estudiadas. Pero la frecuencia de las infecciones concomitantes alcanzaron al 30% cuando se investigó la presencia de antígenos de VHS2 en tejidos que mostraban signos histológicos característicos de la infección con VP (EC--VP).

El 70% de las pacientes con lesiones premalignas y malignas tenían menos de años y mostraban una alta incidencia de infecciones virales en el cérvix, lo cual podría estar relacionado con una serie de factores (inicio temprano de relaciones sexuales, promiscuidad, nivel socioeconómico bajo, etc.) que caracterizaron el grupo estudiado.

Se han señalado (en estudios previos) que las recurrencias o reinfecciones herpéticas son más frecuentes en poblaciones con esos caracteres. (66).

Algunas investigaciones han señalado una alta incidencia de infecciones en las embarazadas, quizás favorecidas por un estado inmune especial (54) (41). Pero en la población examinada en este estudio, no se observaron diferencias relacionadas con la gravidez; tanto la presencia de EC-VP como la detección de antígenos virales fue similar o del mismo orden en los subgrupos considerados. Sin embargo, observaciones previas habían señalado una regresión de las lesiones más frecuente en las embarazadas; sólo un seguimiento cuidadoso permitirá establecer si la concomitancia o asociación de ambas infecciones tiene alguna relación con la patogénesis del carcinoma escamoso o con la evolución de las lesiones premalignas del cérvix. Este aspecto será tratado en el Capítulo 7.

TABLA 1: EDAD DE LAS PACIENTES ESTUDIADAS

PATOLOGIA	E M B A R A Z A D A S			N O E M B A R A Z A D A S			T O T A L E S		
	No.PAC.	EDAD	I.R.S.*	No.PAC.	EDAD	I.R.S.	No.PAC.	EDAD	I.R.S.
CONTROLES	29	28±6	19±4	16	36±8	19±3	45	31±8	19±3
NO DISPLASICAS	49	24±6	18±3	56	30±9	19±4	105	29±6	19±4
CONDILOMAS	9	22±4	19-3	12	29±10	21±4	21	26±7	20±4
DISPLASIA LEVE	9	23±5	17-3	11	29±8	19±3	20	26±7	18±3
DISPLASIA MOD.	26	23±6	19±4	7	37±7	19±3	33	28±8	19±4
DISPLASIA SEV.	24	25±5	18-3	7	32±6	18±3	31	26±6	18±3
CAR."IN SITU"	24	27±5	18±2	11	32±6	18±2	35	28±5	18±2
CAR. INVASOR	2	28±7	16±1	9	39±4	17±3	11	37±7	17±3
<u>TOTALES</u>	<u>172</u>			<u>129</u>			<u>301</u>		

\* I.R.S. = Iniciación de las relaciones sexuales

TABLA 2: RELACION ENTRE LAS IMAGENES COLPOSCOPICAS DE CONDILOMA Y LAS EVIDENCIAS

HISTOLOGICAS DEL EFECTO CITOPATICO DE LOS VIRUS PAPILOMA (EC - VP)

C O L P O S C O P I A	H I S T O L O G I A			Total de casos
	I) EC-VP*	II) no EC-VP*		
<u>A) CONDILOMAS</u>				
Leucoplasia, mosaico, puntuación	91	11		102
Manchas blancas	12	1	15	13
Condilomatosis mixta	29	3	(10%)	32
Condilomatosis florida	4	0		4
				151
				(100%)
<u>B) NO CONDILOMATOSO</u>				
Leucoplasia, mosaico, puntuación	21	53		74
ZT con OGC	7	13	117	20
Otras imágenes benignas (ectopía, mucosa originaria, etc)	5	40	(78%)	45
Carcinomas	0	11		11
A) + B) = Todas las imágenes	169	132	(100%)	301
				(100%)

\* Sólo se considera el EC-VP pues los efectos citopáticos de VHS2 nunca fueron histológicamente observados.

\*\* De los 136 condilomas, se observaron aislados en 21 pacientes (14%); estuvieron asociados: con imágenes benignas en 52 (34%); con displasias moderadas en 38 (25%); con displasias y carcinomas "in situ" en 40 (28%).

OGC = orificios glandulares cornificados; ZT = zona de transformación



TABLA III: EVALUACION HISTOLOGICA; EXPRESION DE EFECTOS CITOPATICOS DE VIRUS PAPILOMA  
(EC-VP) EN EL GRUPO DE ESTUDIO

GRUPOS HISTOLOGICOS	P A C I E N T E S			
	EMBARAZADAS	NO EMBARAZADAS	TOTAL	TOTAL
I) <u>LESIONES CON EC-VP</u>				
Controles	3	2	5	
Lesiones no neoplásicas*	19	31	50	164
Condilomas**	9	12	21	(64%)
Displasias con condilomas ##	24	12	36	
Displasias con condilomas ad- yacentes ##	5	0	5	
Displasias con leves sig- nos de EC-VP ##	35	17	52	
II) <u>LESIONES SIN EC-VP</u>				
Controles	16	14	40	
Lesiones no neoplásicas*	30	25	55	92
Displasias ##	19	7	26	(36%)
Cánceres invasores	2	9	11	
I) + II) = Todas las lesiones	172	129	301	(100%)

\* Incluye: metaplasias maduras e inmaduras, cervicitis crónica, etc.

\*\* Condilomas floridos: 4 casos; planos: 17 casos.

## Incluyen carcinomas "in situ".

TABLA IV: EFECTOS DE LA INFECCION CON VIRUS PAPILOMA (EC-VP)

ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS

Diagnóstico Histológico	Todos los signos		Coilocitosis y acantosis		Coilocitosis Disqueratosis y/o binucleación		Coilocitosis unicamente		Total		PATOLOGIA SIN EC-VP	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Control					5/45	11	5/45	11	5/45	11	40/45	89
Neoplásica	3/105	3	32/105	30	4/105	4	11/105	17	50/105	48	55/105	52
Condiloma	12/21	57	5/21	24	4/21	19	-	-	21/21	100	-	-
Displ. leve	3/20	15	-	-	6/20	30	7/20	35	16/20	80	4/20	20
Displ. mod.	14/33	42	-	-	3/33	9	10/33	30	27/33	81	6/33	19
Displ. sev.	14/31	45	-	-	3/31	10	9/31	29	26/31	84	5/31	16
Car. in situ	10/35	29	-	-	6/35	17	8/35	23	24/35	69	11/35	31
Car. invasor											11/11	100

TABLA V: DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOPEROXIDASA (IP)

GRUPOS HISTOLOGICOS	CASOS POSITIVOS POR IP					TOTAL DE CASOS
	VP	VHS2	VP+VHS2	VP	VHS2	
<u>I) LESIONES CON EC-VP</u>						
Controles	1	3	1	1	5	
Lesiones no neoplásicas(*)	13 (25%)	25 (50%)	6 (12%)		50 (100%)	
Condiloma	12 (57%)	8 (38%)	4 (19%)		21 (100%)	
Displasias(**)+condilomas	52 (56%)	43 (46%)	25 (27%)		93 (100%)	
Sub-total	78 (46%)	79 (47%)	36 (21%)		169 (100%)	
<u>II) LESIONES SIN EC-VP</u>						
Controles	1 (3%)	1 (3%)	0 (0%)		40 (100%)	
Lesiones no neoplásicas	9 (16%)	11 (20%)	2 (4%)		55 (100%)	
Displasias (**)	0 (0%)	7 (27%)	0 (0%)		26 (100%)	
Carcinomas invasores	1 (9%)	1 (9%)	0 (0%)		11 (100%)	
Sub-total	11 (8%)	20 (15%)	2 (2%)		132 (100%)	
Controles	2 (4%)	9 (9%)	1 (2%)		45	
I) + II) sin considerar los controles	87 (34%)	95 (37%)	37 (14%)		256	

(\*) Se incluyen metaplasias maduras; (\*\*) se incluyen carcinomas "in situ"

Los casos están agrupados histológicamente sobre la base de la expresión de efectos citopáticos de la infección con virus Papiloma EC-VP y distribuidos en relación con la expresión de antígenos de virus Papiloma (VP) y virus Herpes simplex tipo 2 (VHS2)

TABLA VI: RESULTADOS DE INMUNOPEROXIDASA: EXPRESION DE ANTIGENOS DE VIRUS PAPILOMA (VP) Y

... VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (VHS2) DISTRIBUIDOS EN RELACION CON EL EMBARAZO

EXPRESION DE ANTIGENOS VI- RALES	CONTROLES (*)	LESIONES BENIGNAS, PREMALIGNAS Y MALIGNAS	
		EMBARAZADAS	NO EMBARAZADAS
VP	2 ( 4%)	52 (36%)	35 (31%)
VHS2	4 ( 9%)	53 (37%)	42 (37%)
VHS2 + VP	1 ( 2%)	19 (13%)	18 (16%)
NEGATIVOS	38 (85%)	19 (13%)	18 (16%)
<u>T O T A L</u>	45 (100%)	143 (100%)	113 (100%)

(\*) Pacientes colpóscopica e histológicamente sanas.

TABLA VII: DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS ANTIGENOS DE VIRUS PAPILOMA (VP)

Y VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (VHS2)

ANTIGENOS VIRALES	DISPLASIA MODERADA		DISPLASIA SEVERA		CARCINOMA "IN SITU"		CARCINOMA INVASOR	
	P	A	P	A	P	A	P	A
VP	5	12	5	10	6	7	0	1
VHS2	10	4	10	1	6	6	0	1
<u>TOTAL DE CASOS</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>15</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>0</u>	<u>2</u>
	31		26		25		2	

P: LESION PRINCIPAL

A: EN ZONAS ADYACENTES

FIGURA N° 1

Paciente: I.G.  
Embarazo de 3 meses  
Edad: 17 años

CONDILOMATOSIS FLORIDA  
Vulvo-vagino- cervical

- a) Colposcopía: Condilomatosis florida cervico-vaginal. Leucoplasia-Mosaico tipo Condiloma en labio superior. (Abajo, izquierda).
- b) Lugol + (Shiller-) débil en lesión del labio superior Lugol + (Shiller-) irregular en condiloma del labio inferior. (Abajo, derecha).

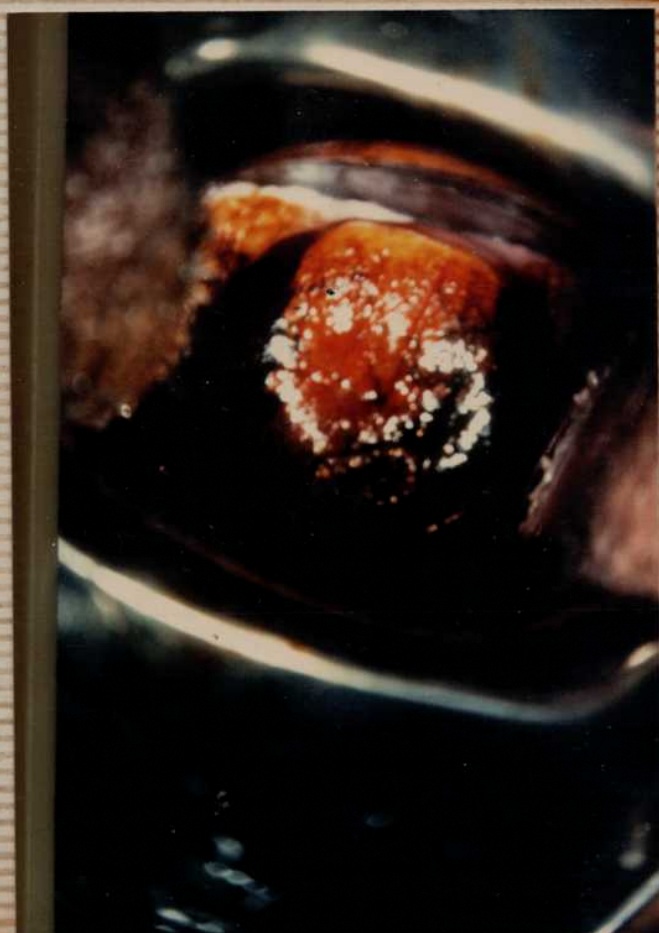
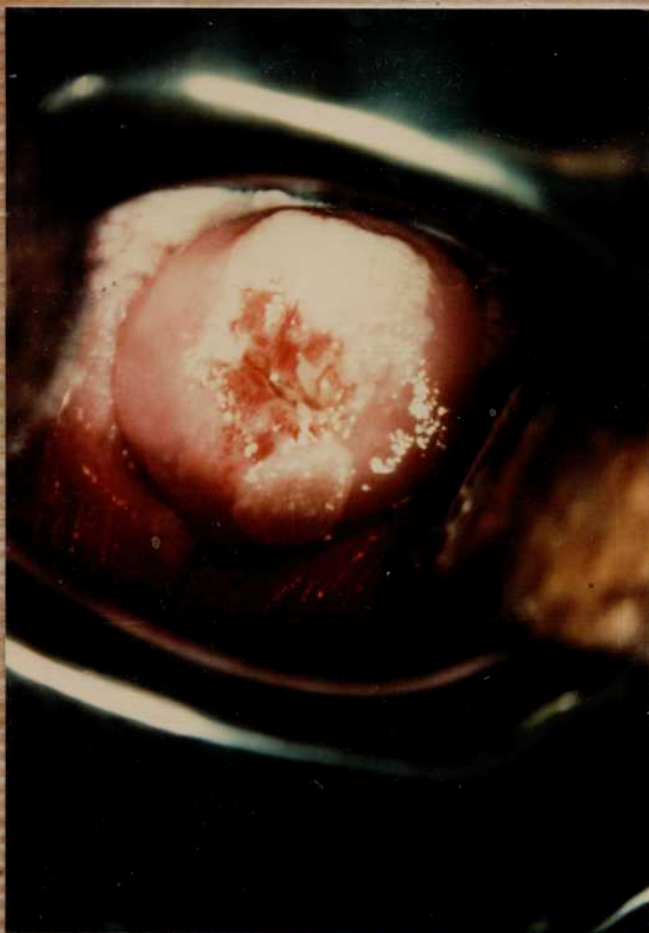




FIGURA N° 2

Paciente: G.B.  
Embarazo de 3 meses.  
Edad: 21 años.

- a) Colposcopía: Orificios glandulares cornificados y manchas blancas tipo Condiloma (Izquierda).
- b) Lugol + débil en los orificios glandulares y positivo en las manchas blancas. (Abajo).

Biopsia: Condiloma plano.

Inmunoperoxidasa: Virus Papiloma positivo. Virus Herpes simplex tipo 2 positivo.



FIGURA N°3

Paciente: R.C.  
Puérpera de 4 meses  
Edad: 22 años

- a) Colposcopía: Imagen típica de Condilomatosis florida. (Acuminado) (Derecha).
- b) Lugol + tipo colpitis sobre el área del condiloma (Shiller - débil). (Abajo).

Biopsia: Condiloma acuminado

Inmunoperoxidasa: Virus Papiloma positivo.





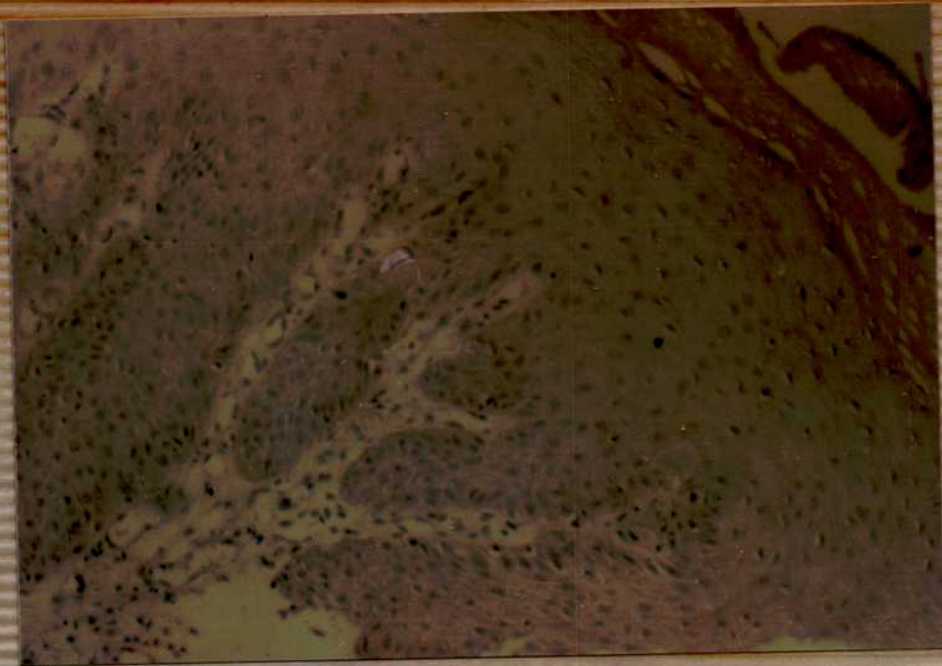


FIGURA N° 4

Condilomatosis acuminada múltiple (vulvo- vagi- no-cervical.). Se observa papilomatosis, acan- tosis, coilocitosis. (Hematoxilina- eosina, au- mento 40 x).-

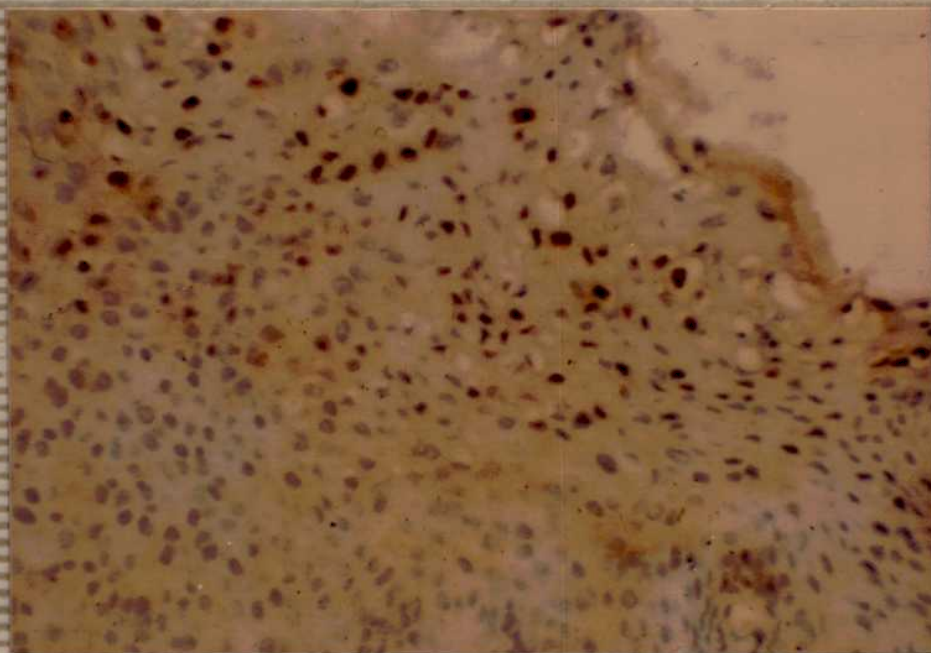


FIGURA N° 5

Detección de antígenos de virus Papiloma en un caso de Condiloma acuminado (Focalizado de la biopsia de la figura 4) (Inmunoperoxidasa- he- matoxilina, aumento 100 x).-

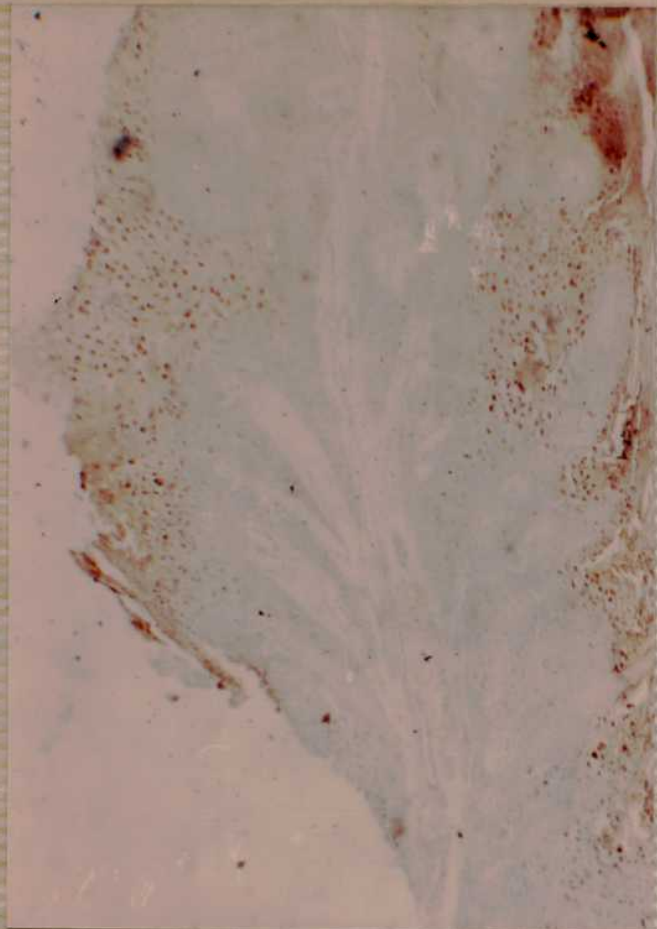


FIGURA N°6 a). (Izquierda).

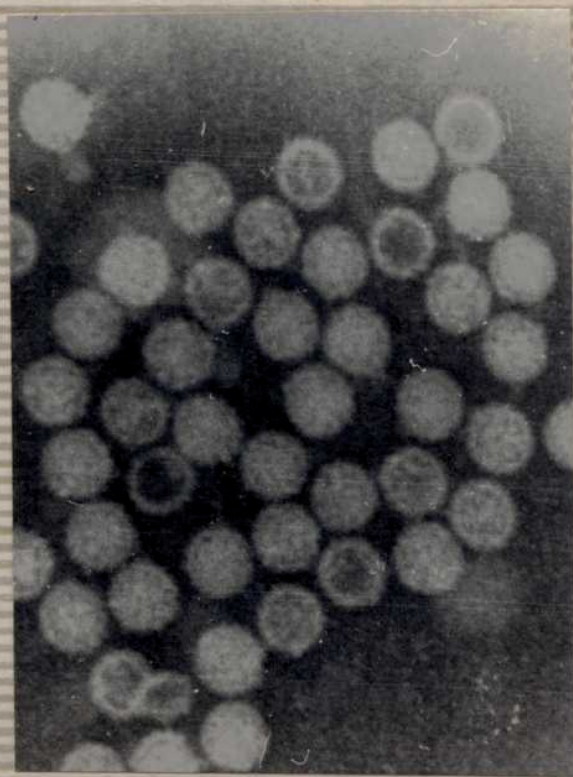
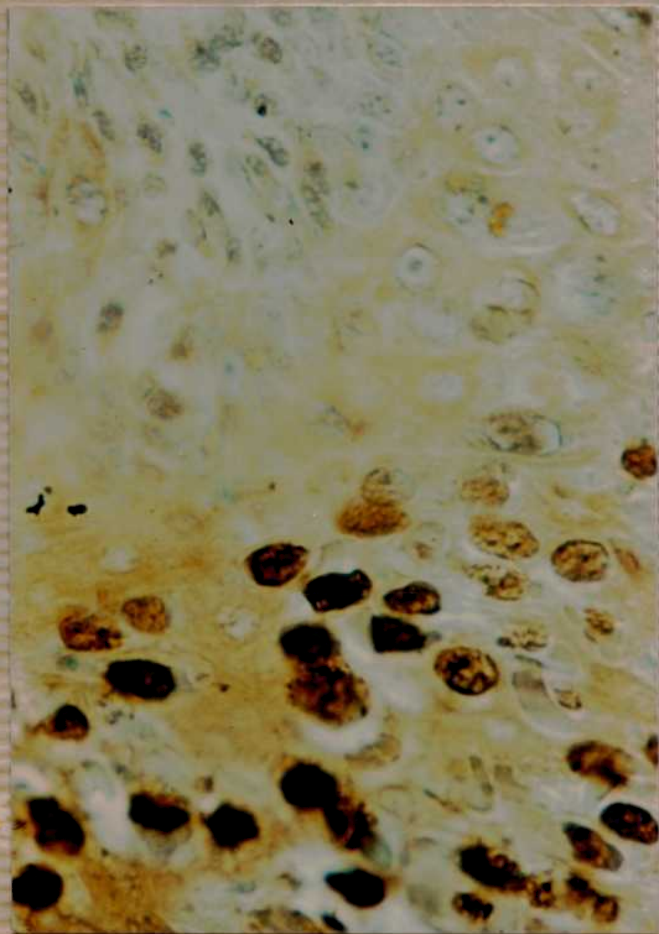
VERRUGA PLANTAR. Control positivo para antígenos de virus Papiloma (Vista General). (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 16 x).-

FIGURA N°6 b). (Abajo, Izquierda)

VERRUGA PLANTAR. Focalización de la figura 6 a). La reacción positiva para antígenos de virus Papiloma, se observa como un precipitado marrón en los núcleos de los estratos medios y superiores del epitelio (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 160 x).-

FIGURA N°6 c). (Abajo, derecha)

Partículas de virus Papiloma bovino, de las cuales se extrajo el antígeno común de género Papiloma, para la preparación del suero aplicado en la técnica inmunoperoxidasa. (Coloración negativa, aumento 160.000 x).-



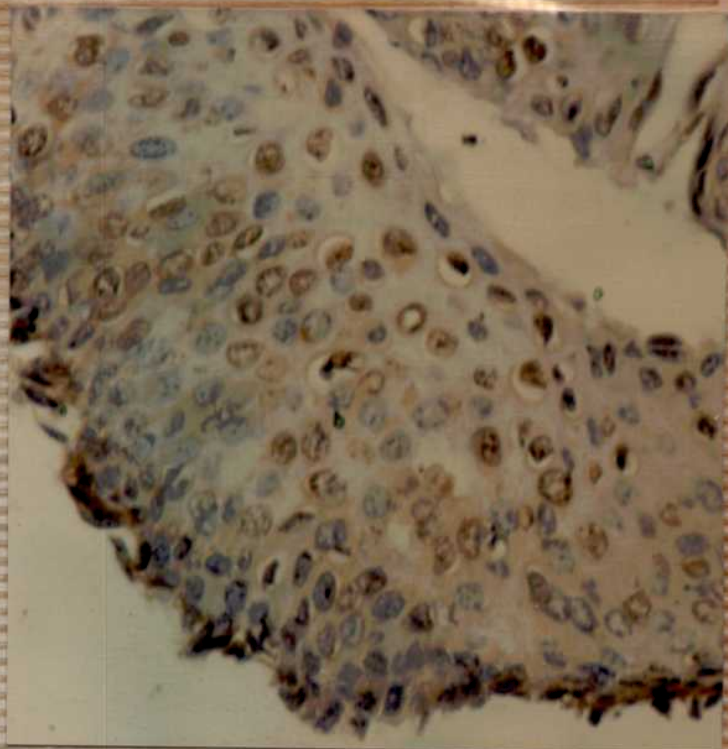
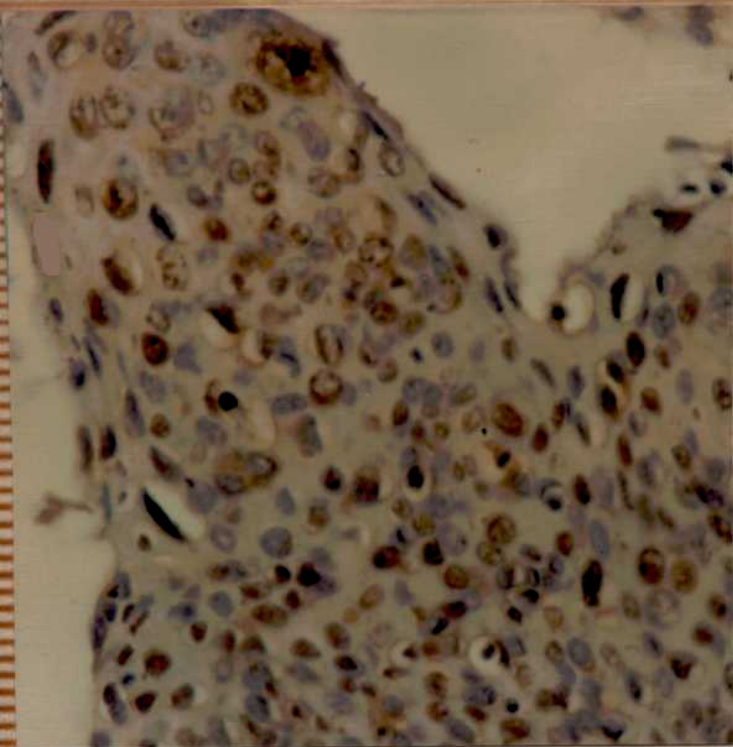


FIGURA 7 a). (Arriba, derecha).

Localización nuclear de antígenos de virus Herpes simplex tipo 2 en un Carcinoma invasor. (Inmunoperoxidasa- hematoxilina, aumento 100x).

FIGURA 7 b). (Izquierda)

Localización nuclear y citoplasmática de antígenos de virus Herpes simplex tipo 2 en una Displasia moderada. (Inmunoperoxidasa- hematoxilina, aumento 160 x).-

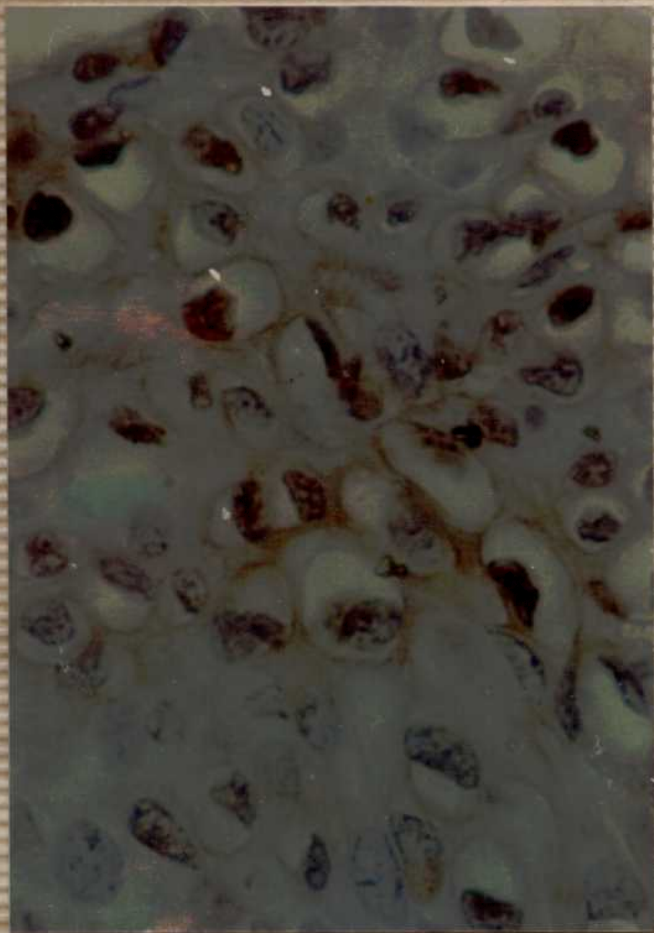


FIGURA N° 7 c) (Arriba, Izquierda)

Positividad para antígenos de virus Herpes simplex tipo 2. Se observan marginación de la cromatina, gránulos intranucleares y koilocitosis (Carcinoma "in situ". (Inmunoperoxidasa- hematoxilina, aumento 100 x).-

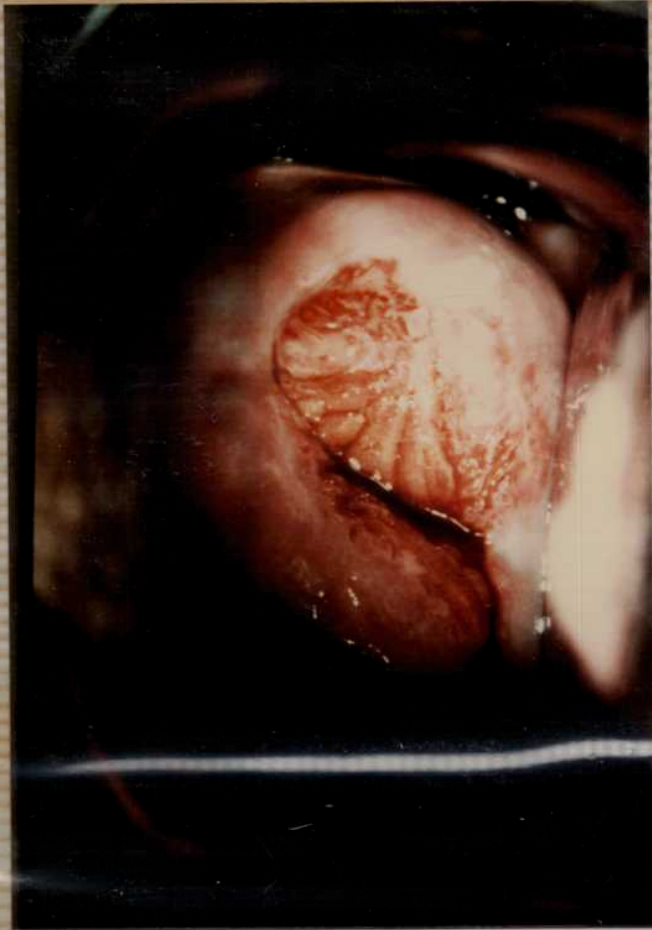


FIGURA N°8 (Izquierda).

Paciente: C.C.  
Puérpera de 4 meses en lactancia.  
Edad: 29 años.

Colposcopía: Imagen de base y Ectopia.-

Biopsia: Carcinoma "in situ" y condiloma asociado.-

FIGURA N°9 (Abajo)

Detección de antígenos de virus Herpes simplex tipo 2 en un carcinoma "in situ" (El mismo caso de la figura 8).-La positividad se observa en todas los extractos del epitelio, aún en las células parabasales. (Inmunoperoxidasa-hematoxilina), aumento 160 x).-

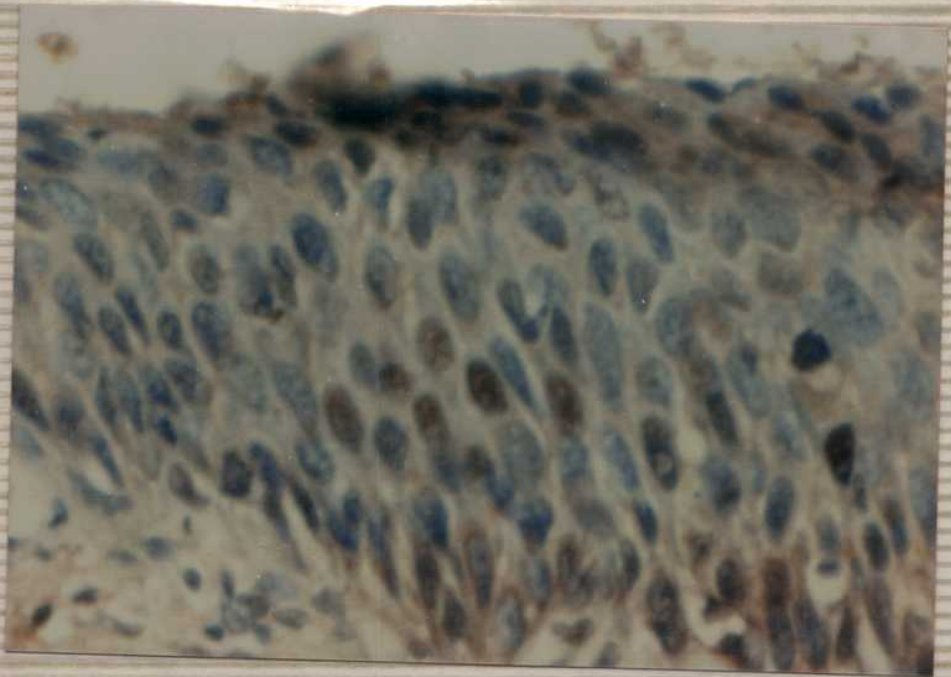




FIGURA 10 a) Epitelio cervical normal (control). (Hematoxilina eosina, aumento 40x).-

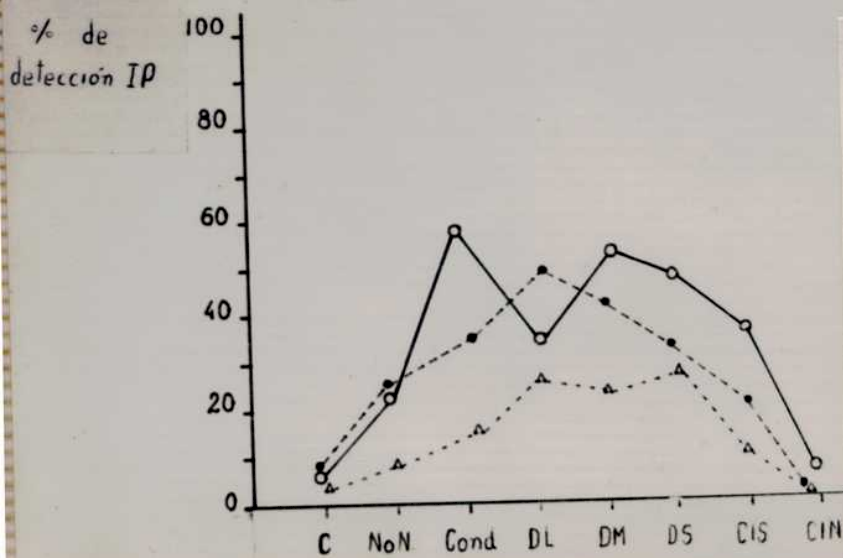


FIGURA 10 b) Frecuencia de detección de antígenos virales por inmunoperoxidasa, en lesiones del cérvix.

Virus Herpes simplex tipo 2 --o--  
 Virus Papiloma ---●---  
 Ambos virus simultáneamente ...△..

C: Control  
 NoN: Lesión no neoplásica  
 DL: Displasia leve.  
 DM: Displasia moderada  
 DS: Displasia severa.  
 CIS: Carcinoma "in situ"  
 CIN: Carcinoma invasor.

FIGURA N° 11

Paciente: S.D.

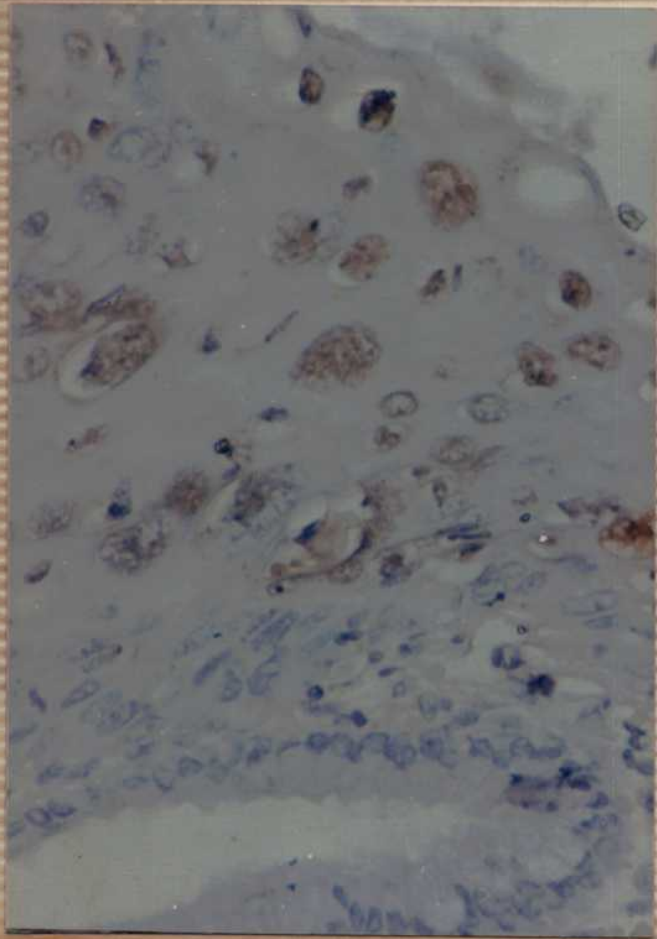
Embarazo de 5 meses

Edad: 18 años

Colposcopía: Leucoplasia tipo condiloma (Arriba).-

Lugol + (Abajo, derecha).

Biopsia: Displasia severa y condiloma invertido atípico.-  
Positividad para antígenos de virus Herpes simplex tipo 2 y virus Papiloma (figura de abajo a la izquierda).- (Inmunoperoxidasa - hematoxilina, aumento 150 x).



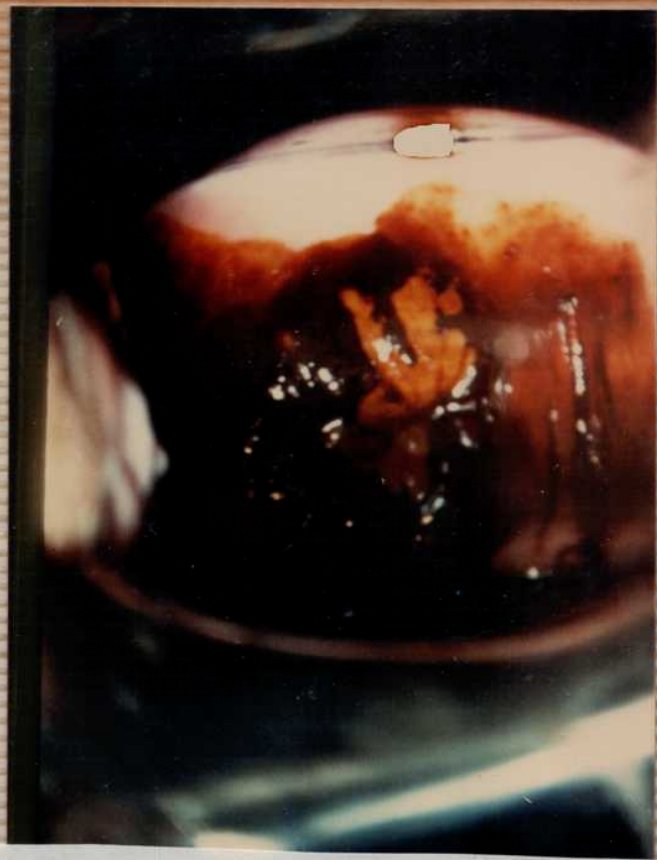


FIGURA N° 12

Paciente: J.M. Embarazo de 3 meses, Edad. 21 años.

Colposcopía: Imagen de leucoplasia y base tipo condiloma (Figura de la izquierda). Lugol + atigrado. (Figura de la derecha).-

Biopsia: Displasia moderada con condiloma asociado.-

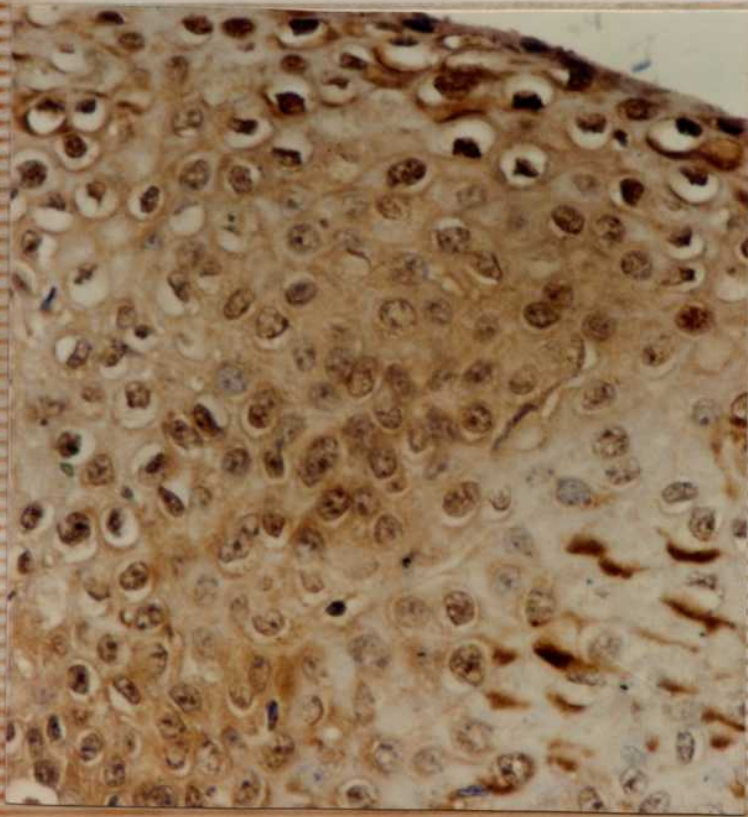


FIGURA N° 13

Displasia Moderada (caso anterior). Se observan células coilocitóticas en las capas superficiales del epitelio y positividad para antígenos de virus Herpes simplex tipo 2. (Inmunoperoxidasa- hematoxilina, aumento 150 x).-

4. INFECCIONES CONCOMITANTES VP-VHS2: ESTUDIO DE LA LOCALIZACION DE LAS PROTEINAS VIRALES EN TEJIDOS CERVICALES INFECTADOS SIMULTANEAMENTE POR AMBOS VIRUS.

INTRODUCCION

En el Capítulo anterior, se examinó la incidencia de las infecciones herpéticas y papilomatosas en un grupo de 256 pacientes con lesiones de cuello uterino, comparándola con otro de 45 mujeres sin alteraciones del cérvix (controles), seleccionadas por exámen colposcópico y citológico.

En esta etapa del estudio, la detección simultánea de ambos virus, efectuada sobre biopsias, empleando la técnica inmunoperoxidasa (IP) en coloraciones paralelas, ascendió al 14% en pacientes y al 2% en controles.

Como se mencionó previamente (pág.64) en algunos casos la comparación de preparaciones de una misma biopsia, incubada con sueros anti VP o con anti VHS2, mostraba las marcaciones positivas en zonas topográficamente similares, indicando la posible existencia de tejidos concomitantemente infectados. Sin embargo, la metodología empleada no permitió distinguir simultáneamente la localización de las respectivas proteínas virales.

La inmunoperoxidasa es la técnica inmunohistoquímica más sensible en la detección de antígenos; los cromógenos empleados habitualmente para revelar la reacción antígeno-anticuerpo viran al marrón (diaminobencidina) o al rojo (etilaminocarbazol), pero tienen el inconveniente de que ambos son sustratos para la misma enzima (peroxidasa), lo cual los inhabilita pa-



ra ser empleados simultáneamente en la detección de dos clases de antígenos.

La observación y detección simultánea es posible por la inmunofluorescencia doble, empleando inmunosueros marcados con sustancias fluorescentes, con rangos de excitación y emisión distintos, como por ej., el isotiocianato de rodamina (excitación 575, emisión 595) y el isotiocianato de fluoresceína (excitación 495, emisión 520). El filtro S 525 selecciona las longitudes de onda, en las que la fluoresceína se observa con tonalidades verdes y la rodamina, naranja rojiza.

Con el objeto de observar simultáneamente la positividad para VP y VHS2 en las infecciones concomitantes del cérvix, se aplicó la técnica inmunofluorescencia indirecta doble rodamina/fluoresceína (IFID) en biopsias, para lo cual se utilizaron dos inmunosueros (anti VP en conejo y anti VHS2 en cobayo) empleándose respectivamente como segundos inmunosueros antigamma globulina de conejo (preparada en cerdo), marcada con isotiocianato de fluoresceína y antigamma globulina de cobayo (preparada en oveja), marcada con isotiocianato de rodamina.

#### Materiales y Métodos

Se seleccionaron las biopsias sobre la base de los resultados de detección de antígenos virales por inmunoperoxidasa: 40 casos con positividad para ambos virus y con diagnóstico de: condilomas, 8; lesiones no displásicas, 5; displasia leve, 8; displasia moderada, 8; displasia severa, 8; carcinoma "in situ", 3. Como controles se seleccionaron: 1) 9 casos nega-

tivos para ambos virus y diagnósticos de: condiloma, 2; lesión no neoplásica, 2; displasia leve, 2; displasia moderada, 2; displasia severa, 1; II) 10 casos positivos para VHS2 y diagnósticos de: condiloma, 2; lesión no neoplásica, 3; displasia leve, 1; displasia moderada, 2; displasia severa, 1; carcinoma "in situ", 1; III) 10 casos positivos para VP y diagnósticos de: condiloma, 2; lesión no neoplásica, 3; displasia moderada, 2; displasia severa, 2.

Se efectuaron cortes seriados de 5  $\mu$ m a partir de los mismos bloques histológicos examinados anteriormente por la técnica IP.

#### Inmunosueros

1) Suero anti VP: se utilizó una dilución 1/30 del mismo que fue preparado para estudios inmunoenzimáticos (pág.58).

2) Suero anti VHS2: se inocularon cobayos con suspensión viral clarificada por centrifugación (pág.152) (103 DICT50: 0,5 ml) por vía subcutánea y 0,5 ml por vía intraperitoneal. A los 7 días, se repitió la inoculación y a los 25 días se sangró por punción cardíaca. El inmunosuero obtenido fue absorbido y su especificidad fue demostrada en ensayos de reactividad descriptos previamente (pág.59). La dilución empleada fue 1/30.

3) Sueros control negativos de conejo y cobayo: previo a la inmunización, se sangraron los animales, obteniéndose sueros sin reactividad frente a ambos virus (pág.60) (dilución 1/30).

4) Antigamma globulina G de conejo: (preparada en cerdo

marcada con isotiocianato de fluoresceína (Instituto Pasteur).  
Dilución empleada 1/100.

5) Antigamma globulina G de cobayo: (preparada en oveja) (Sigma) fue marcada con isotiocianato de rodamina (Sigma) (relación de 0,016 mg de rodamina por mg de proteína) (163). A las globulinas diluídas al 3% en solución de fosfato de Na 0,1 M pH 10, se agregó la rodamina durante un período de 4 horas, dejándose en agitación durante un total de 21 hs a 25°C. Se ajustó el pH a 7,2 con hidróxido de sodio IM. Se diálizó a 4°C durante 4 días frente a fosfato de sodio 0,01 M, ClNa 0,15, pH 7,2, efectuándose dos cambios diarios, en el último de los cuales se agregó Dowex 2-X4, a fin de absorber el colorante no conjugado y acelerar la diálisis. Se evaluó la calidad del conjugado frente a células Hep-2 infectadas con VHS2 y células normales (control negativo), fijadas en acetona fría durante 20 min. a -20°C. (Anexo 13, Pág.152).-

Se efectuaron diluciones seriadas del antisuero marcado y se ensayaron mediante inmunofluorescencia indirecta, estableciéndose la dilución 1:50 como la más adecuada.

#### Inmunofluorescencia (IF)

1) Biopsias: se desparafinaron por tres pasajes en xilol, 10 minutos cada vez. Luego se hidrataron por pasajes en alcohol etílico de graduación decreciente (96°, 80°, 70°, 60°, 30°), 3 pasajes por agua destilada y pasaje por tampón de IF (fosfato de Na 0,5 M, ClNa 0,15 M; pH 7,7).

Células fijadas: se lavaron con agua destilada y luego con tampón de IF.

2) A fin de saturar los sitios de unión inespecíficos presentes en los tejidos a colorear, las biopsias y células fijadas fueron tratadas durante 10 minutos con una mezcla de partes iguales de suero normal de cobayo y suspensión normal de conejo.

3) Las muestras se lavaron con tampón de IF y se incubaron con una mezcla de diluciones de antisuero anti VP y anti VHS2, en cámara húmeda durante 24 hs a 35°C.

4) Luego se lavaron dos veces durante 30 min con tampón de IF y una vez con agua destilada.

5) Se incubaron durante 30 min a 37°C con una mezcla de ambos conjugados, cuyas diluciones finales fueron para las marcadas con fluoresceína 1:100 y con rodamina 1:50.

6) Las muestras se lavaron como se mencionó en el punto 4 y se efectuó una coloración de contraste con azul de Evans (2 ‰) durante 5 min., lavándose con agua destilada. En el montaje, se utilizó glicerina al 10% en tampón de IF.

Como control negativo de la coloración, se procesaron simultáneamente muestras en las cuales se reemplazó el primer inmunosuero por una mezcla de sueros preinmunes de cobayo y conejo (dilución final de cada uno de ellos 1:30), continuándose con los pasos 4 - 6.

## RESULTADOS

### 1. Detección de Antígenos por Inmunofluorescencia

En etapas previas, se ensayaron incubaciones a 4 y 35°C, resultando la segunda temperatura más adecuada para la obtención

de marcaciones más intensas; para evitar inespecificidades derivadas de la evaporación del inmunosuero sobre la biopsia, se recurrió a incubar con volúmenes mayores que los usados habitualmente.

Sobre un total de 40 casos positivos VP + VHS2 (por IP), se observó fluorescencia específica de 18 (70%), resultando el resto negativos para alguno de los dos virus o para ambos (Tabla 1). Similarmente, sobre 10 biopsias control VP positivas y 10 VHS2 positivas, fueron confirmados los resultados en 5 (50%) y 7 (70%) casos, respectivamente.

TABLA 1: DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA  
INDIRECTA DOBLE RODAMINA/FLUORESCINA (IFID)

Muestras	No. casos	VP+	VHS2+	VP + VHS2
VP+(control)	10	5 (50%)	-	-
VHS2+(control)	10		7 (70%)	
VP-VHS2-(control)	9		-	-
VP+VHS2+	40	3 (7,5%)	9 (22,5%)	28 (70%)
Total	69	8	16	28

VP+ = positivo para virus Papiloma

VHS2+ = positivo para virus Herpes simplex tipo 2

VP-VHS2 + negativo para ambos virus

VP+VHS2+ = positivo para ambos virus

## 2. Localización de los Antígenos Virales

La localización a nivel celular de los antígenos virales de VP y VHS2 fue similar a la observada por IP, es decir, nuclear y/o citoplásmica para el segundo (fig. 2 y 3). En los

FIGURA N°1 (Arriba)

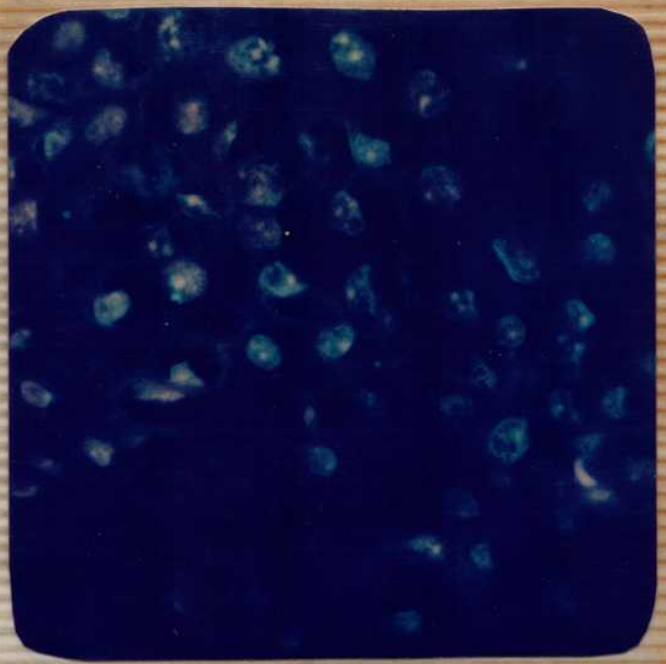
Localización de antígenos de virus Papiloma. Positividad nuclear típica. (Condiloma Plano)(Inmunofluorescencia doble rodamina/fluoresceína, aumento 150 x).

FIGURA N°2 (Abajo,derecha)

Localización nuclear y citoplasmática (débil) de antígenos de virus Herpes simplex tipo 2 en una displasia severa. (Inmunofluorescencia doble rodamina/fluoresceína, aumento 100 x).

FIGURA N°3 (Abajo, izquierda).

Positividad con localización nuclear de antígenos de virus Herpes simplex tipo 2 en una metaplasia escamosa. (Inmunofluorescencia doble rodamina/fluoresceína, aumento 160 x).-



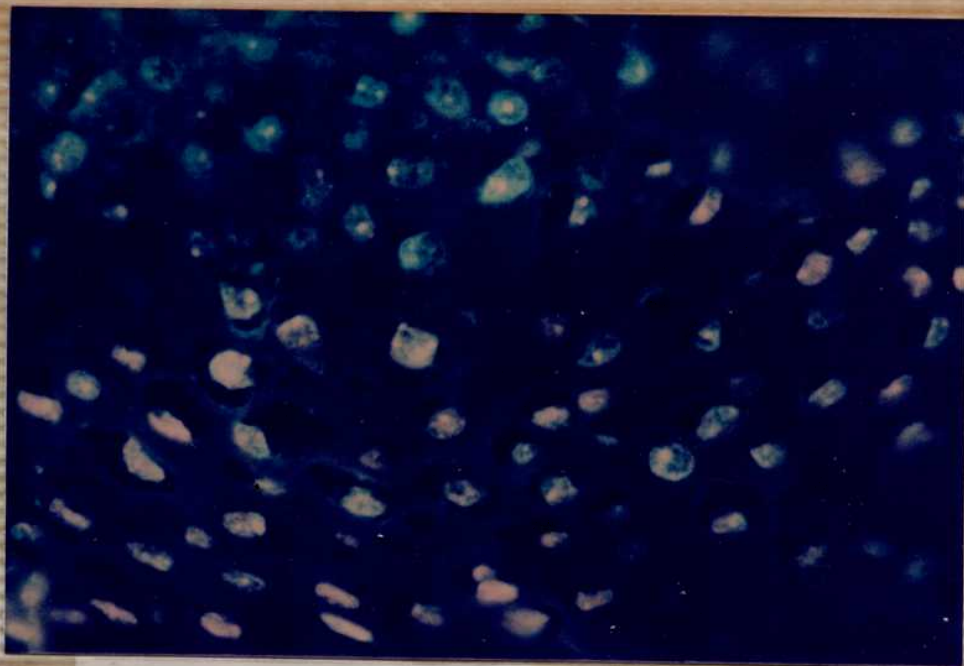


FIGURA N° 4

Inmunofluorescencia positiva para virus Papiloma (verde) y para virus Herpes simplex (amarillo). Las positividades se observan en áreas adyacentes, mostrando cierto grado de yuxtaposición (Aumento 150 x).

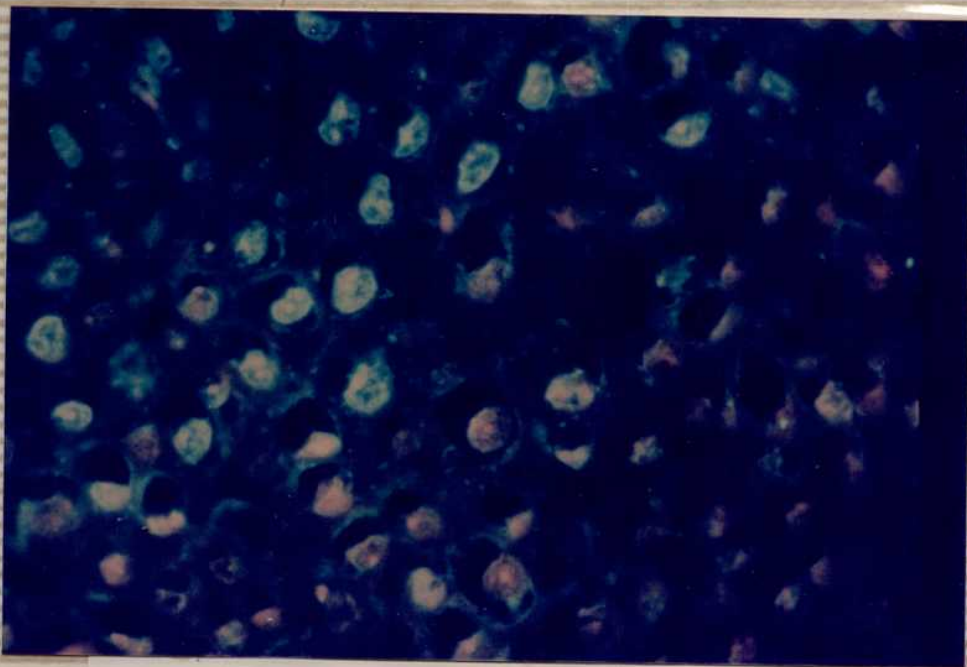


FIGURA N° 5

Localización de antígenos de virus Papiloma (coloración verde) y virus Herpes simplex (gránulos intranucleares amarillos). Infecciones yuxtapuestas. (Inmunofluorescencia doble rodamina/fluoresceína, aumento 150 x).

controles VP positivos, apareció ocasionalmente un halo verdoso citoplasmático que no pudo ser eliminado por absorción del inmunosuero con lisado de piel bovina (Anexo, pág.151). aunque esta inespecificidad no afectó la observación de las preparaciones.

Las imágenes microscópicas más frecuentes en los controles VHS2 fueron las granulaciones nucleares y el halo perinuclear amarillo-rojizos.

En las infecciones asociadas de ambos virus (28 casos) pudieron distinguirse 4 tipos de localizaciones:

a) Ambas positivities se hallaron en áreas diferentes del epitelio cervical, por lo general bien delimitadas y vecinas o no, aunque sin relación entre sí: (4/28) 11%. (fig. 1 y 2).

b) En la misma área y en forma de mosaico, con células que presentaban una u otra marcación específica: (10/28) 36% (fig. 3).

c) En la misma área con núcleos de coloración amarillo-verdosos, revelando la presencia en la misma células de antígenos asociados a ambos virus: (11/28) 39% (fig. 4 y 5).

d) En la misma área, con positividad nuclear para VP y citoplasmática para VHS2: (3/28) 11%.

En la Tabla 2 se han resumido los resultados que relacionan los diagnósticos histopatológicos con la distribución de las proteínas virales en los tejidos cervicales estudiados.

Las localizaciones b y c se observaron con mayor frecuencia y en porcentajes similares. La primera (b) fue más frecuente



en las lesiones benignas o en displasia leve y la segunda (c) en las de mayor severidad.

TABLA 2: RELACION ENTRE EL TIPO DE LOCALIZACION Y EL GRADO DE LA LESION

PATOLOGIA	LOCALIZACIONES				Total
	(a)	(b)	(c)	(d)	
Condiloma	1	3	-	-	4
No neoplásica	1	2	1	-	4
Displasia leve		4	2	1	7
Disp. mod.	-	1	5	1	7
Disl. sev.	1		2	1	4
Carcinoma "in situ" 1			1		2
Total	4 (11%)	10 (36%)	11 (39%)	3 (11%)	28 (100%)
		86%			

#### 4.3.

#### Discusión

La metodología empleada permitió identificar simultáneamente la localización de las proteínas asociadas con los virus en estudios, aunque los resultados sugieren una menor sensibilidad de la IFID en relación con la IP para detectar bajos niveles de proteínas virales. Por un lado, fue necesario utilizar más alta concentración de sueros y por otro, comparando los resultados por IP, tanto los controles positivos para uno u otro antígeno, como las muestras en estudio confirmaron la positividad en 57% de los casos, lo cual implicaría una limitación en el empleo de dicha metodología.

En el grupo estudiado, las infecciones yuxtapuestas constituyen el 86% de los casos examinados e incluyen los tipos de localización b), c) y d) mencionados. Los del grupo b), que presentan la imagen de pequeños focos, podrían representar una primera etapa de la yuxtaposición de ambas infecciones.

En la localización c), ambos antígenos aparecen exclusivamente en el núcleo, lo cual podría significar en el caso de VHS2, un bloqueo de la expresión de las etapas tardías de tal replicación, tal vez relacionado con las modificaciones celulares debidas a la presencia de VP.

Considerando la posibilidad de una transición de b) a c), se observaron mayores frecuencias de tipo b) en las lesiones benignas o de menor grado de severidad y el tipo c) en las más severas.

El seguimiento de las pacientes (que será analizado posteriormente en el Capítulo 7), ha mostrado una regresión de las lesiones y desaparición de los antígenos de VP y VHS2 en los tres casos de localización d), en tanto que el tipo c) demostró persistencia viral por largos períodos o progresión de las lesiones.

El VP ha sido señalado como promotor por su capacidad de inducir la proliferación celular, habiéndose postulado su interacción con iniciadores (157); dicho rol (iniciador) podría ser atribuido al VHS2, por sus propiedades mutagénicas (93); las infecciones herpéticas recurrentes de tejidos afectados por VP podrían aumentar el riesgo de aparición de clones celulares malignos.

EXPRESION DE PROTEINAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES DE VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (VHS2) EN LESIONES DEL CUELLO UTERINO: SU RELACION CON LA INFECCION CON VIRUS PAPILOMA (VP)

En el Capítulo 3, se señaló que el inmunosuero anti VHS2 empleado en la demostración de antígenos virales en biopsias de cuello uterino presentaba reactividad por inmunoperoxidasa (IP) para células Hep-2 infectadas durante 4 ó 24 hs. Por lo tanto, las frecuencia de antígenos de VHS2 halladas podrían corresponder a la detección de proteínas totales (tempranas y tardías) del virus. Con el objeto de evaluar la presencia de proteínas tempranas, se efectuó un estudio sobre la expresión de los polipéptidos ICP 11/12 (pág.20) en lesiones del cérvix, investigando, además, una posible relación con la infección con VP.

Los polipéptidos ICP 11/12 son del tipo beta, no estructurales, con capacidad para ligarse con el ADN, propiedad en la cual ha sido basada su purificación por cromatografía en columna de ADN-celulosa. De los 15-20 polipéptidos ICP que pueden purificarse por este método, son los que presentan mayor afinidad por el ADN desnaturalizado de la columna, por lo que pueden obtenerse con un alto grado de pureza (164) (165) (166) (167). Además, parecen participar en la síntesis del ADN viral.

El antisuero ICP 11/12 fue utilizado por el Dr. G. Dressman (76) y otros (169) para investigar informes virales en biopsias de neoplasia intraepitelial, demostrando positividad en el 38% de las displasias y carcinomas.

## 5.1. Pacientes, Materiales y Métodos

Se estudiaron un total de 249 pacientes, considerándose dos grupos: aquéllas que presentaban lesiones benignas (LB): 147 casos (incluyendo 13 pacientes con condilomas y 134 con lesiones no neoplásicas, tales como metaplasias maduras e inmaduras cervicitis crónica, etc.); el segundo grupo con lesiones premalignas y malignas (LPM): 102 pacientes (displasia leve, 13 casos; displasia moderada, 20 casos; displasia severa, 28 casos; carcinoma "in situ", 33 casos; carcinoma invasor, 8 casos).

El 28% del subgrupo LB y el 50% del LPM eran pacientes que presentaban positividad para antígenos de VHS2 por inmunoperoxidasa. El diagnóstico de la infección por VP se realizó por evaluación del efecto citopático característico (EC-VP) (18), en cortes histológicos.

### Detección de Antígenos Virales por Inmunoperoxidasa

#### a) Inmunosueros

Anti VHS2: fue preparado en conejos, por inoculación de suspensión viral clarificada obtenida a partir de células RK 13 (riñón de conejo) infectadas y lisadas. El inmunosuero fue absorbido con células RK 13 no infectadas para eliminar posibles inespecificidades derivadas de la respuesta hacia proteínas celulares. Su especificidad fue demostrada en estudios previos (Anexo 11pág.153).

Anti ICP 11/12: el inmunosuero, cedido gentilmente por el Dr. Kenneth Powell, fue obtenido en conejos en la Universidad de Leeds (Anexo 14 pág. 160) (165) (166).

Anti VP: el inmunosuero con especificidad hacia proteínas estructurales comunes de género Papiloma, fue preparado en conejos por inoculación de partículas virales disociadas por calentamiento y tratamiento con 2 mercaptoetanol (pág. 58). Su especificidad fue demostrada previamente (Anexo 8 pág. 150).

Suero control negativo: obtenido por sangrado de los conejos previo a la inoculación de antígenos virales (pág. 60).

b) Técnica Inmunoperoxidasa (IP): de las 249 pacientes se obtuvieron y procesaron 530 biopsias (a algunas pacientes, se les efectuó en el mismo momento más de una toma de biopsia) según la metodología previamente descripta. (Anexo 12 pág. 154).

## RESULTADOS

### A) Localización de los Antígenos Totales y Tempranos de VHS2 por IP

Se observaron tres clases de localizaciones: nuclear (N), citoplasmática (C) y nuclear-citoplasmática (N+C). En la primera sólo se observaron núcleos coloreados, generalmente en focos, localizados en todo el espesor del epitelio (fig. 1).

La positividad C se caracterizó por la presencia de una granulación fina por debajo y rodeando al núcleo; las células positivas formaban focos o estaban distribuidas uniformemente en todo el epitelio, abarcando las capas medias y superiores del mismo (fig. 2).

La positividad mixta N+C también fue observada en los estratos medios y superiores del epitelio (fig. 3). En general,

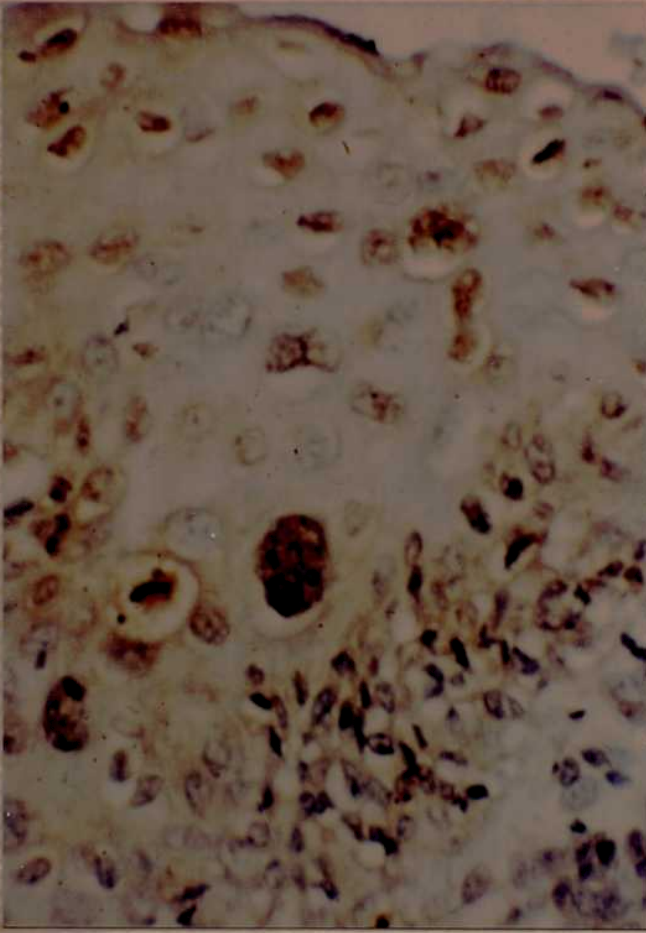


FIGURA N°1 (Arriba,derecha)

Localización nuclear de las proteínas ICP 11/12. (Displasia severa). (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 160 x).-

FIGURA N°2 (Abajo, izquierda).

Localización citoplasmática de la positividad para las proteínas ICP 11/12 (Metaplasia escamosa). (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 100 x).-

FIGURA N°3 (Abajo,derecha)

Se observan células coilocitóticas con positividad citoplasmática y nuclear para proteínas ICP 11/12 (Displasia severa).- (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 100 x).-

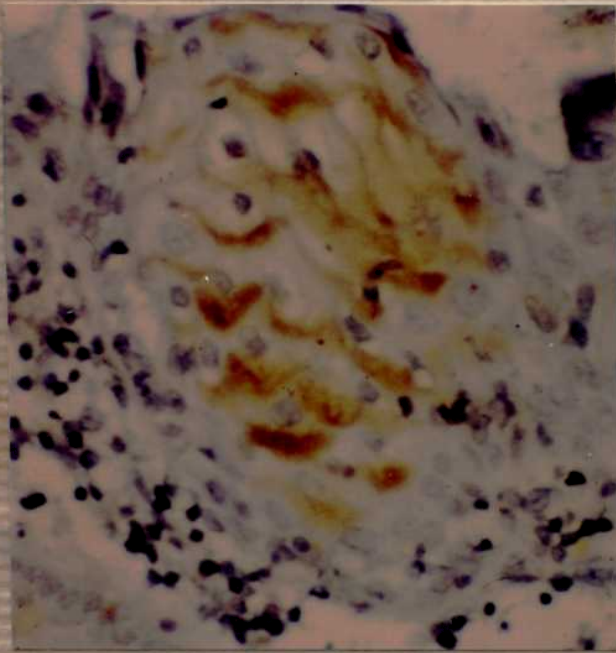


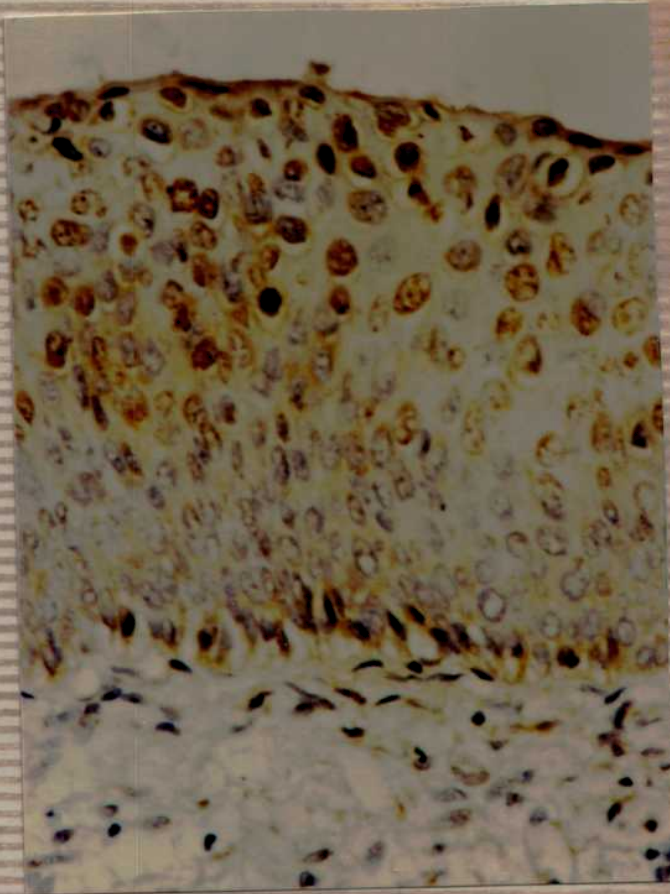
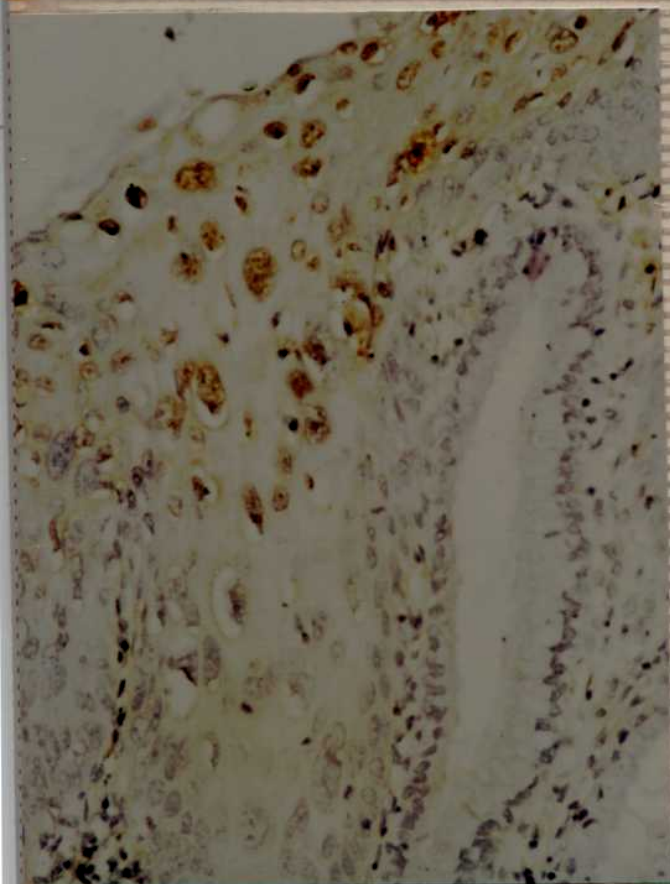
FIGURA N°4

Localización nuclear y citoplasmática de antígenos de virus Herpes simplex tipo 2.-

- a) (Arriba).- Displasia severa metaplasia escamosa, se observa papilomatosis, acantosis y koilocitosis (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 40x.
- b) (Abajo-derecha). Carcinoma "in situ". Se observa positividad en todas las capas del epitelio aún en células parabasales. (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 100 x).

FIGURA N°5 (Abajo, izquierda).

Localización nuclear de antígenos de virus Herpes simplex tipo 2. (Displasia severa) (Inmunoperoxidasa-hematoxilina, aumento 63 x).-



el suero anti VHS2 dió reacciones coloreadas más intensas que el anti ICP 11/12 (fig. 4 y 5).

En la Tabla I, se presentan los resultados sobre localización y positividad en relación con los inmunosueros empleados. La localización N fue mas frecuentemente observada con el anti VHS2, en tanto que la C y N+C los fueron para el anti ICP 11/12.

Sobre un total de 92 pacientes seleccionadas por su positividad para VHS2, 65 (71%) resultaron también positivos para antígenos tempranos de VHS2 (Tabla II).

De las 157 biopsias seleccionadas por su negatividad frente al suero anti VHS2, 50 (32%) resultaron positivas frente al suero anti ICP 11/12 (Tabla II).

Dentro del grupo VHS2 positivo, aproximadamente en el 50% de los casos, la positividad se observó en el núcleo y citoplasma y en el 25% de los casos, en el citoplasma solamente. (Tabla III).

#### B) Comparación de las Frecuencias de Detección de Antígenos Totales y Tempranos

Es necesario señalar que las frecuencias observadas no representan la población inicialmente estudiada, ya que hubo selecciones sobre la base de la positividad para antígenos de VHS2 y se incorporaron nuevos casos.

La Figura 4 permite comparar los porcentajes de detección viral con los sueros mencionados. No se observan diferencias entre el grupo LB y LPM en el porcentaje total de proteínas tempranas (44% para el grupo LB y 50% para el LPM),



pero si se observan diferencias en la frecuencia de detección de antígenos totales y cuando se compara la positividad obtenida con ambos sueros (19% para LB y 36% para LPM).

C) Presencia de Antígenos Tempranos de VHS2 y VP en Relación con EC-VP

De 74 biopsias con EC-VP del grupo LB (147 pacientes) sólo 29 (39%) expresan el antígeno de VP.

De 57 biopsias con EC-VP del grupo LPM, 17 casos (30%) demostraron presencia de antígenos de VP (Figura 5a).

La fig. 5b muestra que la concomitancia de ICP 11/12 y EC-VP es del 31% (45/147) en el grupo LB y de 32% en el grupo LPM. La misma figura muestra que en la mayoría de los casos ICP 11/12 positivos (70%): se detectaron signos de EC-VP.

DISCUSION

Los resultados confirman las presunciones previas referidas al reconocimiento del suero ANTI VHS2 de proteínas tempranas ya que el 71% de las biopsias seleccionadas por su positividad para VHS2 por inmunoperoxidasa reaccionaron con el suero anti ICP 11/12.

En el presente estudio se observaron proteínas tempranas de VHS2 en ambos grupos de pacientes (LB y LPM) con porcentajes levemente superiores en el grupo LPM (63% frente a 55%), pero la diferencia se acentúa cuando se tiene en cuenta la positividad simultánea obtenida con ambos sueros anti VHS2 y anti ICP 11/12 (36% en LPM y 19% en LB).

La localización de ICP 11/12 fue nuclear (15%), citoplas-

ca (37%) y nuclear-citoplasmática (48%). La primera podría representar infecciones iniciales pues el suero anti ICP 11/12 ha mostrado una reacción típicamente nuclear frente a células infectadas y fijadas (77). La localización citoplasmática podría asociarse con transformación ya que la misma ha sido observada en células transformadas "in vitro" por el virus inactivado (77) y en el 42-89% de los carcinomas cervicales y vulvares (77) (78) (170). La presencia de proteínas tempranas en el núcleo-citoplasma podría ser el producto de una interacción virus-célula modificada por la infección concomitante con VP. En el grupo estudiado, la expresión de proteínas tempranas en cualquiera de sus localizaciones podría estar relacionada con la concomitancia de infecciones (VHS2-VP) ya que el 70% de las biopsias positivas para proteínas tempranas se han demostrado en tejidos con EC-VP.

La detección de antígenos de VP en tejidos con EC-VP ha sido del 39% en el grupo LB y del 30% en el grupo LPM.

Como se mencionó anteriormente (Capítulo 3) en los procesos neoplásicos, la desdiferenciación celular afectaría la permisibilidad a la infección, ya que los VP necesitan cierto grado de diferenciación para expresar las etapas tardías de su ciclo de replicación. Por otro lado, modelos experimentales (Papiloma Shope) y naturales en humanos (epidermodisplasia verruciforme) han señalado que la conversión maligna va acompañada de la desaparición de partículas virales. El bajo porcentaje de antígenos de VP en LPM (39%) confirma los resultados presentados en el Capítulo 3, es decir, disminución de la expresión de antígenos

genos virales en las lesiones más severas. Pero el bajo nivel de expresión de antígenos en el grupo LB no puede explicarse con las mismas razones. A la luz de los presentes resultados, podrían sugerirse otras posibilidades alternativas, en especial ante la ocurrencia de una infección herpética concomitante. La presencia simultánea de ambos virus podría afectar los ciclos de replicación de los mismos en el caso de los VHS2, limitando la expresión de proteínas, ya que el 71% correspondió a proteínas tempranas. En el caso de VP, sólo puede señalarse la disminución de los porcentajes de detección de proteínas estructurales; luego, ambos virus muestran limitaciones en la síntesis de proteínas estructurales.

Los distintos momentos en los cuales podría comenzar esta interacción daría como resultado un espectro de respuestas, cuya expresión podrían ser las distintas localizaciones de proteínas estructurales de VP. Además podría implicar una continua expresión de funciones virales tempranas de ambos virus, las cuales han sido relacionadas con eventos de carcinogénesis (136b)(171)(172).

Algunos ensayos "in vitro" han demostrado que las células Raji persistentemente infectadas con VHS2 expresan ICP 11/12 (173); estas proteínas han sido demostradas en este estudio y en otros (174) (76) en biopsias y células descamadas del cérvix, lo cual podría sugerir una persistencia viral en el epitelio cervical normal o atípico. Las infecciones crónicas han sido propuestas como importantes en el desarrollo de la neoplasias intraepitelial (60), por lo que resulta de interés evaluar si tal persistencia constituye un factor de riesgo de las lesiones.

TABLA I: LOCALIZACION DE LOS POLIPEPTIDOS ICP11/12 (TEMPRA-  
NOS Y TOTALES DE VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (VHS2)  
EN CONTROLES, LESIONES BENIGNAS (LB), PREMALIGNAS  
Y MALIGNAS DEL CERVIX

Suero	Controles + LB			Total
	Localización	LB	LP	
Anti VHS2	N	29 (71%)	29 (57%)	58 (63%)
	C	2 ( 5%)	1 ( 2%)	3 ( 3%)
	<u>N+C</u>	<u>10 (24%)</u>	<u>2 ( 4%)</u>	<u>31 (34%)</u>
	Total	41 (100%)	51 (100%)	92 (100%)
Anti ICP 11/12	N	11 (17%)	6 (12%)	17 (15%)
	C	26 (40%)	17 (34%)	43 (37%)
	<u>N+C</u>	<u>28 (43%)</u>	<u>27 (54%)</u>	<u>55 (48%)</u>
	Total	65 (100%)	50 (100%)	115 (100%)

Localización: N = Nuclear; C = citoplasmática; N+C = nuclear y citoplasmática.

LB = Lesiones benignas (metaplasia -madura e inmadura- cervicitis crónica, etc).

LPM= Lesiones premalignas (displasia leve, moderada y severa; carcinoma "in situ" e invasor).

TABLA II: COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS ANTI VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (ANTI VHS2) (TOTAL) Y EL ANTI PROTEINAS TEMPRANAS DE VHS2 (ANTI ICP 11/12

BIOPSIAS	RESULTADOS DE IP	LB	LPM	TOTAL
VHS2+	ICP 11/12+	28 (68%)	37 (72%)	65 (71%)
	ICP 11/12 -	13	14	27
	Sub-total	41 (100%)	51 (100%)	91 (100%)
VHS2-	ICP 11/12+	37 (35%)	13 (25%)	50 (32%)
	ICP 11/12-	69	38	107
	Sub-total	106 (100%)	51 (100%)	157 (100%)
<u>T O T A L</u>		147	102	249

LB = lesiones benignas (condilomas, metaplasias, cervicitis crónica, etc.)  
 LPM = lesiones premalignas (displasia leve, moderada, severa, carcinoma "in situ" e invasor).  
 IP = Inmunoperoxidasa.

TABLA III: COMPARACION DE LAS LOCALIZACIONES DE LOS ANTIGENOS VIRALES OBTENIDOS POR INMUNO-  
CON LOS SUEROS ANTI VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (VHS2) Y ANTI PROTEINAS TEMPRAS  
NAS ICP 11/12 EN LESIONES BENIGNAS (LB) Y PREMALIGNAS Y MALIGNAS (LPM) DE CUELLO

UTERINO

Lesio- nes	I) 2) 1) 2) 1) 2) 1) 2) 1) 2) 1) 2)		N+C → N+C		N → N		N+C → N		N → C		C → C		N+C → C		Total
	N+C	N	N+C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
LB	6	8	6	6	-	5	2	1	2	1	2	1	2	28 (100%)	
	└──────────┘					└──────────┘								(50%)	
LPM	13	10	2	2	3	7	-	2	1	2	-	2	2	37 (100%)	
	└──────────┘					└──────────┘								(62%)	
Total	19	18	8	8	3	12	2	3	3	2	3	3	3	65 (100%)	
	└──────────┘					└──────────┘								(57%)	

LB = lesiones benignas (condilomas, metaplasias, cervicitis crónica, etc.)

LPM = lesiones premalignas y malignas (displasias y carcinomas).

1) y 2) = localización de la positividad observada con 1) el suero anti VHS2 y 2) el anti ICP 11/12

N = nuclear; C = citoplásmatica; N+C = nuclear y citoplásmatica.

TABLA IV: DETECCION DE ANTIGENOS DE VIRUS HERPES SIMPLEX FN DISTINTAS

LESIONES DE CUELLO UTERINO

LESIONES	EC-VP	VHS2	ICP 11/12	POSITIVOS CON NEGATIVOS CON		No. TOTAL
				AMBOS SUEROS	AMBOS SUEROS	
No neoplási- cas	65	37	59	27	65	134 (100%)
Condilomas	9	4	6	4	1	13
Sub-total LB	74 (50%)	41 (28%)	65 (44%)	<u>28 (19%)</u>	69 (47%)	147 (100%)
Displasia leve	11	6	6	4	5	13
Displasia moderada	18	12	14	11	5	20
Displasia severa	16	16	19	7	13	28
Carcinoma "in situ"	11	12	14	11	17	33
Carcinoma invasor	1	2	2	0	6	8
	57 (56%)	51 (50%)	50 (49%)	<u>37 (36%)</u>	38 (37%)	100 (100%)
LB + LPM	131 (53%)	92 (37%)	115 (46%)	64 (26%)	109 (44%)	249 (100%)

EC-VP + Efecto citopático de virus Papiloma

VHS2 = antígenos totales de virus Herpes simplex tipo 2

ICP 11/12 = proteínas tempranas de virus Herpes simplex tipo 2

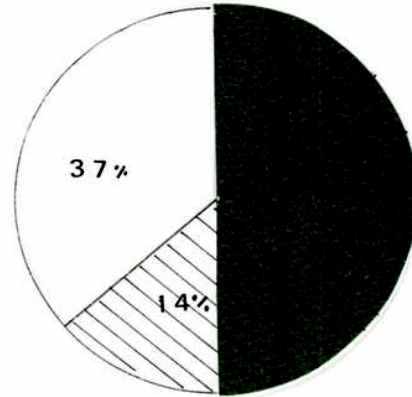
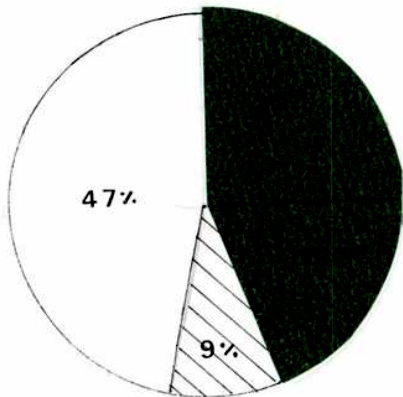
LB = Lesiones benignas; LPM = lesiones premalignas y malignas

FIGURA 4

Comparación de las frecuencias de detección de antígenos totales y tempranos de virus Herpes simplex tipo 2 en lesiones de cuello uterino.

LB (147 pacientes)

LPM (102 pacientes)



VHS2



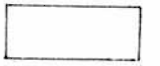
ICP 11/12



VHS2 + ICP 11/12



Negativos



- VHS2 Virus Herpes simplex tipo 2 (antígenos totales)
- ICP 11/12 Proteínas tempranas de VHS2
- LB Lesiones benignas (condilomas, metaplasias, cervicitis crónicas).-
- LPM Lesiones premalignas y malignas (displasias y carcinomas).



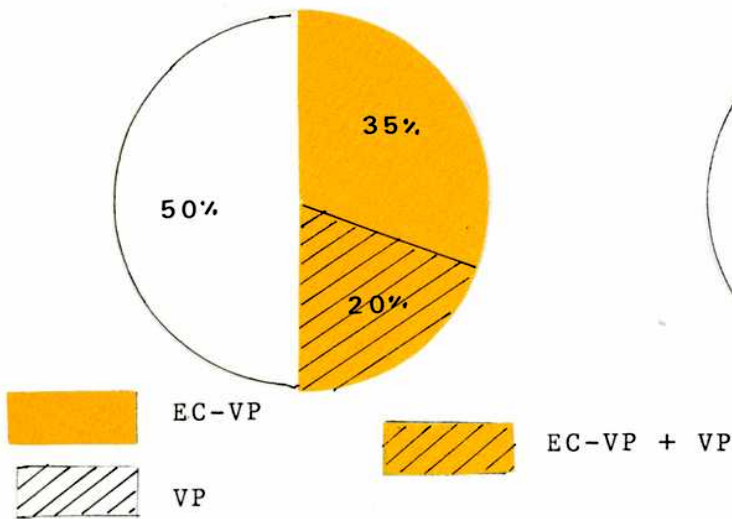
Figura 5

Detección de antígenos de virus Papiloma y proteínas tempranas de virus Herpes simplex tipo 2 en relación con la presencia de EC - VP.

a)

LB (147 pacientes)

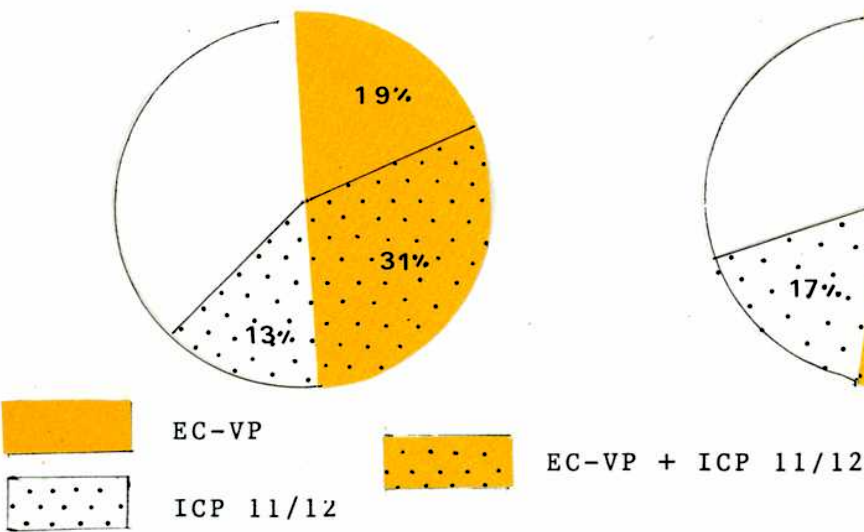
LPM (102 pacientes)



b)

LB (147 pacientes)

LPM (102 pacientes)



ICP 11/12

Proteína temprana de virus Herpes simplex tipo 2.

EC-VP

Efecto citopático de virus Papiloma (VP).

LB

Lesiones benignas (condilomas, metaplasias, cervicitis crónica etc.)

LPM

Lesiones premalignas y malignas (Displasias y carcinomas.)

6. DISTINTOS TIPOS DE VIRUS PAPILOMA (VP) EN LESIONES DEL CERVIX

INTRODUCCION

Estudios citológicos, histológicos e inmunohistoquímicos han revelado una relación de los VP con la neoplasia intraepitelial; el empleo de técnicas de clonado de ADN viral e hibridación molecular han demostrado la presencia de siete tipos distintos de VP en las lesiones del cérvix uterino: VP 6, VP 11, VP 16, VP 18, VP 31, VP 33 y VP 35. Los primeros se han hallado predominantemente en condilomas y displasias leves (176) (177) mientras que los VP 16 y VP 18 se hallaron más frecuentemente en cánceres invasivos (36-49% y 22-48%, respectivamente).

Los VP 33 y 35 se detectaron recientemente en menor proporción en displasias y carcinomas invasores de cuello y vulva (4-8%) (176) (177).

En las clásicas verrugas, la producción viral depende del grado de diferenciación del tejido infectado y los viriones se detectan en los núcleos de las capas superficiales en células que presentan la atipia coilocitótica. En las lesiones premalignas, la expresión de funciones virales, la detección de antígenos virales y la maduración son menos frecuentes, aunque se ha demostrado la presencia de genoma viral por técnicas de extracción de ADN e identificación por hibridación molecular sobre filtros. Estas tecnologías no permiten identificar los núcleos celulares que contienen el ADN viral,

para lo cual se aplica hibridación "in situ".

Los métodos clásicos de hibridación "in situ" emplean sondas preparadas con polinucleótidos radioactivos combinando la especificidad con altísima sensibilidad. A pesar de ello, estos procedimientos presentan algunos inconvenientes asociados con la radioactividad: largos tiempos de incubación (sustancias tritiadas), corta vida media de los radioisótopos (en el caso de marcaciones con fósforo radioactivo), fondo inespecífico, alto costo e infraestructura adecuada. Alternativamente, se emplean otros métodos que aprovechan la interacción específica entre la biotina y la streptavidina y se preparan sondas de hibridación a partir de los nucleótidos precursores biotinilados. Los híbridos formados se ponen en evidencia por inmunohistoquímica (178).

El precursor, deoxiuridina trifosfato puede presentar en la posición del carbono 5 del anillo de pirimidina una cadena ligante de 4, 11 ó 16 carbonos, que unen a la biotina; la longitud de dicha cadena influye en la capacidad de la biotina para interactuar con la streptavidina o con un antisuero anti-biotina; así, por ej. el de 4 átomos no permite que la streptavidina se una en forma directa con la biotina y es necesario el empleo de antisueros anti-biotina para poner en evidencia los híbridos; en cambio, la que presenta 11 ó 16 átomos reacciona eficientemente en forma directa con la streptavidina y el inmunosuero anti biotina, por lo cual son los desoxinu-

xinucleótidos biotinilados más empleados.

La hibridación "in situ" con sondas biotiniladas puede ser aplicada en la detección de ADN de VP en biopsias fijadas y embebidas en parafina, con la ventaja de la preservación de los detalles celulares y la arquitectura del tejido.

En el presente estudio, se ha aplicado la técnica hibridación "in situ" en su variante colorimétrica, sobre biopsias fijadas y embebidas en parafina, con el objeto de detectar secuencias de ADN de VP en diversas lesiones del cuello uterino; las hibridaciones se llevaron a cabo en condiciones estrictas ( $17^{\circ}\text{C}$  por debajo de la temperatura de fusión del ADN viral -  $T_m$ ) a fin de identificar los VP 6, VP 11, VP 16 y VP 18, pero paralelamente se efectuaron ensayos en condiciones no estrictas ( $42^{\circ}\text{C}$  por debajo de  $T_m$ ) empleando en la mezcla reaccional los VP 6-11 ó VP 16-18 combinados, con el objeto de verificar la posible presencia de otros tipos virales distintos (aunque relacionados) de los cuatro mencionados. En todos los casos, se trató de comparar los resultados obtenidos por esta metodología con las observaciones histológicas e inmunohistoquímicas (detección de antígenos virales).

#### I. Pacientes, Materiales y Métodos

Se estudiaron un total de 112 mujeres con diversas lesiones de cérvix, incluyendo: controles normales, 4; lesiones no neoplásicas (cervicitis crónica, metaplasia madura e inmadura), 12; condiloma (plano), 19; displasia leve, 19; displasia moderada, 14; displasia severa, 24; carcinoma "in situ", 23; carcinoma invasor, 7. En la Tabla 1, se muestran

las edades promedio para cada tipo de lesión.

A todas las pacientes se les efectuó un estudio ginecológico completo (citología, colposcopia con biopsia dirigida).

Las biopsias fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a una hora (según el tamaño del fragmento) y luego embebidas en parafina como es habitual (Anexo, pág. 140). A partir de la misma muestra, se prepararon secciones de 5  $\mu$ m para los estudios histológicos, inmunohistoquímicos y de hibridación "in situ".

Un total de 250 biopsias (correspondientes a 112 pacientes) fueron re-evaluadas de acuerdo con el criterio morfológico aceptado para la infección con VP (10)(18); en las mismas, se determinó la presencia de antígenos de VP por inmunoperoxidasa (Anexo, pág.152).

II. Hibridación "in situ" (Anexo 17, pág. 175).

Preparación de sondas de ADN viral biotiniladas: los ADN de los VP tipos 6, 11, 16 y 18 clonados en plásmidos PBR 322 fueron cedidos gentilmente por el Dr. Harald zur Hausen del Centro de Referencia de virus Papiloma de Heidelberg (Alemania Occidental); los mismos se transfectaron en bacterias Escherichia coli cepa HB 101 (Anexo, pág.164). Los plásmidos -ADN VP fueron extraídos de las bacterias y se realizó el marcado de los mismos y del vector PBR 322 solo (a fin de emplearlo en las hibridaciones como sonda control negativo). Para el

biotinilado, se siguieron las especificaciones fijadas para el uso del equipo empleado (Kit Nick Translation, Bethesda Res. Lab.) usando como precursor marcado desoxiuridina trifosfato 11 biotina (Bethesda Res. Lab.) 2,5  $\mu$ l / ml. Para determinar la eficiencia de la reacción, se colocaron 20  $\mu$ l de cada ADN viral biotinilado sobre filtros de nitrocelulosa (Millipore 0,2  $\mu$ ), se secaron a 70-80°C y luego se lavaron dos veces a 4°C con SSC 2x, 3% de albúmina bovina, intercalando el secado a 80°C; luego del segundo lavado, se dejaron los filtros secar al aire y seguidamente, se los incubó a 37°C durante 30 min. con el complejo streptavidina-peroxidasa (Bethesda Res. Lab.) diluído 1/300. Se lavó dos veces con SSC 2x, dejando secar al aire. Se reveló con diamina-nobencina (DAB) (Sigma) complejada con níquel y peróxido de hidrógeno (DAB: 0,05%, cloruro de níquel 0,7  $\mu$ g/ml, peróxido de hidrógeno 0,01%); la reacción fue detenida por lavado con agua destilada. Como control negativo, se prepararon filtros con ADN de esperma de salmón (Sigma) sin biotinilar y se trataron como fue descrito. La intensidad de la coloración obtenida luego del revelado demostró la eficiencia de la marcación; por otro lado, el ADN de salmón no presentó coloración por esta técnica.

Hibridación: el método fue llevado a cabo como fue descrito anteriormente (177) con algunas modificaciones: las secciones fueron desparafinadas por pasajes por xilol y etanol; la

actividad peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno 10% en etanol. Las secciones se rehidrataron y trataron secuencialmente con pronasa B (Calbiochem Behring Corp.) (1 mg/ml) y ARNsa pancreática (Sigma) (100 µg/ml); ambas enzimas se diluyeron en tris ClH 0,05, pH 7,6; EDTA 5 mM, intercalando un lavado con tampón glicinado (fosfato monosódico 0,5 M, fosfato bisódico 0,5 M; ClNa 0,15 M; glicina 0,25 M). Las muestras se postfijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 min, lavando dos veces con tampón glicinado y luego con tampón solo. Se deshidrataron y secaron al aire.

Las mezclas de hibridación (preparadas para cada tipo de VP) contenían ADN viral biotinilado (4 µg/ml), sulfato de dextrán 10%; SSC 2x (cloruro de sodio 3 M, citrato de sodio 0,3 M); ADN de esperma de salmón (Sigma tipo 8) (100 µg/ml) y formamida desionizada en dos concentraciones distintas; para hibridaciones a 37°C en condiciones no estrictas fue al 10% (Tm -42°C) para condiciones estrictas al 50% (Tm -17°C).

Para las hibridaciones en condiciones no estrictas, se emplearon las mezclas de ADN virales: VP 6-VP 11 y VP 16-VP 18, para detectar secuencias virales relacionadas a los correspondientes VP. Se distribuyó 15 µl de la mezcla de hibridación sobre las secciones, cubriéndolas con cubreobjetos siliconados sin sellar. La sonda y las secciones se desnaturalizaron juntas por calentamiento en baño de agua a 90°C durante 6 min y luego se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 18 hs. Los cubreobjetos se retiraron por inmersión en la solución SSC 2x, albúmina bovina 3% y los cortes se lavaron

secuencialmente con SSC 2x -albúmina bovina 3%; tris ClH 0,05 M, pH 7,6, albúmina bovina 3%. Los híbridos se visualizaron por reacción inmunohistoquímica; las secciones se incubaron con el complejo PAP (streptavidina-peroxidasa) (dilución 1:300) durante 30 min a 37°C. Luego, se lavaron con tampón de fosfato-tritón 0,1% y con tris ClH 0,05 M, pH 7,6. Se agregó el sustrato de la enzima DAB (preparado como se indica en la Sección "preparación de la sonda biotilizada"), se incubó 5-10 min y se lavó con agua destilada. Se fijó con agua osmificada, repitiéndose los lavados. Como coloración de contraste, se empleó hematoxilina débil, luego de lo cual las secciones se deshidrataron y montaron como es habitual.

### Resultados

#### 1) Frecuencia de ADN de VP en la Población Estudiada

En las 112 pacientes, el análisis de las biopsias por hibridación "in situ" en condiciones estrictas (E) reveló la presencia de VP en el 61% del grupo de estudio (Tabla 2), correspondiendo el 12% al VP 6; el 12% al VP 11; el 6% al VP 16; el 12% al VP 18. En el resto, la positividad fue obtenida en condiciones no estrictas detectándose secuencias nucleotídicas virales relacionadas con los VP 6 y 11 en el 13% de las muestras y con los VP 16 y 18 en el 11%. La sumatoria de las frecuencias para cada tipo viral supera el 6% mencionado y es porque en algunas de las muestras se encontró más de un tipo viral, p. ej. en condilomas, 3 casos mostraron respectivamente positividad simultánea (CE) para los



tipos 6 y 11; 11 y 18; 16 y 18. En un carcinoma invasor, se detectaron los tipos 6 y 18 (CE) y en otro, el VP 18 (CE) y secuencias relacionadas con los VP 6 y 11 (condiciones no estrictas, en áreas distintas). En relación con las edades, no se observó una asociación de un determinado tipo viral con la edad o rango de edades de las pacientes.

## 2) Localización de los ADN Virales

En las hibridaciones, se observó una reacción coloreada intensa y uniforme, asociada con los VP 6 y 11, estando la positividad localizada principalmente en los núcleos de los estratos medios y superiores, muy semejante a la observada en la detección de antígenos virales (fig. 1 y 2). En la detección de los VP 16 y 18, la reacción positiva fue menos intensa, situada con frecuencia en casi todo el espesor del epitelio (aunque no se observaron en todos los núcleos coloreados) y mostrando estar asociados con mayor grado de atipia nuclear.

## 3) Frecuencia de los Distintos VP en las Lesiones Consideradas

En la Tabla 2, se exponen los resultados en distintas lesiones cervicales; en la fig. 4, se graficaron las frecuencias de los VP 6, 11, 16 y 18 en las patologías benignas, premalignas y malignas. En las lesiones benignas y displasias leve y moderada, se observa un predominio de los tipo 6 y 11 o los relacionados con ellos. En la displasia severa y carcinoma "in situ" e invasor, hay una mayor incidencia de los VP 16 y 18 y los relacionados con ellos.

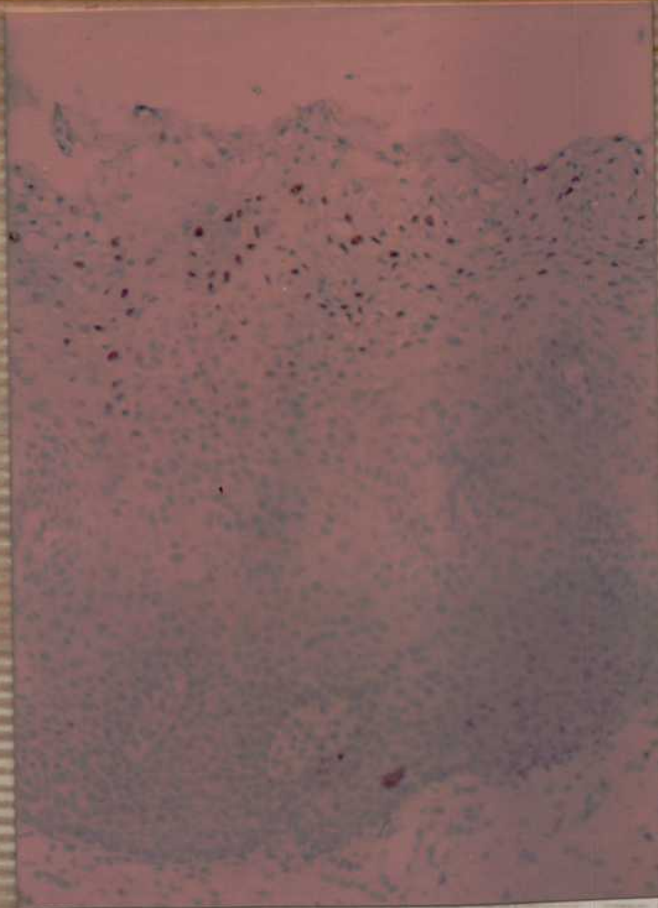


FIGURA N°1 Detección de ADN de virus Papiloma tipo 6 en una Displasia moderada. (Hidridación "in situ" con sonda biotinilada, hematoxilina, aumento 40 x).

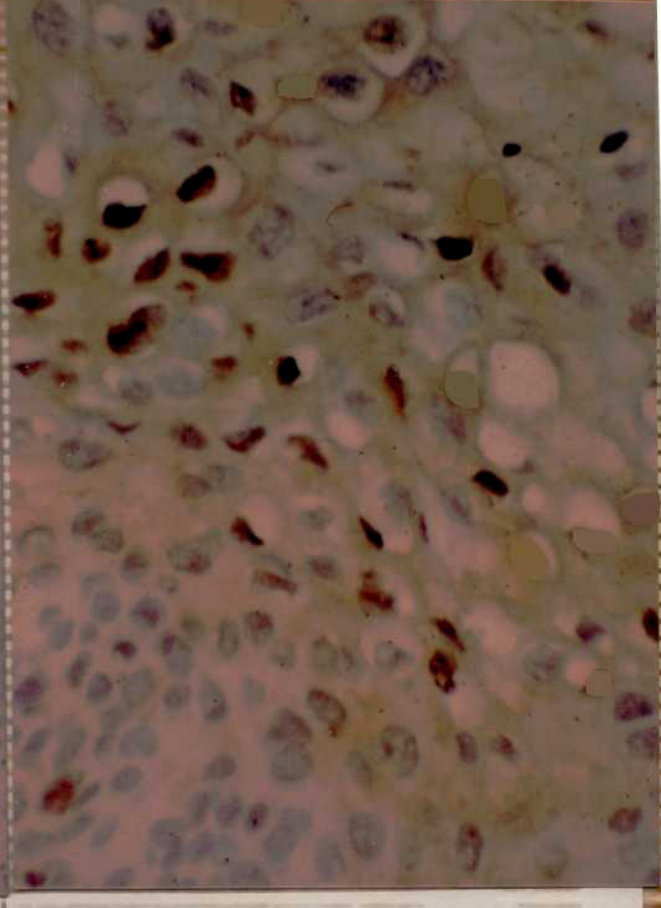


FIGURA N°2 Localización de ADN de virus Papiloma tipo 6, foco de la figura anterior (Aumento 160 x).

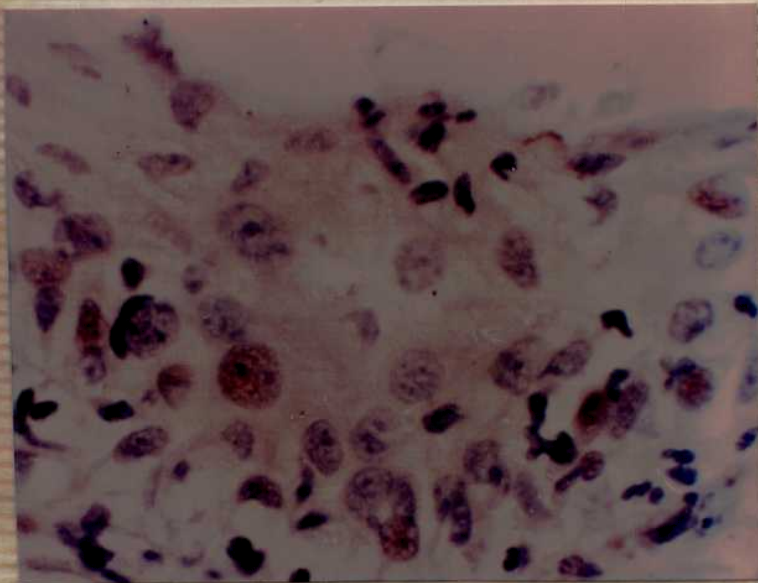


FIGURA N°3  
Demostración de ADN de virus Papiloma tipo 11 en una metaplasia escamosa (Hidridación "in situ" con sonda biotinilada, hematoxilina, aumento 160 x).-

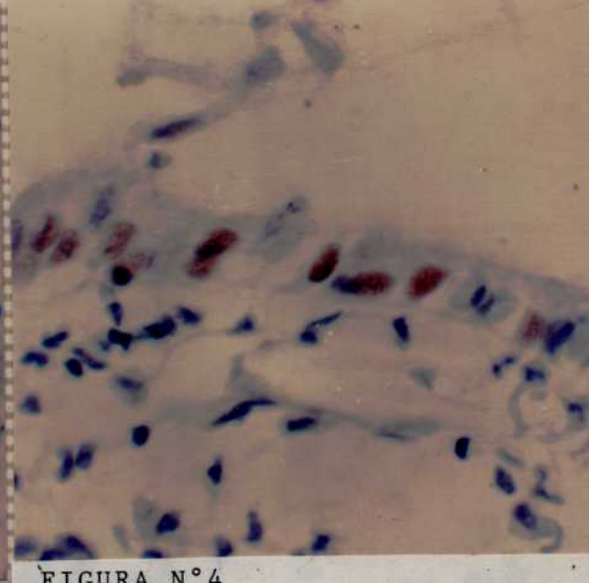


FIGURA N°4  
Presencia ADN de virus Papiloma tipo 11 en tejido endoglandular normal (en una metaplasia escamosa) (Hidridación "in situ" con sonda biotinilada, hematoxilina, aumento 160 x).-

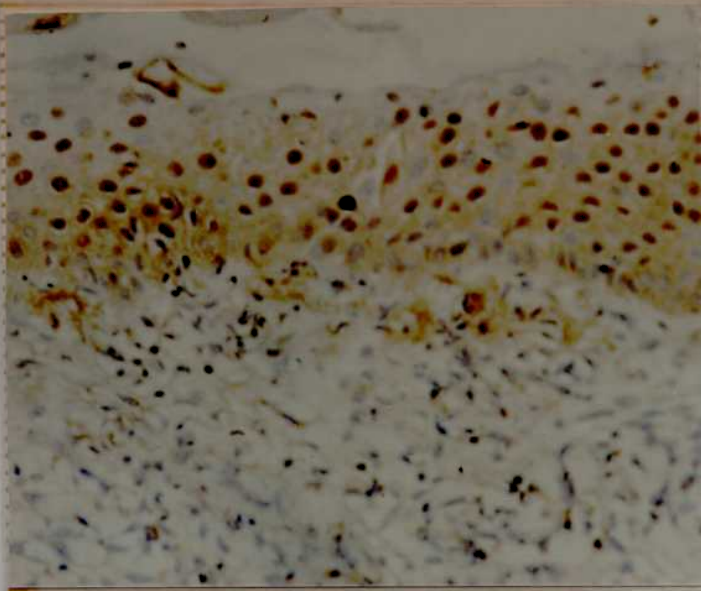


FIGURA N°5

Demostración de ADN de virus Papiloma tipo 16 en núcleos de todos los estratos del epitelio (Displasia severa). (Hidridación "in situ" con sonda biotinilada hematoxilina, aumento 160 x).-

FIGURA N°6

Demostración de ADN de virus Papiloma tipo 11 en una displasia severa. Se observa la positividad en los estratos medios y superiores del epitelio. Hidridación "in situ" hematoxilina, aumento 100 x).

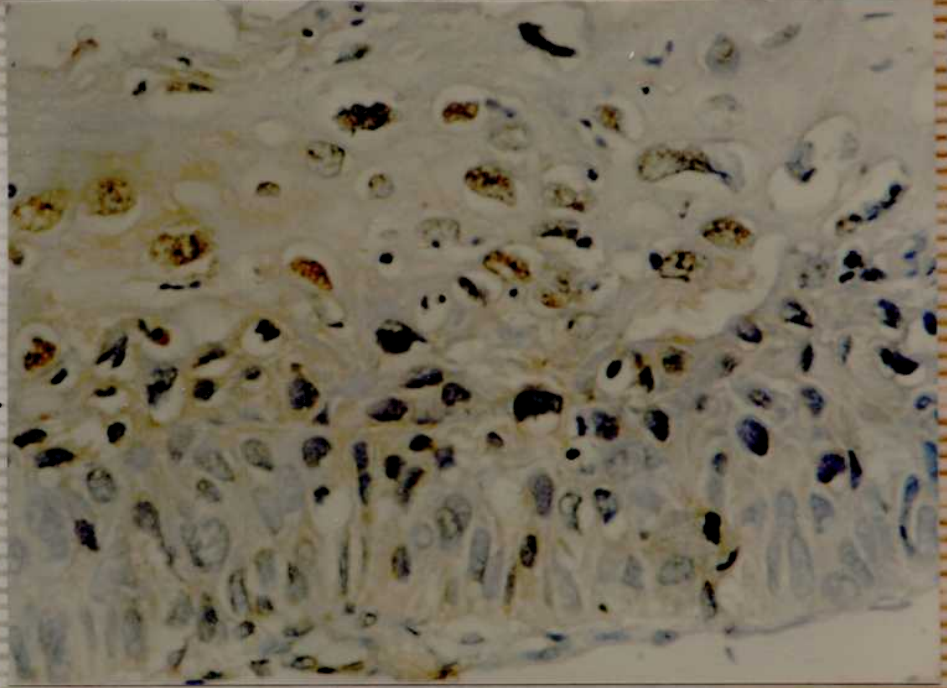


FIGURA N°7

Localización ADN de virus Papiloma tipo 18 (Displasia severa). Se observan núcleos positivos aún en las células parabasales (Hidridación "in situ"- hematoxilina, aumento 50x.

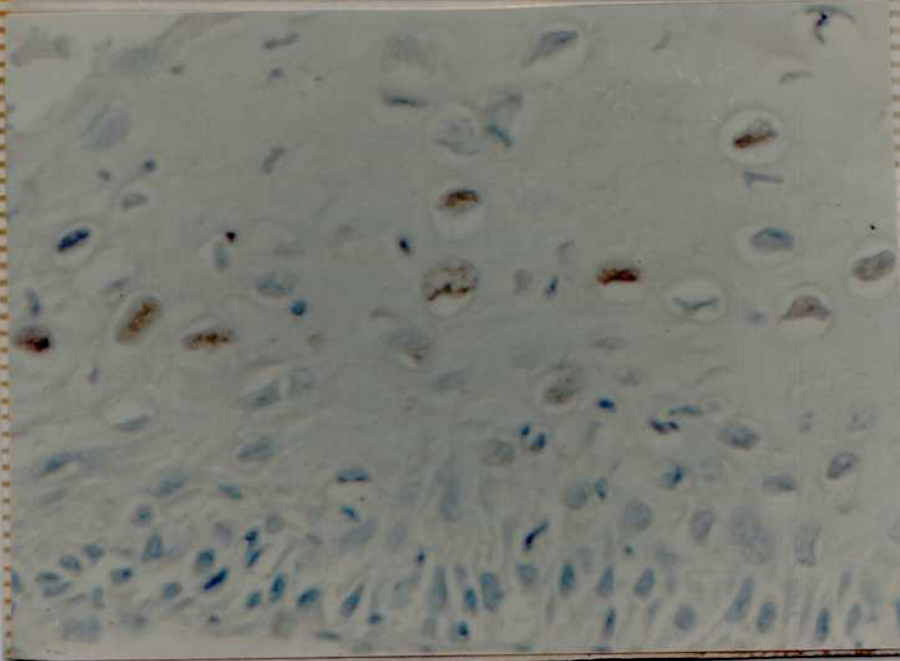
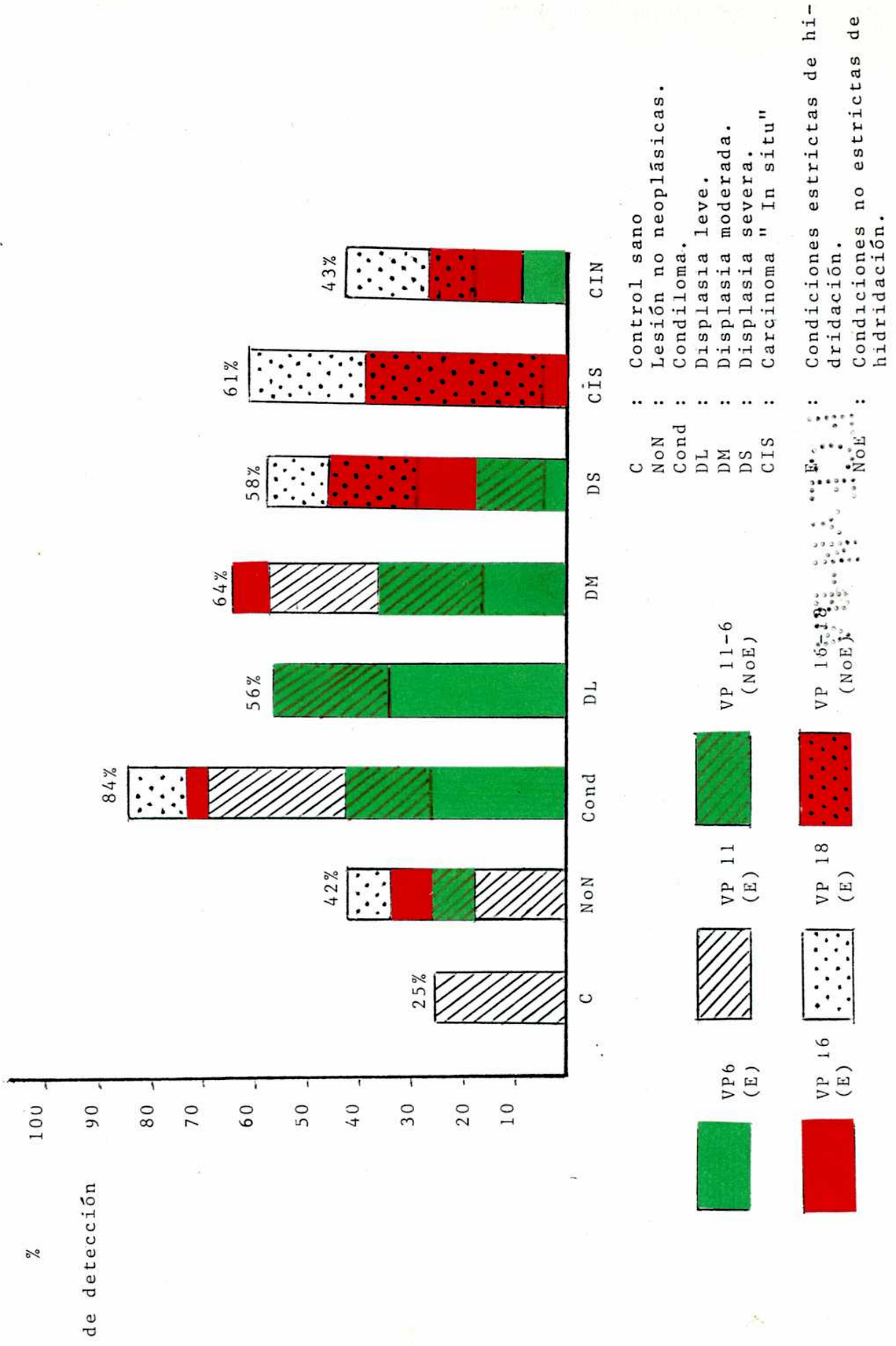


FIGURA 3.

Resultados de hidridación  
Frecuencias de distintos tipos de  
virus Papiloma (UP) en lesiones del  
cérvix.



#### 4) Comparación de las Metodologías Aplicadas en el Diagnóstico de la Infección por VP

La técnica de hibridación "in situ" permitió definir el tipo viral infectante y resultó más eficiente que la observación histopatológica. (Tabla 3) en la detección de la infección papilomatosa, en especial en ausencia de EC-VP, como lo demuestra la detección de ADN viral en un epitelio endoglandular normal (en un caso de metaplasia escamosa) (fig. 3 y 4), en dos displasias severas y en seis carcinomas "in situ" y en los carcinomas invasores considerados.

La Tabla 4 muestra la detección de antígenos virales por IP según el tipo de VP infectado. El 38% de los tejidos infectados por VP 6,11 ó 6-11 (NoE) y el 33% de los afectados por VP 16 y 18 ó 16-18 (NoE) resultaron IP positivos.

#### DISCUSION

En esta etapa del estudio se examinó por hibridación "in situ" el porcentaje y la distribución de las secuencias de ADN de VP en lesiones del cérvix con el propósito de determinar la prevalencia de los VP más frecuentemente determinados en el tracto genital. En el 61% del grupo de pacientes se detectó AND de VP; el VP 6 se lo halló en el 32-33% de los condilomas y displasias leves; también en un carcinoma invasor, pero en áreas adyacentes a displasia severa/carcinoma "in situ". El VP 11 fue detectado principalmente en lesiones benignas (37% de los condilomas) y en el 21% de las displasias moderadas. El VP 16 se lo encontró en 13% de las displasias severas y 14% de los carcinomas pero también fue detectado en lesiones benignas (5 8%

de los condilomas y lesiones no neoplásicas) en tanto que el VP 18 fue hallado en el 22-29% de los carcinomas, en el 21% de los condilomas y displasias y el 8% de las lesiones benignas.

En condiciones no estrictas, hubo una distribución similar de las secuencias VP 6-11 (21%) en displasias y condilomas, siendo su frecuencia menor en las lesiones no neoplásicas (8%) y carcinomas invasores (14%). Las secuencias relacionadas con los VP 16-18 se hallaron exclusivamente en displasias severas (17%) y carcinomas (35%). Existe la posibilidad de que se trate del VP 31, el cual muestra cierta homología con el VP 16 a  $T_m-20^{\circ}\text{C}$  (123), aunque el primero ha sido demostrado principalmente en displasias.

La detección de VP 11 en el epitelio glandular normal fue notable, si bien ha sido mencionada la detección de VP 16 en adenocarcinomas, con una epidemiología distinta de la de los carcinomas escamosos del cérvix (179).

Los resultados parecen señalar la presencia de otros tipos virales o tal vez, reordenamiento de las secuencias nucleotídicas que pudieran afectar las hibridaciones en condiciones estrictas.

Los primeros estudios, realizados en Alemania (129) demostraron la presencia de VP 16 en el 60-72% de los carcinomas invasores y en el 6% de los condilomas. Los ADN virales, extraídos de tales lesiones mostraban cierta heterogeneidad. Por otro lado, el mismo estudio señaló que sólo 34,8% de los carcinomas cervicales provenientes de Kenya y Brasil contenían el VP 16, indicando probables diferencias geográficas en la in-

cidencia de ese tipo viral. Además, en relación con el concepto del factor masculino, el análisis de carcinomas de pene demostró una prevalencia del tipo 16 en las muestras germanas y del 18 en las africanas y brasileras. Villa y López de Brasil informaron recientemente, la ausencia del VP 16 y predominio del VP 18 en los carcinomas examinados. (180).

Los resultados obtenidos confirman la asociación más frecuente de los VP 6 y 11 con las lesiones benignas y los VP 16 y 18 con las lesiones de neoplasia intraepitelial, apreciación que puede extenderse a nuevos tipos virales relacionados con ellos, cuya existencia se señala en esta área geográfica.

La detección de VP 6, 11, 16 y 18 por hibridación "in situ" mostró diferencias de intensidad y localización. En los dos primeros, se observaron reacciones cromáticas más intensas y limitadas a los núcleos superficiales del epitelio; los VP 16 y 18 se caracterizaron por una coloración más atenuada, generalmente distribuidos más ampliamente en todas las capas del epitelio, aún en las inferiores. La menor intensidad de color podría indicar un menor número de copias de genoma viral por célula y la localización diferencial sería el resultado de una interacción virus-célula o de una biología distinta.

En la presente serie de resultados, se observó que los tejidos afectados por los VP considerados "benignos" (VP 6 y 11) expresaron antígenos virales en un nivel levemente superior (38%) que los considerados de "alto riesgo" (VP 16 y 18 - 33%).

Las hibridaciones negativas en tejidos con EC-VP podrían deberse a limitaciones de la tecnología aplicada; en estudios previos (177) (181) se ha señalado que la hibridación "in situ" por el método colorimétrico permitiría detectar ADN viral cuando el número de copias del genoma viral fuera del orden de 100-800/células; a pesar de ello, esta técnica resultó eficiente en la detección de VP, en especial en ausencia de signos de EC-VP o IP negativos. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la metodología aplicada permite realizar sobre un mismo espécimen los estudios histológicos y virológicos, lográndose en pocas horas tipificar el agente en pequeñas secciones de tejido, cuyo tamaño resulta insuficiente para la aplicación de tecnologías de mayor sensibilidad (extracción de ADN e hibridación sobre filtros, empleando sondas radioactivas).

Los carcinomas invasores resultaron un material difícil de analizar por esta metodología, por las características del tejido, con un estroma atrofiado o relajado, con rotura de fibras, provocando la pérdida de fragmentos de tejidos o directamente afectando la estabilidad de las secciones de biopsia sobre el portaobjeto. Las razones mencionadas redujeron el número de materiales disponibles para el estudio.

La presencia regular de ADN de VP en cáncer cervical o en lesiones precancerosas del cérvix no prueba de por sí un involucramiento etiológico, pero podría presentar un factor de



riesgo; además, la detección de VP en lesiones benignas podría sugerir nuevamente condición de la interacción con eventos iniciadores o un estado de latencia, por lo que resulta de interés el seguimiento de estas pacientes.

TABLA 1: EDADES PROMEDIO POR CADA GRUPO DE LESIONES CONSIDERADAS

Patología	Edad	Patología	Edad
Control	24 ± 6	Displasia leve	15 ± 9
No neoplásicas	26,5 ± 6	Displasia mod.	26 ± 9
Condilomas	33 ± 8	Displasia sev.	29 ± 10
Total	28 ± 11	Carc."in situ"	37,7 ± 10
		Carc. invasor	32,6 ± 8
		Total	30 ± 17

TABLA 2: RESULTADOS DE HIBRIDACION "IN SITU"

PATOLOGIA	TOTAL	CONDICIONES ESTRICTAS				CONDICIONES NO ESTRICTAS		TOTAL
		6	11	16	18	16+11	16+18	
Normal (control)	4	-	-	-	-	-	-	1
No neoplásicas	12	-	2	1	1	1	-	5
Condiloma plano acuminado	8 19 11	2 4 6 +	2 7 +	1 *1	*- +2	2 4 2	-	17
Displasia leve	9	3	-	-	-	2	-	5
Disp. mod.	14	2	3	-	1	3	-	9
Disp. sev.	24	1	-	3	3	3	4	14
Carc. "in situ"	23	-	-	1	5	-	8	14
Carc. invasor	7	#1 (a)	-	1	# 2	1	-	3
TOTAL	112 (100%)	13 (12%)	13 (12%)	7 (6%)	14 (13%)	14 (13%)	12 (11%)	68 (61%)

Dobles detecciones: \* = 11-18

+ = 16-18

# = 6-18

- = 18-11/6

↓ = 6-11

(a) Hallado en zonas de displasia severa - carcinoma "in situ"

TABLA 3: COMPARACION DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA  
INFECCION POR VIRUS PAPILOMA

PATOLOGIA	TOTAL	HISTOLOGIA (EC -VP) *	HIBRIDACION "IN SITU" (ADN - VP)	INMUNOPEROXIDASA (Antígenos- VP)
Control y lesiones benignas	35 (100)	27 (77)	22 (63)	10 (29)
Lesiones premalig- nas y malignas	75 (100)	37 (49)	44 (59)	11 (15)
TOTAL	112 (100)	64 (57)	66 (59)	21 (21)

(\*) EC-VP = efecto citopático de virus Papiloma

TABLA 4: DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOPEROXIDASA  
(IP) SEGUN EL TIPO DE VIRUS PAPILOMA INFECTANTE (VP)

TIPO VIRAL	TOTAL	ADN+VP	IP
VP	13	(100%)	6 (46%)
VP 11	13	(100%)	3 (23%)
VP 6/11	14	(100%)	6 (43%)
			40 (100%)
			15 (38%)
VP 16	7	(100%)	2 (29%)
VP 18	14	(100%)	4 (29%)
VP 16/18	12	(100%)	4 (33%)
			33 (100%)
			10 (33%)

7. ESTUDIO RETROSPECTIVO Y PROSPECTIVO DE LA EVOLUCION DE LAS LESIONES CERVICALES PREMALIGNAS Y MALIGNAS - SU RELACION CON LAS INFECCIONES HERPETICAS Y PAPILOMATOSAS.

INTRODUCCION

Numerosos estudios han mostrado que, luego del primer diagnóstico, las lesiones cervicales precancerosas pueden persistir sin cambios aparentes, desaparecer completamente o progresar en severidad (154). El embarazo es otro elemento que podría modificar la biología de las lesiones, ya que ha sido informada la regresión de las lesiones preinvasivas luego del parto. (180).

En estudios previos (183), pacientes embarazadas con lesiones cervicales (desde displasia moderada a carcinoma "in situ") fueron controladas durante el embarazo; aquéllas que presentaban displasia severa o carcinoma "in situ" fueron conizadas al tercer mes del puerperio; en algunos casos, los especímenes quirúrgicos exhibieron regresión de los procesos patológicos. Consecuentemente, se pensó que en el embarazo, las alteraciones morfológicas inducidas por las infecciones papilomatosas y/ o herpéticas podrían conducir a un diagnóstico más severo.-

Cabe destacar que la incidencia de las mencionadas infecciones virales fue similar en embarazadas y no embarazadas con lesiones cervicales de distinto grado de severidad (Capítulo 3).

En este Capítulo, se presenta un estudio retrospectivo y

y prospectivo de la evolución de las lesiones benignas, pre-neoplásicas y neoplásicas, habiéndose efectuado una revisión del material histológico y una investigación inmunohistoquímica para detectar antígenos de virus Papiloma (VP) y virus Herpes simplex tipo 2 (VHS2). El seguimiento tuvo por objeto establecer si existe una relación entre lesiones de neoplasia intraepitelial-infecciones virales, con evolución de las lesiones y la posibilidad de determinar factores de riesgo de progresión.

#### Pacientes, Materiales y Métodos

##### A) Estudio Retrospectivo

Se examinaron las piezas de conización de 51 pacientes (37 embarazadas y 14 no embarazadas) con diagnóstico de displasia severa o carcinoma "in situ". Las conizaciones fueron efectuadas en el tercer mes del puerperio en las embarazadas y en las no embarazadas, entre 4 y 6 meses después del diagnóstico, por lo cual los tiempos de seguimiento son comparables. Las biopsias previas a la conización fueron re-evaluadas de acuerdo con los criterios morfológicos relacionados con la infección con VP y se aplicó la técnica inmunoperoxidasa para detectar antígenos de VP (Anexo, pág.152).

##### B) Estudio Prospectivo

Se realizó un seguimiento de 95 pacientes con diagnóstico previo de lesión benigna: 15 casos; condiloma, 11 casos; displasia leve, 6 casos; displasia moderada, 20 casos; displasia severa, 23 casos; carcinoma "in situ", 20 casos. Las edades

del grupo oscilaron entre 16 y 55 años, con un promedio de 27.8 años, siendo el 90% de las pacientes con displasia severa y carcinoma "in situ" menores de 35 años.

Las pacientes fueron sometidas a un cuidadoso control cada 6 meses en el caso de lesiones benignas y cada 3 meses en el resto, durante un lapso de 18-36 meses. Se les efectuó colposcopia, citología y biopsia dirigida la que fue realizada también con fines terapéuticos. Se examinaron secciones histológicas con el objeto de detectar signos de infección por VP (EC-VP), antígenos de VP y VHS2 y en algunos casos, ADN de VP, mediante hibridación "in situ", cuando fue posible disponer de material suficiente para todos los estudios (Anexo, pág. 175).

#### Evolución de las Lesiones

Las regresiones se evaluaron por la remisión completa de la lesión o la disminución de la severidad de la misma en por los menos dos grados (ej. de carcinoma "in situ" a displasia moderada). Con el mismo criterio se consideró progresión el aumento de la severidad de la lesión en por lo menos dos grados (ej. de una lesión no displásica a displasia moderada).

#### RESULTADOS

##### A) Estudio Retrospectivo

##### Estudio de los Especímenes Quirúrgicos (Conos)

La Tabla 1 muestra la concordancia o discrepancia de



en los diagnósticos observados al evaluar 51 conos cervicales y compararlos con los de las biopsias previas. El diagnóstico fue confirmado en 20 pacientes (39%); en el resto, se observó regresión en 28 casos (55%) y progresión en 3 casos (6%). No se observó progresión a carcinoma invasor. Las regresiones fueron significativamente más frecuentes ( $P = 0,01$ ) en el grupo de embarazadas. El 79% de los casos de regresión presentaron antígenos virales en la biopsia previa a la conización (Tabla 2).

#### B) Estudio Prospectivo

##### Evolución de las Lesiones

Durante el seguimiento, se observaron regresiones en el 42% de los casos, persistencia en el 39% y progresión en el 19% (Tabla 3).

##### Detección de Antígenos Virales

Se observó una fluctuación en la expresión de antígenos virales; en particular los antígenos VHS2 aparecieron y desaparecieron cíclicamente, indicando posiblemente reactivaciones o reinfecciones.

En la Tabla 4, se detallan las frecuencias de detección de antígenos virales, computándose una vez por paciente, independientemente del número de biopsias que en el mismo resultaron positivas. El 88% de los casos demostró antígenos virales, al menos una vez durante el seguimiento.

### Regresiones

Se registraron 40 casos (42%) de regresión de lesiones, correspondiendo 21 (53%) a embarazadas y 19 (47%) a no embarazadas, no resultando en este caso significativa la diferencia entre ambos grupos.

Las regresiones estuvieron asociadas más frecuentemente (60%) con la negativización de los antígenos virales durante el seguimiento (Tabla 5).

### Persistencia

Durante el seguimiento, permanecieron sin cambios 38 pacientes (39%), de las cuales 10 (53%) eran embarazadas y 18 (47%) no embarazadas. La persistencia estuvo asociada con la detección de antígenos virales (47%) aunque también fue notable el porcentaje de casos negativos durante todo el seguimiento (39%) (Tabla 6.).

### Progresiones

Se observaron 18 casos (19%) de progresión de lesiones, correspondiendo 7 (40%) a embarazadas y 11 (60%) a no embarazadas. En 10 pacientes, la progresión coincidió con la aparición de infecciones virales (positividad de la inmunoperoxidasa) (Tabla 7), aunque en 7 casos, las siguientes biopsias no demostraron positividad, pero persistió el agravamiento de las lesiones.

### Detección de Proteínas Tempranas de VHS2 (ICP 11/12) en Relación con Evolución de las Pacientes

El estudio se efectuó sobre 50 pacientes (una parte del

grupo de 95), observándose que en el 75% de los casos se detectaron proteínas virales tempranas (Tabla 8).

#### Detección de AND de VP

La relación entre la evolución de la lesión y el tipo de VP infectante no ha sido incluida en este estudio, pero es interesante mencionar algunos resultados preliminares. En 7 casos de regresión, se detectaron los VP 6 (en condiciones estrictas de hibridación) o los relacionados con los VP 6/11 (en condiciones no estrictas de hibridación). También en 8 casos de persistencia sin cambios se detectaron esos tipos virales. Por otro lado, en dos casos de progresión se detectó VP 18.

#### DISCUSION

Estudios sobre el comportamiento biológico de las displasias y carcinomas han reconocido que entre el 45 y 70% de los casos de carcinoma "in situ" pueden transformarse en carcinomas invasores, aunque también mencionan la observación de regresiones (184) (185). Por otro lado, las displasias pueden agravarse progresando hacia lesiones de mayor severidad (28-40%) o hacia el carcinoma "in situ" (4-28%), persistir sin cambios aparentes (22%) o desaparecer por completo (6-40%) (186).

La regresión de los procesos displásicos puede estar relacionada con la remoción de la lesión por la toma de la biopsia, la cicatrización subsiguiente al trauma provocado

por la biopsia o a los procesos traumáticos durante el parto (182) (187).

El objeto de este estudio fue establecer si la evolución de las lesiones podría estar relacionada con la presencia de infecciones virales.

En el estudio retrospectivo, se observó regresión de la displasia y carcinoma "in situ" en 55% de los conos examinados; la persistencia y progresión estuvo en el orden de lo esperado (39 y 6%, respectivamente), de acuerdo con informaciones previas (186), pero no se observó progresión hacia el carcinoma invasor. El 79% de los casos de regresión presentaron antígenos de VHS2 y/o VP en las biopsias anteriores a la conización; los resultados parecen confirmar las presunciones previas: los cambios epiteliales causados por las infecciones virales podrían dificultar la observación histopatológica y conducir a un diagnóstico más severo, lo cual podría explicar algunas de las regresiones espontáneas.

Sin embargo, la presencia de antígenos virales en lesiones que persisten o aún en las que progresan justificó la elaboración de un plan de control ginecológico que incluyera la detección de tales infecciones y observar cómo se modificaban esos parámetros en relación con la evolución. El seguimiento se efectuó en un grupo relativamente pequeño (95 pacientes), debido a las dificultades que se presentan en un centro hospitalario para establecer un contacto permanente con las pacientes.

El grupo estaba constituido por mujeres jóvenes y son un subgrupo del estudiado en el Capítulo 3, con la incorporación de nuevos casos con similares caracteres epidemiológicos, mostrando el 88% detección positiva de antígenos Vp y/o VHS2 al menos una vez durante el seguimiento.

En el estudio prospectivo, la frecuencia de regresión fue similar en el grupo de embarazadas y no embarazadas, contrariamente a lo observado en el estudio de las piezas quirúrgicas (conos), en el cual las regresiones fueron más frecuentes en las embarazadas. Esta discrepancia puede deberse simplemente a problemas de muestreo, no pudiéndose emitir conclusiones definitivas relacionadas con el embarazo en sí.

Por otro lado, las regresiones estuvieron acompañadas por una negativización de la detección de antígenos virales (60% de los casos). Aquí, es posible aplicar las consideraciones anteriores referidas a las dificultades en el diagnóstico en presencia de infecciones virales. Sin embargo, las regresiones podrían ser el resultado de un proceso inflamatorio local, inducido por las infecciones virales. Así por ejemplo: las verrugas cutáneas que regresan es característica la presencia de un infiltrado celular inflamatorio (188) (189) en el cual, a nivel del cérvix, se ha demostrado que está constituido por células T, B y polimorfonucleares (190). Los mecanismos inmunes asociados con infecciones virales y la regresión de las lesiones premalignas podrían ser concomitantes.

Además, la presencia de antígenos virales en epitelios cervicales con apariencia normal (25% de los casos) indicaría que la infección persiste en forma latente y luego de un período variable, podría ser reactivada por factores desconocidos; esta probabilidad señala la necesidad de continuar con el control periódico de estas pacientes.

La progresión de lesiones estuvo asociada en el 55% de los casos con la detección de antígenos virales durante el seguimiento; posteriormente, por lo general se observó una negativización persistente con permanencia del agravamiento.

En el estudio prospectivo, sólo en las progresiones se observó una diferencia significativa entre embarazadas y no embarazadas pero nuevamente, no pareció dicho status el causante de las diferencias sino la presencia de antígenos virales (resultado no mostrado en las tablas). En ese sentido, hubo una consistente relación entre progresión y presencia de proteínas tempranas de VHS2 (ICP 11/12). Teniendo en cuenta que las progresiones se observaron sobre un lapso relativamente corto (hasta 3 años), resulta de particular interés el seguimiento de las pacientes que presentan dicha positividad. Estos resultados son coincidentes con investigaciones recientes (191) que señalan un desenlace fatal más rápido de mujeres con carcinoma de cérvix con título alto de anticuerpos de ICP. 11/12 en comparación con pacientes seronegativas.

Debe destacarse que las proteínas ICP 11/12 se detecta-

con mayor frecuencia en tejidos con EC-VP (Capítulo 5) por lo cual la infección con VP resulta un factor importante. Los resultados preliminares indican una relación de los Vp 6 y 11 (o los relacionados con ellos) con regresión y persistencia de las lesiones y al VP 18 con progresión.

Estos resultados apoyan nuevamente una relación de ambos virus con el carcinoma de cuello uterino.

TABLA 1: CONCORDANCIA O DISCREPANCIA ENTRE EL DIAGNOSTICO  
EFECTUADO EN EL CONO Y EN LA BIOPSIA PREVIA EN EL  
GRUPO DE PACIENTES

<u>EVALUACION HISTOLOGICA</u>	<u>EMBARAZADAS</u>	<u>NO EMBARAZADAS</u>	<u>TOTAL</u>
Regresión	24 (65%)	4 (29%)	28 (55%)
Sin cambios	12 (32%)	8 (57%)	20 (39%)
Progresión	1 ( 3%)	2 (14%)	3 ( 6%)
Total	37 (100%)	14 (100%)	51 (100%)



TABLA 2: CONCORDANCIA O DISCREPANCIA ENTRE EL DIAGNOSTICO EFECTUADO EN EL CONO Y EN

LA BIOPSIA PREVIA - DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOPEROXIDASA

EVALUACION HISTOLOGICA	EMBARAZADAS ANTIGENOS VIRALES		NO EMBARAZADAS ANTIGENOS VIRALES		TOTAL		TOTAL		
	VP	VHS2	VP	VHS2	VP	VHS2	VP	VHS2	
Regresión	11	6	3	24	-	2	4	22 (79%)	28 (100%)
Sin cambios	3	2	1	12	2	2	8	10 (50%)	20 (100%)
Progresión	1			-	1	1	2	3 (100%)	3 (100%)
TOTAL	14	9	4	37	3	5	14	35 (69%)	51 (100%)

VP = Virus Papiloma

VHS2 = Virus Herpes simple tipo 2

Ambos = Ambos antígenos

TABLA 3: EVOLUCION DE LAS LESIONES

EVOLUCION	Non	Cond.	DL	DM	DS			
Regresión	-	-	5 (71)	12 (60)	16 (70)	7 (35)	40 (42)	
Persistencia	8 (56)	6 (55)	1 (14)	5 (25)	6 (26)	12 (60)	38 (40)	
Progresión	7 (46)	5 (45)	-	3 (15)	1 (4)	1 (5)	17 (18)	
Total	15 (100)	11 (100)	7 (100)	20 (100)	3 (100)	20 (100)	95 (100)	

Non = Lesión no neoplásica (metaplasia, cervicitis crónica, etc)

Cond. = Condilomas

DL = displasia leve

DM = displasia moderada

DS = displasia severa

CIS = carcinoma "in situ"

( ) = porcentaje

TABLA 4: DETECCION DE ANTIGENOS DE VIRUS PAPILOMA (VP) Y  
Y HERPES SIMPLEX TIPO 2 (VHS2) (INMUNOPEROXIDASA)  
DURANTE EL SEGUIMIENTO DE PACIENTES

	NoN.	Cond.	DL	DM	DS	CIS	TOTAL	
VHS2	10	7	3	6	14	6	46	] ( 88%)
VP	7	5	5	11	14	8	50	
VP+VHS2	2	2	1	3	6	2	17	
NEGATIVOS	2	2	-	2	3	10	21	( 22%)
TOTAL	15	11	6	20	23	20	95	(100%)

No N      lesión no neoplásica (cervicitis crónica, metaplasias, etc.)

Cond. =    Condilomas

DL        Displasia leve

DM        Displasia moderada

DS        Displasia severa

CIS        Carcinoma "in situ"

TABLA 5: EVOLUCION DE LAS PACIENTES - REGRESIONES

ANTIGENOS VIRALES	NoN	Cond.	DL	DM	DS	CIS	TOTAL
Embarazadas	-	-	-	7	10	5	22 (55%)
No embarazadas	-	-	5	5	6	2	18 (45%)
Total	-	-	5	12	16	7	40 (100%)
VP +	-	-	-	5	1	1	7 (17.5%)
VHS2 +	-	-	-	-	2	1	3 ( 7.5%)
Negativos	-	-	-	1	2	1	6 (15%)
Negativización*	-	-	5	6	11	3	24 (60%)

VP Virus Papiloma  
VHS2 Virus Herpes simplex Tipo 2  
NoN no neoplásica (cervicitis crónica, metaplasias, etc.)  
Cond. = Condiloma  
DL Displasia leve  
DM Displasia moderada  
DS Displasia severa  
CIS Carcinoma "in situ"

\* Durante el seguimiento, se observó negativización:desaparición de la positividad de la inmunoperoxidasa para VHS2 y VP.

TABLA 6: EVOLUCION DE LAS LESIONES - PERSISTENCIA

ANTIGENOS VIRALES	NoN	Cond.	DL	DM	DS	CIS	TOTAL
Embarazadas	3	1	-	3	4	9	20 (53%)
No embarazadas	5	5	1	2	2	3	18 (47%)
Total	8	6	1	5	6	12	38 (100%)
VP +	4	1	1	-	-	1	7
VHS2 +	2	2		-	2	2	8
VHS2 + VP	-		-		1	3	4 (47%)
Negativos	1	1	-	3	3	3	14 (39%)
Negativización*	1	2	-	2	-	-	5

VP Virus Papiloma  
VHS2 Virus Herpes simplex tipo 2  
NoN No neoplásica  
Cond. Condiloma  
DL Displasia leve  
DM Displasia moderada  
DS Displasia severa  
CIS Carcinoma "in situ"

\* Negativización: desaparición de la positividad de la inmunoperoxidasa para VHS2 y/o VP.

TABLA 7: EVOLUCION DE LAS LESIONES - PROGRESION

ANTIGENOS VIRALES	NoN	Cond.	DL	DM	DS	CIS	TOTAL
Embarazadas	3	1	-	2	-	1	7 (40%)
No embarazadas	5	4		1	1	-	11 (60%)
Total	8	5	-	3	1	1	18 (100%)
VP +	2	-		-	-	-	2
VHS2	3	2		1	-	-	6
VHS2 + VP		2		-	1	1	2
Negativos	1	1	-	1			5 (28%)
Negativización*	2	-	-	1			3 (17%)

VP Virus Papiloma

VHS2 = Virus Herpes simplex

Non = No neoplásica

Cond. = Condiloma

DL = Displasia leve

DM = Displasia moderada

DS = Displasia severa

CIS = Carcinoma "in situ"

\* Negativización: desaparición de la positividad de la inmunoperoxidasa para VHS2 y/ VP.

TABLA 8: PROTEINAS TEMPRANAS DE VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2  
(ICP 11/12) Y EVOLUCION DE LAS LESIONES

EVOLUCION	TOTAL	ICP 11/12
REGRESION	22 (100%)	2 (9%)
PERSISTENCIA	20 (100%)	5 (25%)
PROGRESION	16 (100%)	12 (75%)
TOTAL	58 (100%)	19 (33%)

8. CONCLUSION Y DISCUSION

La posibilidad de una interacción entre los VHS2 y VP en relación con la patogénesis del cáncer de cuello del útero ha motivado el presente estudio; se trató de establecer si existe alguna relación entre infecciones virales y evolución de las lesiones, enfocando las infecciones concomitantes VHS2-VP.

Los antígenos de VP fueron hallados en las lesiones típicamente inducidas por el virus (condilomas) en el 57% de los casos y además, en un espectro de lesiones desde premalignas asociadas con condilomatosis (56%) hasta carcinomas invasores sin evidencias histológicas de infección por VP (9%).

En el 38% de las pacientes fueron detectados antígenos de VHS2; sin embargo, no se observaron signos histológicos de infección por este virus, lo que podría indicar infecciones subclínicas y quizás un modo de persistencia viral en el epitelio cervical, a semejanza del descrito en el canal uretral (41).

No hay antecedentes de estudios en los cuales se haya encarado la detección de ambos antígenos virales en el cérvix, por lo que resultó destacable la demostración de ambas infecciones en la misma biopsia en el 14% de las pacientes, aunque las infecciones concomitantes ascendieron al 30% cuando la detección de antígenos de VHS2 se realizó en tejidos que mostraban efectos citopáticos característicos de infección por VP (EC-VP).



La comparación del grupo de pacientes embarazadas y no embarazadas en cuanto a frecuencias de antígenos virales en el cérvix nos mostró diferencias significativas. Sin embargo, deben tenerse en cuenta los valores encontrados en embarazadas ya que la papilomatosis laríngea y de vías respiratorias, si bien poco frecuentes (194) podrían ser causadas por una infección del niño en el canal del parto. Por otro lado, aunque no se han observado dentro del grupo de estudio infecciones perinatales, la posibilidad de la infección herpética del recién nacido enfatiza la necesidad de un seguimiento inmunoviroológico de las embarazadas a fin de disminuir tal riesgo.

En los tejidos con infección concomitante, la inmunofluorescencia doble rodamina/fluoresceína permitió observar en un mismo preparado histológico la distribución de los antígenos de VP y VHS2. Las distintas imágenes observadas son compatibles con distintas etapas de yuxtaposición de ambas infecciones; la más relevante fue la localización exclusivamente nuclear de las positividades para VP y VHS2 (39% de los casos) observadas preferentemente en las lesiones más severas. En el caso de VHS2, dicha localización podría significar un bloqueo de la expresión de las etapas tardías del ciclo de replicación, tal vez debido a las alteraciones celulares inducidas por VP.

Para evaluar dicha posibilidad, se determinó la presencia de la proteína temprana de VHS2, ICP 11/12 (tipo beta) en tejidos que mostraban o no EC-VP.

La localización de la proteína ICP 11/12 fue nuclear (15%), citoplasmática (37%) y nuclear-citoplasmática (48%); las primeras han sido descritas (77) (170); en cuanto a la nuclear - citoplasmática, podría ser el resultado de una interacción virus-célula, modificada por la infección simultánea con VP. La frecuencia de proteínas tempranas podría estar relacionada con la concomitancia de ambas infecciones, ya que en el 69% de las biopsias positivas para proteínas ICP 11/12, se hallaron en tejidos con EC-VP. Esta interacción daría como resultado un espectro de respuestas cuya expresión citológica podrían estar demostrada por las distintas localizaciones observadas y explicarían además, la baja detección de antígenos estructurales de VP en relación con el EC-VP en los subgrupos estudiados (lesiones benignas (LB) y lesiones premalignas (LPM)).

Informaciones previas han señalado que fragmentos subgenómicos de VHS2 que codifican VHS2 para ICP 11/12 tienen carácter transformante (192). La detección en displasias y carcinomas de secuencias de VHS2 que pueden inducir transformación celular y amplificación génica "in vitro" podría sugerir que dichos fragmentos podrían actuar como mutágenos insercionales o como activadores de la expresión celular (193), lo que apoyaría un rol iniciador de estos virus.

Los resultados del presente estudio demuestran que la historia natural de las lesiones benignas por infección con VP (condilomas) y las lesiones de neoplasia intraepitelial son compatibles, ya que se detectó EC-VP entre el 74 y 95% de las

las displasias y carcinomas examinados (el primer porcentaje corresponde al estudio de detección de infecciones virales -30 pacientes- y el segundo al grupo incluido en el seguimiento retrospectivo -95 pacientes-). No obstante las diferencias biológicas entre las lesiones con riesgo de progresión y las que regresan, los estudios indican que las infecciones benignas por VP y el carcinoma cervical están relacionados por un espectro morfológico. La existencia de una continuidad biológica no prueba que la progresión pueda ocurrir secuencialmente de un extremo del espectro al otro, ya que se observó progresión de lesiones benignas hacia displasias severas o carcinomas (confirmando el potencial de progresión de la lesión condilomatosa) en un corto lapso, sin haberse detectado el paso por lesiones intermedias.

El porcentaje de lesiones que regresan (en nuestro caso 42%) podría reflejar por un lado una sobre-estimación en el diagnóstico del grado de severidad, probablemente atribuible a las alteraciones celulares inducidas por infecciones virales o bacterianas (aquí se han evaluado las primeras) y también podrían estar relacionadas con la respuesta inmune local frente a las infecciones virales, ya que ha sido demostrada una respuesta inflamatoria en verrugas cutáneas que regresan (188) (189). En nuestro caso, existe la posibilidad de un ataque a células cervicales con expresión de antígenos virales (VP), lo cual produciría eliminación de las mismas del tejido cervical; tales conceptos podrían extenderse a las infecciones

herpéticas subclínicas. La observación durante el seguimiento de tejido metaplásico en las áreas donde hubo una lesión premaligna apoya estos conceptos.

La persistencia y progresión durante el seguimiento estuvieron relacionados con la expresión de antígenos virales en el 32 y 44%, respectivamente. Asimismo, se observaron infecciones herpéticas recurrentes el 66% de las pacientes, lo que podría significar que esta infección sería un factor de riesgo de progresión de una lesión condilomatosa asociada o no a la lesión premaligna. Por otro lado, el seguimiento de las pacientes con infecciones concomitantes VHS2 y VP por inmunofluorescencia doble, demostró progresión de lesiones en todos los casos en los que se observó yuxtaposición de infecciones con localización exclusivamente nuclear de ambos antígenos virales.

Durante el seguimiento prospectivo (95 casos), se determinó la expresión de proteínas tempranas de VHS2 en el cérvix de un grupo de 50 pacientes, observándose positividad en el (12/16) 75% de las progresiones y en el (5/20) 25% de las lesiones persistentes, por lo que la presencia de ICP 11/12 podría ser considerada un factor de riesgo de inducción o progresión del estado neoplásico.

La infección por VHS2 ha sido relacionada con el desarrollo del cáncer cervical por numerosos datos epidemiológicos y virológicos, incluidos los aportados por este estudio, los que sugieren que dicho virus puede producir alteraciones del

ADN de la células huésped, por ejercer funciones semejantes a los carcinógenos en las etapas de iniciación de la carcinogénesis, ya que otros factores (como el cigarrillo) pueden tener igual o mayor rol en la iniciación y constituir importantes factores de riesgo en el desarrollo tumoral.

La evidencia de una relación entre la infección por VP y evolución hacia la malignidad están apoyadas por estudios experimentales y por la observación de ciertos cánceres naturales en los cuales el virus interacciona con los iniciadores de transformación, como los carcinógenos químicos en el carcinoma de conejo y fibropapiloma bovino. Considerando que las infecciones por VP ejercen un importante rol en el cáncer cervical y, dado que los tumores malignos inducidos por VP parecen requerir la interacción con iniciadores, se podría considerar que el VHS2 ejerce un efecto sinérgico como cofactor en el desarrollo del cáncer de cuello uterino, por lo menos en un subgrupo de pacientes con patología cervical.

Teniendo en cuenta referencias previas de la asociación de ciertos tipos de virus con distintas lesiones del cérvix, se trató de examinar la frecuencia de los cuatro tipos más relacionados con patología genital (VP 6, 11, 16 y 18), desarrollando una tecnología que permitiera una rápida tipificación sobre muestras de volumen pequeño. Los resultados confirman la presencia más frecuente de los VP 6 y 11 en lesiones menos severas y de los VP 16 y 18 en las más graves.

virales pueden hallarse en la población estudiada, ya que, en condiciones no estrictas de hibridación, usando las sondas mixtas VP 6-11, se detectaron 13% de positivos y utilizando la sonda VP 16-18, se halló 11% de positividad. El seguimiento de un limitado número de pacientes mostró que las regresiones y la persistencia estuvieron asociadas con la presencia de los VP 6 y 11 (o los con ellos relacionados) y en los casos de progresión se detectó VP 18.

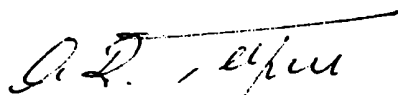
Es importante destacar que la presencia de ADN o antígenos de VP en tejidos normales podría indicar infecciones subclínicas, resultando de interés el seguimiento de estas pacientes.

Las evidencias epidemiológicas señalan una asociación del cáncer cervical con algún tipo de agente infeccioso; si se tomaran en cuenta todos los estudios realizados hasta el presente parecería que el riesgo de cáncer cervical aumenta 100 veces si se detectan los VP 16 y/o 18 (195). La experiencia epidemiológica indica que una magnitud de ése orden probablemente refleje causa y efecto, pero también debe ser considerada la posibilidad de que los tejidos malignos podrían favorecer la integración del ADN viral y todavía debe demostrarse que la presencia de un tipo determinado predice el desarrollo del cáncer.

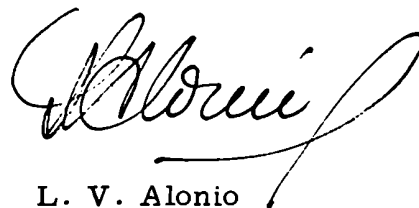
Para establecer la patogénesis de la neoplasia cervical no puede considerarse un solo factor en la inducción y el mantenimiento del estado neoplásico ni aún se puede afir-

mar que un mismo factor tenga semejante capacidad operativa en las distintas poblaciones estudiadas. Muchos factores están involucrados en la génesis de la neoplasia intraepitelial y el carcinoma invasor: algunos pueden ser importantes en la iniciación del estado neoplásico; otros pueden serlo en la progresión del cáncer invasor.

Los resultados del presente estudio aportan nuevas evidencias de una probable interacción de los VP con iniciadores; en nuestro grupo de pacientes, las infecciones herpéticas recurrentes y la expresión de proteínas tempranas de VHS2 podrían estar involucradas en eventos iniciadores, actuando sinérgicamente con los VP en el desarrollo tumoral.



Dr. ANGELICA R. TEYSSE  
Dto. VIRUS



L. V. Alonio

A N E X O

TECNICAS APLICADAS

1. PREPARACION DE ESPECIMENES PARA ESTUDIO

Biopsias: se obtienen bajo control colposcópico y se orientan sobre papel de filtro.

- Fijación: se realiza en fijaciones diferenciales según la metodología a emplear posteriormente.

.Técnica de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia: fijación con formaldehído 10% durante 1 hora.

.Técnica de hibridación "in situ": fijación con una mezcla de etanol cloroformo 2:1 durante 3 hs; alternativamente, con formaldehído al 4% (en tampón pH 7 ) durante 30 min-1 h. (1)

- Deshidratación: mediante pasaje por alcoholes de graduación creciente: 70°, 80°, 90°, 100°, 3 hs cada pasaje, con una renovación intermedia.

- Clarificación con benceno: dos baños de 2 hs cada vez.

- Impregnación en parafina: dos baños de parafina líquida a 55°C durante 3 hs cada vez.

- Inclusión definitiva: colocación de las piezas en moldes y cobertura con parafina fundida y calentada a 60°C. Solidificación rápida de la parafina mediante inmersión de los moldes en agua fría.

- Secciones: de cada biopsia, se efectúan cortes seriados de 5 µm; el número de cortes por portaobjeto es superior a 6. Se secan en estufa a 60°C.



Extendidos Citológicos: células de hisopado cervical. Se obtienen en el mismo momento que las biopsias.

Fijación:

- Test de inmunofluorescencia: fijación con acetona fría durante 20 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$
- Estudios citobógicos: fijación en Bouin 20 min. a temperatura ambiente.

## 2. TINCION CON HEMATOXILINA EOSINA (196)

Biopsias:

- Desparafinación: los portaobjetos se colocan en vasos de Koplín y se efectúan 3 pasajes por xilol y dos con alcohol absoluto
- Hidratación: mediante pasaje por etanol  $96^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$  y varios cambios en agua destilada.
- Tinción con hematoxilina de Harris (Biopur); dejar 30 seg. y virar al azul con gotas de agua corriente. Lavado con agua destilada.
- Eosina: (solución alcohólica al 1%); dejar las muestras 1 min. en alcohol  $96^{\circ}$  y luego efectuar un pasaje rápido por eosina alcohólica; lavar con alcohol  $96^{\circ}$ , dejando sumergida durante 1 min; luego pasar a alcohol  $100^{\circ}$  durante 1 min.
- Montaje: con Bálsamo de Canadá o medio de montaje sintético y cubreobjeto.

3. TECNICA PAS (PEROYODIC ACID SCHIFF). (197)

Desparafinación: tres pasajes por xilol y dos por etanol absoluto.

- Hidratación: por pasaje por alcoholes de graduación decreciente: 90°, 80°, 60° y varios lavados con agua destilada.
- Sumergir los portaobjetos en ácido peryódico al 0,5% durante 5 min..
- Lavar con agua destilada y tratar con el reactivo de Schiff; inmediatamente, tratar tres veces consecutivas con agua sulfurosa recién preparada, durante 2 min. cada vez.
- Lavar con agua corriente tres veces.
- Se puede efectuar una coloración de contraste para núcleos (con hematoxilina).
- Deshidratación: por pasaje por alcoholes de graduación creciente: 60°, 80°, 96° y 100°, efectuando dos pasajes por xilol.
- Montaje: con Bálsamo de Canadá o medio sintético de montaje

Reactivos:

Acido Periyódico: solución acuosa al 0,5%.

Reactivo de Schiff: 1 g. de fucsina básica

200 ml de agua destilada

Disolver en caliente, enfriar y filtrar.

Agregar: 1 g. de bisulfito de sodio ( o bien,  
3 ml de una solución acuosa al 33%)

Al cabo de una hora, agregar 20 ml de ácido

clorhídrico 1N. Puede emplearse a las 24 hs cuando haya tomado una coloración amarillenta (cuando envejece, toma un color rojizo).

Agua Sulfurosa: 10 ml de solución de bisulfito de sodio al 10%.

200 ml de agua corriente

10 ml de ácido clorhídrico 1 N

#### 4. METODO PAPANICOLAU

- Se hidratan las células fijadas por pasajes por alcoholes 80°, 70°, 50° y agua destilada.
- Teñir con hematoxilina de Harris por 5 min.
- Lavar con agua destilada
- Lavar 4 veces con solución acuosa de ácido clorhídrico al 0,5%.
- Lavar con agua corriente durante 10 min.
- Dejar unos minutos en una solución débil de carbonato de litio.
- Lavar con agua corriente.
- Deshidratar mediante pasajes por alcoholes 50°, 80° y 95°.
- Colorear con solución OG 6 2 min.
- Lavar 10 veces en alcohol 96° para quitar el exceso de colorante.
- Teñir con EA 36 durante 2 min.
- Lavar con alcohol 96° (solución nueva)
- Pasaje por alcohol 100° y xilol
- Montaje con Bálsamo de Canadá o medio de montaje sintético.

#### Reactivos

Solución débil de carbonato de litio: 10 gotas de dilución saturada en 100 ml de agua destilada.

OG 6: Orange C solución al 0.5% en alcohol etílico 96°:  
100 ml;

Acido Fosfotúngstico:

0,015 g.

EA 36: Verde luz solución al 0,5% en alcohol etílico 96°:  
45 ml.

Pardo Vismar, solución al medio en alcohol etílico 96°:  
10 ml

Eosina alcohólica al 0,5% en alcohol etílico:  
45 ml

Acido fosfotúngstico:

0,2 g

Carbonato de litio:

1 gota.

##### 5. PURIFICACION DEL VIRUS PAPILOMA BOVINO (120)

- Los fibropapilomas bovinos se lavan con glicerina al 50% en solución de cloruro de Na 0,15 M durante 2 semanas, efectuándose varios cambios.
- Se separa la parte epitelial del tumor (que contiene al virus) y se desmenuza.
- Aproximadamente 40 g de fragmentos se homogenizan a 0°C en una Sorvall Omni Mixer con 80 ml de tampón de extracción (fosfato de Na 0.02 M, ClNa 1 M, pH 8). Aplica durante 60 seg, 10 Kc/

seg.; se repite 3 o 4 veces.

- Se centrifuga a 7000 rpm durante 30 min, y el precipitado se resuspende en 20 ml de tampón de extracción y se centrifuga nuevamente; el sobrenadante se guarda.
- Se mezclan los fluídos sobrenadantes y se incuban con tripsina (Difco) y Sarkosil NL 97 (Geigy) en concentraciones de 0,25 y 0,01%, respectivamente, durante 60 min, a 37°C y 60 min. en baño de hielo.
- Las partículas virales se sedimentan por centrifugación a 100.000 g (Rotor 30: 27.000 rpm, durante 90 min) y se resuspenden en 5 ml de colgenasa (2 mg/ml) diluída en tampon de extracción. Se incuba 1 hora a 37°C.
- Se centrifuga a 100.000 g durante 90 min. El sedimento se resuspende en 1 ml de tampón ClNa 0,05 M, EDTA 0,01 M, fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4.
- Se distribuyen alícuotas de la suspensión viral sobre tubos con cloruro de Cesio (1,3 g/ml en el mismo tampón); se centrifugan a 34.000 rpm (Rotor SW 34) durante 24 hs a 4°C. Se observan generalmente dos bandas correspondientes a partículas vacías y las completas, Las bandas homólogas de cada tubo se mezclan y se dializan frente al mismo tampón.
- A la suspensión dializada, se le agrega cloruro de Cesio, hasta llegar a la concentración de 1,3 g/ml y se centrifuga como en el paso anterior.
- Las bandas virales se colectan, dializan y concentran al

al vacío hasta un volumen de 0,3 ml; el mismo se distribuye sobre un gradiente de sacarosa del 21 al 61% (volumen de 4,5 ml) y se centrifuga a 25.000 rpm durante 3 hs (Rotor Spinco SW 39). Las partículas virales se colectan y dializan frente a tampón de fosfato 0,05 M, M EDTA 0,001 M, ClNa 0,1 M, pH 7,4.

- Se determina el contenido de proteínas por Lowry usando como estándar albúmina bovina.
- Las partículas virales pueden observarse al microscopio electrónico por coloración negativa.

#### 6. TINCION NEGATIVA PARA MICROSCOPIO ELECTRONICO

- Se coloca el material en grillas de cobre para microscopio electrónico; se deja secar al aire.
- Se vierte una pequeña gota de ácido fosfotúngstico al 2% en agua destilada. Se quita el exceso con papel secante y se deja secar al aire.

#### 7. TITULACION DEL VIRUS PAPILOMA POR HEMAGLUTINACION (120)

Solamente los glóbulos de ratón son aglutinados por el virus Papiloma bovino, no existiendo diferencias entre cepas de ratones.

- Se colecta la sangre por punción cardíaca en solución del Al-sever o con jeringa heparinizada.
- Se prepara una suspensión de glóbulos rojos al 0.7% en tampón de fosfato de sodio 0,05 M ClNa 0,15 M, pH 7,2 (la aglutina-

ción ocurre entre los pH 6,8 y 8,4).

- Se hacen diluciones al medio (a partir de 1/10) del virus.
- Se mezclan 0,2 ml de dilución de virus con 0,2 ml de suspensión de glóbulos rojos de ratón. Se agita y se deja reposar 3 a 4 hs a 4°C (la aglutinación ocurre entre 4 y 12°C, no observándose entre 22 y 37°C).
- Se lee agitando los tubos y observando la aglutinación en el fondo del tubo. Tanto las partículas enteras como las vacías son capaces de aglutinarse. El virus producido estimado por su actividad hemaglutinante es variable (entre 5 x 10 a 10<sup>4</sup> unidades hemaglutinantes por gramo de material inicial); dicha variabilidad también se observa en las concentraciones proteicas obtenidas (entre 0,8 a 100 µg/g de material de partida).

## 8. PREPARACION DEL INMUNOSUERO ANTI VIRUS PAPILOMA (ANTI VP) (16)

### a) Obtención de la Proteína Común del Género Papiloma

Se mezclan 0,3 ml de suspensión viral (10.240 unidades hemaglutinantes/ml), 30 µl de dodecil sulfato de sodio al 10% y 5 µl de 2 mercaptoetanol. Se calienta a 68°C durante 2 min. La mezcla se lleva a 1,2 ml con solución salina tamponada (0,15 M ClNa; 0,05 M fosfato de sodio, pH 7,2).

### b) Suero Control Negativo o Preinmune

Previo a la inmunización con la proteína viral, se procedió a sangrar a los conejos.

### c) Suero Anti VP

Se inoculan 3 conejos, por vía subcutánea, con la proteína

viral, la cual se emulsiona con adyuvante de Freund completo. El plan de inmunización es el siguiente: día 1, 500  $\mu\text{g}$ ; día 28, 120  $\mu\text{g}$ ; día 38, sangría por punción cardíaca.

d) Absorción de los Inmunosueros

Los sueros obtenidos en conejos se absorben a fin de eliminar posibles inespecificidades provenientes de los restos proteicos que podrían ser arrastrados durante las etapas de purificación. Para ello, se mezclan partes iguales de suero con homogenato de piel bovina y humana. La absorción se efectúa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 hs, con agitación constante. Luego, los sueros centrifugados a 8000 rpm y los sobrenadantes se fraccionan y guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

e) Ensayos de Reactividad

La especificidad de los inmunosueros puede demostrarse por la técnica inmunoperoxidasa aplicada sobre cortes seriados de verruga plantar humana (rica en contenido viral); como controles negativos, se pueden utilizar epitelio cervical humano normal, piel humana normal u otras lesiones de piel no veruugosaş.

f) Titulación del Inmunosuero

Se puede efectuar por la técnica inmunoperoxidasa. Se prueban diluciones seriadas sobre cortes de verruga plantar.



## 9. PROPAGACION DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (VHS2)

### a) Células

El VHS2 infecta productivamente diversos sistemas celulares, tales como las línea VERO (riñón de mono verde), RK 13 (riñón de conejo), Hep 2 (carcinoma de laringe humana), etc. Sin embargo, para los fines del presente estudio, se prefirió para la propagación viral la línea RK 13, por ser el conejo la especie en que se preparó el suero anti VHS2. Para ensayos de titulación, se emplearon células Hep 2.

Las células RK 13 se cultivan en medio MEM Earle con 5% de suero fetal bovino, 5% de suero de ternera y 0,075% de bicarbonato de sodio. Las células Hep 2 se cultivan con medio MEM Hanks adicionado con 10% de suero de ternera, 1% de glutamina (al 3% p/v).

### b) Virus Herpes simplex Tipo 2

La cepa es originaria del Instituto Pasteur (París); se propaga sobre células RK 13, a baja multiplicidad de infección (0,1 unidades formadoras de placa por célula):

- Extracción de los medios de cultivo de los frascos con células a inocular.
- Inoculación del virus (0,5 ml para frascos de 60 mm<sup>3</sup>) e incubación con agitación rotatoria durante 1 h a 37°C.
- Retiro del inóculo y lavado de la monocapa con medio de cultivo fresco; agregado de medio de mantenimiento

(MEM Earle 2% de suero de ternera, 1% de antibiótico) e incubación por 24 hs a 37°C.

- Se retira el sobrenadante si las células no se han desprendido y se libera el virus intracelular mediante de tres ciclos de congelación y descongelación de la monocapa.
- Se resuspende en 5 ml de medio de mantenimiento y la suspensión viral se clarifica por centrifugación a 9000 rpm con el objeto de eliminar restos celulares. El sobrenadante se recupera y fraccionado, se congela a -70°C.

#### 10. TITULACION DEL VIRUS

- Se siembra una suspensión de células Hep 2 (300.000 cél/ml) en microplacas de 96 fosas y se deja hasta el día siguiente a 37°C.
- Se inoculan por triplicado diluciones logarítmicas del virus (50 µl/fosa) (las diluciones se efectúan con medio de mantenimiento); se deja absorber 1 h a 37°C, al cabo de la cual se lava la monocapa y se agregan 100 µl de medio de mantenimiento a cada fosa. Se incuba a 37°C por 24 hs. Se determina la dilución viral que produce la destrucción del 50% de la monocapa (DI50).

#### 11. PREPARACION DEL INMUNO SUERO ANTI VHS2

a) Inoculación de Conejos y Cobayos (166)

Se inoculan los animales con suspensión viral clarificada ( $10^3$  DICT 50/ml) 3 ml (cobayo: 0.5 ml) por vía intraperitoneal y 3 ml por vía intramuscular. Al cabo de 7 días, se repite la inyección y a los 21 días se sangra. Para mantener un título de anticuerpos adecuado, el animal se puede re-estimular con suspensión viral, cada 3-4 meses.

b) Absorción del Inmunesuero

Cada ml de suero se absorbe con 30 millones de células RK-13 lisadas, igual número de células Hep 2 lisadas, 1 mg de polvo de riñón de conejo. La absorción se realiza a  $37^{\circ}\text{C}$  y en agitación constante durante 24 hs, luego de lo cual el suero se centrifuga a 9000 rpm y el sobrenadante se fracciona y guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

c) Ensayos de Reactividad

- Células HEp 2 o RK 13 infectadas con VHS2 durante 4 y 24 hs se recogen luego de un breve tripsinado y se lavan repetidas veces con tampón de fosfato 0,05 M, ClNa 0,15 M, pH 7,4.
- Se ajusta la concentración a  $0,5-1 \times 10^6$  cél/ml y se distribuyen en portaobjetos para inmunofluorescencia y se dejan secar al aire.
- Las células se fijan con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min.; luego de lo cual se pueden almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al mismo

tiempo, se preparan de la misma forma portaobjetos con células no infectadas como control negativo.

- La especificidad del suero se demuestra por inmunoperoxidasa frente a células infectadas y fijadas; como control negativo se colorean células no infectadas y epitelio cervical normal.

## 12. TECNICA INMUNOPEROXIDASA

### Metodología

- Las biopsias incluídas en parafina se cortan en secciones de 4-5  $\mu\text{m}$  y se fijan en portaobjetos tratados con gelatinas o albúmina, se secan en estufa entre 40-50°C.
- Colocar los portaobjetos en vasos Koplín y desparafinar efectuando varios cambios con xilol; colocar en alcohol 100°. Tratar los cortes durante 30 min con solución de agua oxigenada-etanol, a fin de eliminar la actividad peroxidasa endógena (presente en leucocitos, glóbulos rojos y otras células).
- Efectuar pasajes por etanol 96°, 80° y varios cambios con agua destilada.
- Dejar durante 10 min. en tris salino suero (se puede cubrir con suero solo). Esta incubación previene la unión inespecífica de proteínas a algunos tejidos, especialmente colágeno.
- Secar cuidadosamente los portaobjetos alrededor de las secciones y vertir varias gotas de la dilución del primer

- antisuero (anti virus). Se incuba en cámara húmeda a 4°C durante 30 min-24 hs. Hay que determinar el tiempo óptimo, el cual puede acelerarse efectuando la incubación a 37°C durante 1 h, cuidando que no se sequen los cortes para evitar la aparición de fondo inespecífico.
- Colocar los preparados nuevamente en el Koplín y lavar con tris salino suero, cambiando el buffer varias veces; luego, dejar 2 hs en la misma solución.
  - Secar los portaobjetos alrededor de los cortes y vertir el segundo antisuero (anti gammaglobulina de conejo). Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 min.
  - Eliminar el tercer antisuero lavando con tris salino solución y dejando los preparados sumergidos durante 10 min. en tris stock, efectuando un cambio.
  - Revelar con DAB vertiendo el reactivo sobre los cortes. Se puede controlar bajo microscopio la aparición de color marrón, la cual sobreviene por lo general rápidamente, entre 2-10 min (tiempos mayores pueden determinar la aparición de fondo inespecífico).
  - Interrumpir el revelado, sumergiendo los portaobjetos en agua destilada. Efectuar varios cambios y luego tratar cada portaobjeto con algunas gotas de tetróxido de osmio al 0,1% durante 2 seg., lavando inmediatamente con agua destilada. Aunque no es obligatorio, este tratamiento acentuará la coloración y evitará la difusión del color, proceso que ocu-

rre durante los siguientes días o semanas.

- Coloración de contraste: con hematoxilina de Harris; dejar 30 seg. y vertir agua de la canilla para que vire al azul. Lavar con agua destilada.
  - Deshidratar los cortes mediante pasajes de 1 min. por alcoholes de 80°, 90° y 100° (dos cambios c/u) y por xilol (dos cambios). Montar con medio de montaje sintético.
- Paralelamente, efectuar la coloración de un preparado control, donde se reemplaza el primer inmunosuero por suero normal de conejo.

Dilución de los Antisueros: es variable y depende del título inicial del antisuero. Primer antisuero: probar entre 1/50 y 1/500. Segundo antisuero: 1/80. Tercer antisuero: 1/250. Todas las diluciones se efectúan con tris salino suero.

Conservación de los Inmunosueros: tanto los puros como los diluídos se conservan a -20°C o temperaturas aún menores. Es aconsejable hacer una dilución 1/10, fraccionar y congelar, para evitar maniobras de congelamiento y descongelamiento.

Solución Reveladora: 30 mg de diaminobencidina disuelta en 100 ml de tris salino, preparada cada vez que se va a usar y en los instantes previos a su empleo, se agrega agua oxigenada de 30 volúmenes (0,03-0,3%).

Solución de Tetróxido de Osmio: se prepara al 1% en agua destilada y se conserva congelada y en la oscuridad. Se usa 0.1% en tris salino.

Solución Tris Stock: (pH 7,6: 0,5, M) 60,57 g de tris (hidroximetilamino metano) en 500 ml de agua destilada. Se agrega ácido clorhídrico 1 N (aproximadamente 376 ml) hasta alcanzar el pH 7,6 y se completa el volumen con agua destilada hasta 1000 ml. Ajustar el pH nuevamente.

Tris Salino: una parte de tris stock y 9 partes de solución fisiológica (pH 7,6 0,05 M)

Tris Salino Suero: tris salino más 1% de suero normal de cerdo (especie en la cual se obtuvo el antisuero secundario). Ajustar el pH a 7,6.

Solución de Gelatina: 15 ml de solución de gelatina al 5% en un litro de agua tibia, se utiliza para levantar los cortes luego de seccionarlos. Los portaobjetos se dejan 24 hs en estufa a 40-50°C.

Solución para Eliminar la Peroxidasa Endógena: agua oxigenada de 30 volúmenes (comercial) diluída al 10% en metanol o etanol.

13. TECNICA INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE RODAMINA-FLUORESCINA

a) Marcación de la Globulinas Anti Cobayo (preparada en cabra)  
(Sigma)

- Diluir las globulinas con solución salina (0,85% de ClNa) hasta obtener una concentración final de 3%
- Ajustar el pH de las globulinas a 9,0-9,5 con una mezcla de partes iguales de solución 0,5 M de carbonato y bicarbonato de sodio.
- Poner las globulinas en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético en la heladera y agregar el isotiocianato de rodamina (Sigma) poco a poco, en un período de 3 a 4 hs. Se agrega 0,016 mg de rodamina por mg de globulina. Dejar agitar lentamente 24 hs.
- Poner las globulinas conjugadas en una membrana de diálisis y dializar con agitación contra solución salina tamponada (fosfato de potasio 0,01 M, ClNa 0,85%, pH 0,7) durante 3 días, agregando Dowex 2-X4 para acelerar la diálisis.

b) Evaluación del Conjugado

- Se evalúa por inmunofluorescencia sobre células HEp 2 infectadas y fijadas, incubando primero con una dilución 1/100 del antisuero anti virus Herpes simplex tipo 2, durante 30 min. a 37°C y lavando durante 30 min con tampón de inmunofluorescencia (IF) (fosfato de sodio 0,5 M, ClNa 0,15 M, pH 0,6).
- Se incuban diluciones seriadas del conjugado efectuadas con el tampón de IF durante 30 min a 37°C y se lavan por 30 min con el mismo tampón.
  - Se lava con agua destilada por 5 min y se colorea con azul de Evans (1%) durante 5 min y luego se enjuaga con agua destilada.



Se montan con glicerina tamponada (partes iguales de glicerina y tampón de IF).

c) Inmunofluorescencia

- Desparafinación: dos pasajes por xilol, 10 min cada vez.
- Hidratación: pasaje por alcoholes de graduación decreciente y varios lavados con agua destilada.
- Dejar 10 min en tampón de IF adicionado con 1% de suero de cabra.
- Escurrir el portaobjetos y evitando el secado, cubrir las secciones con una mezcla de partes iguales de sueros anti virus Papiloma (preparado en conejos) y anti virus Herpes simplex tipo 2 (preparado en cobayos), cada uno diluído 1/60 (dilución final 1/30); incubar en cámara húmeda toda la noche a 40 °C .
- Lavar dos veces con tampón de IF, 15 min. cada vez.
- Cubrir las secciones con una mezcla de partes iguales de suero anti inmunoglobulina de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (cabra) (Instituto Pasteur) (dilución 1/50) y suero anti gammaglobulina de cobayo marcado con isotiocianato de rodamina (dilución 1/50). Incubar a 37°C durante 30 min.
- Lavar dos veces con tampón de IF, 15 min cada vez.
- Lavar una vez con agua destilada durante 5 min.
- Coloración de contraste: se colorea con azul de Evans durante 5 min y se enjuaga con agua destilada.

- Se montan con glicerina tamponada.

Observación: Microscopio Zeiss provisto de filtro KP 490 S 525.

14. PREPARACION DEL INMUNOSUERO ANTI PROTEINAS TEMPRANAS

Purificación de las proteínas no estructurales ICP 11/12  
(167)

- a) Purificación del ADN utilizado en la columna cromatográfica: se emplean timos de ternera; se les extrae la grasa y el tejido conectivo, se cortan y pesan. Por cada 50 g de tejido, se agregan 250 ml de solución A (sacarosa 0,5M, cloruro de calcio 0,0033 M y 22,5 ml de tripsina 2%). Se incuban a 37°C con agitación durante 2 hs.
- Se filtra 4 veces por gasa doble. El filtrado se centrifuga a 1000 rpm durante 10 min. Se repiten los lavados hasta obtener un sobrenadante claro. Los núcleos aislados se resuspenden en solución B (sacarosa 0,25 M, cloruro del calcio 0,03) y se repite el filtrado por gasa. El filtrado se centrifuga a 1000 rpm durante 7 min., repitiéndose los lavados hasta la obtención de un sobrenadante claro.
- Los núcleos aislados se suspenden en 100 ml de solución B y se purifican sobre Ficoll (20 ml de solución Ficoll 100 g/ml, mezclados con 55 ml de solución A). Los núcleos se colectan en el fondo del tubo.
- Los núcleos purificados se lavan con solución C (saca-

rosa 0,32 M; cloruro de magnesio 2 mM; fosfato de potasio 1 mM, pH 7,3) centrifugando a 600 g durante 10 min. El sedimento se resuspende en solución hipotónica (ClNa 10 mM, cloruro de magnesio 2 mM, fosfato de potasio 1 mM, pH 7,3) ajustándose la concentración a 10 millones de núcleos/ml. Se incuba 20 min a 0°C, se homogeniza y se centrifuga 1000 rpm por 10 min. El sedimento se resuspende en 35 ml de hidróxido de sodio 0,2 M, dodecilsulfato de sodio 1%, incubándose durante 2 hs a 37°C, con agitación constante. Al cabo de dicho lapso, se agregan 27 ml de acetato de sodio 3 M (pH 4,7) y se incuba a 0°C por 30 min. Se centrifuga 5 min a 8000 rpm y se recupera el sobrenadante.

Al sobrenadante se le efectúan 10 extracciones con fenol-cloroformo (1:1), centrifugando cada vez y descartando la fase inferior. Luego se lava 3 veces con un volumen de éter frío, descartando la fase superior cada vez. Al final del último lavado se agregan 4 ml de cloruro de sodio 5 M y 2 volúmenes de etanol frío, dejándose toda la noche a -20°C. La precipitación de ácidos nucleicos se acelera mediante centrifugación a 10.000 rpm. El sedimento se seca al vacío y luego se resuspende en agua destilada estéril y se mide la densidad óptica a 260 nm y 280 nm, determinándose la relación 260/180, la preparación se considera pura, si dicha relación es superior a 1,8, el ADN

obtenido se precipita con etanol y se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

b) Preparación del extracto celular (165)

- Frascos con  $8 \times 10^6$  células se infectan con  $1,6 \times 10^8$  UFP (unidades formadoras de placas) de VHS2. Después de la absorción (1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ ) se lava la monocapa y se adiciona medio frasco conteniendo una mezcla de aminoácidos marcados con  $\text{C}^{14}$  ( $2 \mu\text{ci/ml}$ ). Luego las células se colectan a las 18 hs post-infección; se lavan 3 veces con tampón de fosfatos 0,05 M, pH 7,4, ClNa 0,15 M; se centrifuga y congela el sedimento a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- El sedimento se resuspende en tris ClH 20 mM, pH 0,5, ditiotreitól 0,5 M, ajustándose la concentración celular a  $1-3 \times 10^7$  cél/ml.
- Las células se sonicán (20 min a 9 Kc) y se agrega un volumen igual del mismo tampón para obtener una concentración final de ClNa 1,7 M y EDTA 5 mM, dejando 40 min a  $0^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugación a 30.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min. El extracto soluble se dializa toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  frente al tampón DE (tris ClH 50 mM, pH 7,5; ditiotreitól 0,5 M, 0,2% de Nonidet P-40; 20% glicerol). Luego se centrifuga a 15,000 rpm durante 20 min; el sobrenadante se emplea para la purificación de las proteínas ICP 11/12.

c) Cromatografía en DEAE-Celulosa:

- Se prepara una columna de 2 x 20 cm de DEAE celulosa (DE52 Whatman) y se aplica a la muestra (sobrenadante obtenido en el paso anterior) con 2 volúmenes de tampón DE y la proteína se eluye con 150 ml de un gradiente de CL 0,3M. Se mide la radioactividad y se recoge el 2do pico, el cual se dializa frente a tampón DE. El eluido dializado se aplica a una columna de fosfoceulosa (p11 celulosa Whatman) (previamente lavada con albúmina bovina 500 µg/ml en DE). La columna se eluye con 2 volúmenes de tampón DE y las proteínas ICP 11/12 se eluyen con un gradiente CIK (0,1-0,4 M) en DE; de cada fracción se toma la radioactividad (por precipitación con TCA). Se juntan todas las fracciones del pico que contiene las proteínas ICP 11/12 y se ajusta la concentración a 500 µg con albúmina bovina y se dializa frente a CIK 50 mM.

d) Cromatografía ADN-Celulosa:

- Preparación de la columna de celulosa: la celulosa se lava varias veces con etanol caliente y luego sucesivamente con OHNa 0,1 M, EDTA 1 M, ClH 10 mM, hasta neutralizar. Se liofiliza y guarda hasta su uso.
- Una solución de ADN de timo de ternera (1-3 mg/ml en tampón tris ClH 10 mM, pH 7,4, 1 mM EDTA); se le agrega la celulosa purificada y seca (1 g de celulosa/3 ml de solución de ADN) hasta formar una pasta. Se deja secar en caja de Petri a temperatura ambiente, cubierta con una

gasa; luego se muele con una varilla de vidrio y se liofiliza. El polvo seco se resuspende en 20 volúmenes del tampón mencionado y se deja un día a 4°C. Se lava brevemente para remover el ADN libre y la mezcla ADN/celulosa se guarda a -20°C diluída con tris ClH 10 mM, EDTA 1 mM, ClNa 0,15 M.

- Se arma la columna y se lava con tampón DE. Se aplica la muestra y se eluye secuencialmente con ClK 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M y 1 M; este último eluido contiene las proteínas tempranas. Las fracciones se unen y dializan frente ClK 50 mM y se liofilizan.

e) Obtención del Inmunosuero

- La proteína se homogeniza con adyuvante de Freund completo; se inyectan conejos con 10 µg de proteína pura (en patas delanteras ); a las dos semanas, los animales reciben una nueva inyección (en patas traseras). Los animales fueron sangrados a los 10 días.

f) Especificidad del suero

Luego de ser absorbido como se indica en la pág.153, su especificidad se demostró (por IP) frente a células HEp 2 infectadas con VHS2 durante 4 hs y fijadas en acetona fría.

15. PROPAGACION DE VIRUS PAPILOMA (VP) CLONADOS EN EL PLASMIDO PBR 322 (1)

A) Transformación Bacteriana

### Resistencia a Antibióticos

El plásmido PBR 322 otorga a la bacteria *Escherichia coli* (HB 101) resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina, pero en los procesos de clonado que implican el corte del ADN del plásmido frecuentemente se destruyen los sitios que codifican en el mismo la resistencia a antibióticos.

Plásmido PBR 322 ADN VP 6b; PBR 322-ADV VP 11; PBR 322-ADN VP 16. Son ampicilina resistentes y tetraciclina sensibles.

Plásmido PBR 322-VP 18: En el clonado, se empleó para cortar el ADN del plásmido, la enzima EcoRI que no inactiva los sitios de resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina, por lo cual la bacteria transformada crece en presencia de ambos antibióticos.

Bacteria *Escherichia coli* (HB 101): es resistente a la estreptomycinina por lo que el agregado de este antibiótico al medio previene la proliferación de otras bacterias. Es sensible al cloranfenicol, por lo que el agregado de este antibiótico al medio amplifica la producción del plásmido (sólo se produce síntesis de ADN).

- 1) Sembrar 0,5 ml de un cultivo de 24 hs de *E. coli* HB 101 en 50 ml de caldo LB.
- 2) Incubar a 37°C con agitación constante hasta que la absorbancia a 600 nm sea igual a 0,2.
- 3) Incubar 10 min en baño de hielo con el objeto de detener el cultivo.

- 4) Centrifugar 15 min a 3000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- 5) Resuspender el pellet en 10 ml de cloruro de calcio 50 mM estéril frío.
- 6) Incubar 20-25 min a 0°C con agitación periódica.
- 7) Centrifugar 15 min a 3000 rpm a 4°C.
- 8) Resuspender en 0,5 de cloruro de calcio estéril frío.
- 9) Fraccionar en tubo Eppendorf, 0,2 ml por tubo
- 10) Incubar 24 hs entre 0 y 4°C.

#### Tranformación

- 1) Agregar a 0,2 ml de bacterias E. coli 10 µl de plásmido diluído. Trabajar en paralelo con otro tubo, sin agregar plásmido que servirá de control.
- 2) Incubar ambos tubos a 0°C durante 10 min.
- 3) Incubar ambos tubos durante 2 min exactamente a 42°C  
En este punto, se puede dejar hasta una hora a temperatura ambiente.
- 4) Agregar a cada tubo 1 ml de caldo LB precalentado a 37°C
- 5) Incubar 1 h a 37°C
- 6) Sembrar 100 µl por placa, según el siguiente esquema:
  - Bacterias control: a) agar LB; b) ampicilina + tetraciclina, medio 63 Bl.
  - Bacterias transformadas con el plásmido PBR 322 conteniendo los tipos 6b ó 11, ó 16: a) agar LB; b) ampicilina medio 63 Bl; c) tetraciclina en medio 63 Bl.



Incubar las placas invertidas durante 36 hs a 37°C.

Resultado esperado

- Bacterias no transformadas (control): a) crecen; b) no crecen.
- Bacterias transformadas: a) crecen; b) sólo crecen las bacterias que portan el plásmido; c) no crecen pues en el clonado, el plásmido fue cortado con la enzima Bam H1 que rompe el ADN en el área del gen que codifica para la resistencia a ése antibiótico.

Una vez efectuado el plaqueo, las colonias resultantes se inoculan en caldo o directamente se utilizan los cultivos líquidos en los cuales se efectuó el plaqueo.

B) Conservación de Cepas Bacterianas Transformadas

Se siembra en medio líquido LB 2 ml de cultivo por cada 100 de caldo.

Se incuba 4 hs. a 37°C con agitación

Se agregan 0,5 de estreptomicina (34 mg/ml en etanol/agua, 1:1).

Se centrifuga el cultivo a 10.000 rpm y se resuspende en partes iguales de caldo LB y glicerina (aproximadamente 10 ml); se fracciona y congela a -70°C.

Reactivos

- 1) Caldo LB: triptona 10 g
  - Extracto de levadura 5 g
  - Cloruro de sodio 10 g
  - Agua destilada csp 1000 ml

Ajustar a pH 7,4 (con OHNa 1 M) y autoclavar.

2) Agar LB: agregar al caldo LB 1,5% de agar.

3) Soluciones de antibióticos

Tetraciclina (Tc): solución madre: 15 mg/ml (en etanol/  
agua destilada 1:1)

Ampicilina (AP): solución madre: 10 mg/ml (en agua desti-  
lada).

Estreptomicina (St): 20 mg/ml (en agua destilada);  
agregar 1  $\mu$ l/ml de medio

Medios con antibióticos: se prepara el medio LB y se  
autoclava. La solución de antibió-  
tico se agrega al medio cuando la  
temperatura llega a 56°C. Plaquear  
luego de 10 min.

4) Solución de cloruro de calcio: 100 mM en tris ClH 10 mM  
pH 8; autoclavar y conservar en la heladera.

5) Medio 63 BL: medio mínimo: solución de sales:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 3g

$\text{NaHPO}_4$  ..... 6g

Agua dest csp...1000ml

$\text{Cl NH}_4$ .....1g

$\text{MgSO}_4$ .....0,2g

Llevar a pH 7,2 y autoclavar.

### Preparación y extracción de Plásmidos Bacterianos

1) Se toma una colonia de E.coli HB 101 transformada

crecida sobre un cultivo sólido al cual se le agregó ampicilina. Se siembra en 20 ml de caldo LB adicionado con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) en Erlenmeyer de 100 ml.

- 2) Incubar toda la noche con agitación constante y a 37°C.
- 3) Se siembran 2 ml del cultivo anterior en 100 ml de caldo LB + ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ).
- 4) Se incuba 8 hs a 37°C con agitación.
- 5) Se agregan 0,5 ml de estreptomicina y cloranfenicol (34 mg/ml de etanol/agua 1:1) (estreptomicina 20 mg/ml).
- 6) Incubar toda la noche a 37°C con agitación.

Extracción (todos los pasos se realizan en baño de hielo).

- 7) Centrifugar el cultivo 10 min a 4000 rpm a 4°C; descartar el sobrenadante.
- 8) Resuspender en 10 ml de buffer T10 El.
- 9) Centrifugar 10 min. a 4000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- 10) Resuspender en 4,5 ml de solución de lisis (se preparan 5 ml en el momento).
- 11) Agregar 0,5 ml de solución de lisozima fresca (se prepara 1 ml).
- 12) Incubar 30 min. a 0°C.
- 13) Agregar 10 ml de solución alcalina fresca, mezclar por inversión.
- 14) Incubar exactamente 5 min. a 0°C.

- 15) Agregar 7,5 ml de acetato de Na 3 M, pH 5 e incubar 30 min. a 0°C.
- 16) Centrifugar 10 min. a 10,000 rpm a 4°C.
- 17) Separar cuidadosamente el sobrenadante sin contaminar el pellet.
- 18) Distribuir en tubos con capacidad de 30 ml (cónicos de plástico). Agregar 3 volúmenes de etanol frío; mezclar por inversión.
- 19) Incubar 30 min. a -70°C o toda la noche a -20°C.
- 20) Centrifugar 15 min. a 3000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- 21) Secar el pellet al vacío.

#### Purificación

- 22) Resuspender en buffer E-SDS 0,2%.
- 23) Centrifugar 15 min. a 3000 rpm a 4°C. Separar el sobrenadante sin contaminar con el pellet.
- 24) Pasar el sobrenadante a un tubo de centrífuga de plástico y agregar igual volumen de fenol/cloroformo.
- 25) Agitar 4 min. por inversión y contrifugar 2 min. a 3000 rpm a 4°C.
- 26) Separar la fase acuosa y agregar igual volumen de cloroformo.
- 27) Agitar 4 min. por inversión.
- 28) Centrifugar 2 min. a 3000 rpm a 4°C.

- 29) Separar la fase acuosa y agregar 3 volúmenes de etanol frío.
- 30) Incubar 30 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$  y centrifugar 15 min. a 3000 rpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ).
- 31) Descartar el sobrenadante y secar el pellet al vacío.
- 32) Resuspender el pellet en buffer T10 El, pH 8 estéril.
- 33) Agregar 0,1 volúmenes de solución de ribonucleasa.
- 34) Incubar 30 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 35) Agregar 3 volúmenes de etanol frío.
- 36) Incubar 30 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 37) Centrifugar 15 min. a 9000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y descartar el sobrenadante.
- 38) Secar el pellet al vacío.
- 39) Resuspender en buffer T10 El, pH 8 estéril.

A fin de controlar las plásmidos que contienen secuencias de virus Papiloma, se efectúan análisis con enzimas de restricción.

#### Digestión Enzimática de los ADN Plásmido-virus Papiloma

ADN                    16  $\mu\text{l}$

Enzima X             2  $\mu\text{l}$

Buffer M10x        2  $\mu\text{l}$

Incubar 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ ; incubar 5 min a  $70^{\circ}\text{C}$ .

Agregar tris pH 7,5        2  $\mu\text{l}$

                                  Enzima Z             2  $\mu\text{l}$

Incubar una hora a 37°C. Incubar 5 min. a 70°C.

Se puede emplear una sola enzima y verificar los patrones de restricción.

### Verificación en Geles de Agarosa

#### a) Preparación del Gel

En un Erlenmeyer de 125 ml, pesar 0,5 g de agarosa y agregar buffer de electroforesis. Colocar a bañomaría a 100°C, agitando periódicamente hasta la disolución completa. Dejar enfriar hasta los 50°C. Vertir en la cuba (directamente o se puede preparar en placas de vidrio limpio y secadas con alcohol). Colocar el peine y dejar solidificar durante una hora aproximadamente. Se retiran luego el peine y los soportes.

Se coloca el buffer de corrida a los costados de la cuba.

#### b) Siembra y Migración

A 10 µl de muestra se agregan 3 µl de solución BBP-E y se siembran. Se hace migrar del cátodo al ánodo a 150 V hasta que azul de bromofenol migre 7 cm (aproximadamente 1 h).

#### c) Coloración

Colorear por inmersión durante 15 min. en solución de bromuro de etidio.

Decolorar 1 h en sulfato de magnesio 1 mM.

Observar el gel bajo lámpara ultravioleta.

<u>Enzima</u>	<u>6b</u>	<u>11</u>	<u>16</u>	<u>18</u>	<u>PBR 322</u>
Ava I					1
Ava LL		5	6		8
Bam HI	1	1	1	2	1
Bgl II				-	
Eco RI	1	1	2	1	1
Hae III	13				22
Hind III	1	2		-	1
Hpa II	3	5		3	26
Pst I	3	6	7		1
Sma I					

### Reactivos

#### Solución Madre de Tris ClH 1 M, pH 8

12,1 g de tris se disuelve en cantidad mínima de agua; llevar a pH 8 con ClH. Enrasar a 100 ml.

#### Solución Madre de EDTA 200 mM

7,45 g de EDTA se disuelven en cantidad mínima de agua. Llevar al pH 8 con OHNa 1 N. Enrasar a 100 ml.

#### Solución de Acetato de Na 3 M, pH 5

40,8 g de acetato de Na se disuelven en cantidad míni-

ma de agua. Llevar a pH 5 con ácido acético y enrasar a 1000 ml.

Solución Madre de OHNa 4 M

1,6 g de OHNa. Llevar a 10 ml.

Solución Madre de SDS 20%

20 g de SDS (dodecil sulfato de sodio) se disuelven con agua, en caliente a bañomaría. Llevar a 100 ml.

Solución de lisis

0,9 g de glucosa + 5 ml de solución madre de EDTA 200 mM + 2,5 ml de tris ClH 1 M, pH 8 + agua destilada hasta llegar a 100 ml.

Solución Alacalina

6,25 ml de solución madre de SDS 20% + 6,25 ml de solución madre de OHNa 4 N + agua destilada en cantidad suficiente para 100 ml.

Solución de Lisozima

30 mg de lisozima/ml de solución de lisis. Preparar en el momento y mantener a 0°C.

Buffer T10 El (tris 10 mM, EDTA 1 mM)

1 ml de solución madre de tris ClH 1 M, pH 8 + 0,5 ml de solución madre de EDTA 200 mM, pH 8 + agua destilada hasta 100 ml.



Buffer E-SDS 0,2%

4 ml de tris ClH 1 M, pH 8 + 1 ml de EDTA 200 mM,  
pH 8 + 0,27 g de acetato de Na + 1 ml de solución  
madre de SDS 20% + agua destilada csp 100 ml.

Solución Madre de Ribonucleasa

1 mg de ribonucleasa en 1 ml de tris ClH 5 mM, pH 8.

Buffer M10x, pH 7,5:

ClNa	50 mM
Tris ClH, pH 7,5	10 mM
Cl <sub>2</sub> Mg	10 mM
Ditiotreitol	1 mM

Buffer de Electroforesis:

Tris	89 mM
Acido Bórico	89 mM
EDTA	2 mM

Solución de BBO-E: Azul de bromofenol 0,2% en 50% de  
glicerol y 50 mM EDTA.

Solución de Bromuro de Etidio:

40  $\mu$ l de una solución 10 mg/ml en 200 ml de agua des-  
tilada.

16. HIBRIDACION "IN SITU"

A) Técnica de Nick Translation: Preparación de Sondas Biotili-  
nadas.

En tubo Eppendrof de 1,5 ml colocar:

- 5  $\mu$ l de solución A (mezcla de nucleótidos)
- X  $\mu$ l de la solución B (1  $\mu$ g ADN fago o 1  $\mu$ g de ADN viral).
- 25  $\mu$ l de nucleótido biotilado
- Z  $\mu$ l de solución E (agua) hasta llevar a 45  $\mu$ l.

Mezclar brevemente.

Adicionar 5  $\mu$ l de solución C (ADN polimerasa y ADNasa)

Cerrar el tubo, mezclar brevemente, centrifugar a 15.000 g por 5 seg.

Incubar a 15°C por 60 min.

Adicionar 5  $\mu$ l de solución D.

Adicionar medio volumen de acetato de amonio 7,5 M y 2 volúmenes de etanol; centrifugar a 15.000 g por 5 min. y repetir la extracción con etanol.

Secar al vacío.

Reactivos: Kit Nick Translation Cat. 8160 SB Bethesda Research Lab.

Biotina 11 duTP Cat.

B) Control de la Marcación con Nucleótido Biotinilado.

1) Marcar sectores en filtros Millipore de 20  $\mu$ m de poro (los que se usan para esterilización por filtración).

Usar lápiz de grafito.

2) Colocar en el centro de cada sector 2  $\mu$ l de tipo de ADN viral biotinilado.

- 3) Colocar cada membrana Millipore entre discos de papel de filtro y colocar en caja de Petri.
- 4) Secar 15 min. a 37°C.
- 5) Secar 1 h a 70-80°C
- 6) Lavar con SSC 2x+3% BSA; dejar 15 min. a 42°C (cubiertos por el buffer)
- 7) Secar 30 min. a 70-80°C.
- 8) Lavar con SSC 2x+3% BSA, cubrir con el buffer y dejar 15 min. a 42°C.
- 9) Secar a temperatura ambiente.
- 10) Agregar 3 µl de complejo PAP streptavidina a cada sector.
- 11) Incubar en caja de Petri, colocando en la tapa un disco de papel de filtro húmedo (que debe pegarse a la misma sin tocar las membranas Millipore (cámara húmeda). Dejar 30 min. a 37°C.
- 12) Lavado con SSC2 X, dos cambios; dejar 20 min. en igual buffer.
- 13) Secar al aire.
- 14) Revelado con DAB: se corta inmediatamente que aparezca el color (aprox. 1 min.) con agua destilada.
- 15) Se pueden guardar en cámara oscura.

Reactivos:

ADN viral: (10 µg/ml) diluir con agua destilada estéril.

Solución Madre de SSC 20X: 3 M ClNa, 0,3 M citrato de Na.

Solución SSC 2X: hacer una dilución 1/10 con la solución

anterior y agua destilada.

Solución SSC 2X + 3% BSA: agregar por cada 100 ml de la solución anterior 3 g de albúmina bovina.

Solución DAB: 30 mg de diaminobencidina (Sigma): se disuelven en 100 ml de buffer tris, pH 7,5 (ver fórmula en la técnica inmunoperoxidasa).

Solución Reveladora: 10 ml de solución DAB + 0,03-0,3% de agua oxigenada común de 30 volúmenes. Se prepara en el momento y se tira lo que sobra.

Resultados Esperados (según el protocolo anterior)

En el esquema se muestra el control de tres stocks por virus. Los controles son: ADN de timo o esperma de salmón (10 mg/ml, calentado previamente a baño-maría hirviente por 10 min.).

Sin muestra: Controla al complejo streptavidina-peroxidasa.

Se agregan por cada  $\mu\text{g}$  de ADN a marcar 2,5  $\mu\text{l}$  de biotina 11 DUTP. Se debe efectuar una sola reacción por tubo, pues sino baja la eficiencia de marcación.

C) Técnica de Hibridación "in situ" 9178)

1) Preparación de las Muestras de Estudio:

- Fijación: etanol/cloroformo 2:1 durante 3 hs luego de embeber en parafina como es habitual en histología. Alternativamente: paraformaldeído al 4% en PBS 7.7 durante 30 min. Luego lavar con PBS y embeber en parafina como es habitual. Para preparados citológicos, ver al final.
  - Efectuar cortes de 5  $\mu$ m, por lo menos 4 por porta; de cada biopsia, preparar 7 portaobjetos (5 se destinan para hibridación y 2 para inmunoperoxidasa).
- 2) Desparafinar con varios cambios de xilol durante 1 h.
  - 3) Lavar con etanol absoluto dos veces.
  - 4) Inactivación de la peroxidasa endógena: incubación con etanol al 10% de agua oxigenada (de 30 volúmenes) durante 30 min.
  - 5) Lavado con etanol absoluto y luego hidratación por alcoholes de graduación decreciente (96<sup>o</sup>, 80<sup>o</sup>, 60<sup>o</sup>) y varios cambios de agua destilada.
  - 6) Tratamiento con pronasa (autodigerir la enzima previamente -ver en reactivos). Colocar los portas en cámaras húmedas y cubrir los cortes con gotas de enzima. Dejar 5 min. y lavar con PBS-glicina para inhibir la pronasa.
  - 7) Tratamiento con ARNasa pancreática 15 min a 37<sup>o</sup>C.
  - 8) Lavado dos veces con PBS durante 5 min. cada vez (colo-

car los portas en Koplín cuando se efectúan los lavados.

- 9) Post fijación con paraformaldehído 4% en PBS durante 5 min. (directamente en los Koplín).
- 10) Lavados dos veces durante 5 min. cada vez con PBS glicinado.
- 11) Deshidratación con alcoholes de graduación decreciente y luego dos cambios con etanol absoluto.
- 12) Los cortes deshidratados y secos se cubren con 10-20  $\mu$ l de mezcla de hibridación.

Mezcla de Hibridación

Condiciones Estrictas:

Formamida desionizada, pH 6,8-7,2 .....	50 $\mu$ l
Sulfato de Dextran 50% .....	10 $\mu$ l
SSC 20X .....	20 $\mu$ l
Probe (20 $\mu$ g/ml) (tipo 6 ó 18 ó 16 u 11).....	20 $\mu$ l
Carrier (10 mg/ml):ADN salmón .....	4 $\mu$ l
	<hr/>
	104 $\mu$ l

Condiciones no Estrictas:

Formamida pH 6,8-7,2 .....	10 $\mu$ l
Sulfato de Dextran 50% .....	10 $\mu$ l
Agua destilada estéril .....	30 $\mu$ l
SSC 20x .....	20 $\mu$ l
Probe (20 $\mu$ g/ml) tipo 6 .....	10 $\mu$ l
Probe (20 $\mu$ g/ml) tipo 11.....	10 $\mu$ l
Carrier (10 mg/ml: ADN de salmón .....	4 $\mu$ l
	<hr/>
	94 $\mu$ l

- 13) Colocar los portas en caja metálica (de cirugía) y someterlos a vapor o calor húmedo a 90°C por 6 min. y luego pasarlos inmediatamente a la cámara de incubación húmeda y dejarlos secar por 18 hs a 37°C.

#### Detección de Híbridos

- 14) Colocar los portas en Koplín y lavar con SSC 2X-3% BSA durante 10 min. a temperatura ambiente.
- 15) Lavar con SSC 2x -3% BSA a 37°C. durante 10 min.
- 16) Lavar con SSC 2x -3%BSA durante 10 min. a temperatura ambiente.
- 17) Lavar con tris 0,05 M -3% BSA. Efectuar dos cambios rápidos.
- 18) Escurrir bien los portas y agregar sin que se sequen 20 µl de complejo streptavidina-proxidasa (o la cantidad suficiente como para cubrir el corte). Incubar 30 min. a 37°C.
- 19) Lavar con SSC 2x dos veces durante 5 min.
- 20) Lavar con PBS-tritón 0,1% por 2 min.
- 21) Lavar dos veces con tris 0,05 M.

#### Revelado

- 22) Preparar DAB en el momento y agregarle 0,03-0,3% de agua oxigenada. Cubrir los cortes y dejar 5 min. o hasta la aparición de color; detener la reacción por lavado con agua destilada.
- 23) Fijar por pasaje por agua osmificada y luego enjuagar

repetidas veces con agua destilada.

#### Coloración de Contraste

24) Colorear con hematoxilina de Harris (débil), enjuagar con agua destilada.

#### Montaje

25) Deshidratación por pasajes de etanol de graduación creciente.

26) Deshidratación por pasaje por xilol (dos veces).

27) Montaje sintético y cubre.

#### Reactivos

Tris 0,05 M, pH 7,6 EDTA 5 mM.

Pronasa: preparar un stock de 100 mg/ml. En tris EDTA, autodigerir la enzima 2 hs a 37°C (inhibir las nucleasas). Guardar a -20°C. Al momento de usar, diluir con tris EDTA (1 mg/ml).

PBS: 0,5 M fosfato monosódico, 0,5 M de fosfato bisódico, 0,15 M ClNa.

Glicina: 1 M

PBS glicinado: 1 ml de glicina 1 M + 24 ml PBS

ARNasa pancreática: 100 µg/ml en tris EDTA.

Paraformaldehído: 4% en PBS.

Formamida desionizada: USAR LA Sigma que ya viene al pH indicado.

Probe: diluir con agua destilada estéril, 20 µg/ml

Carrier: ADN de esperma de salmón 10 mg/ml; calentar por 10 min. a bañomaría (100°C).

SSC 20X: 3 M ClMa, 0,3 M citrato de Na.



SSC 2x; dilución 1/10 con agua destilada.

SSC 2X -9% BSA: por cada 100 ml de SSC 2X agregar 3 g de albúmina bovina.

Tris - 3% BSA

Streptavidina-peroxidasa: hacer dilución 1: 300 con tris.

Agua osmificada: (ver preparación en técnica inmunoperoxidasa).

PBS tritón: PBS + 0,1% tritón.

DAB: A 5 ml de DAB 0.05% se agregan 350  $\mu$ l  $Cl_2N$ ;  $6H_2O$  al 1%.

DAB +  $H_2O_2$ : DAB + 0,01%  $H_2O_2$ .

Preparados Citológicos: fijar con glutaraldeído 0,5% en PBS 7,2 de 10 a 15 min. Luego almacenar en congeladora a  $-70^{\circ}C$ .

BIBLIOGRAFIA

1. Sanmartino, Rodolfo: Discusión sobre lesiones asociadas del útero y órganos pélvicos de posible significado etiológico en el cáncer del cérvix y del cuerpo del útero. Symposium sobre epidemiología del cáncer de cuello uterino. Editado por UICC, 14-19, 1963
2. Marcus S., Marcus C.: Primary adenocarcinoma of the cervix uteri. Am. J. Obst. Gynecol. 66: 389, 1983.
3. Pelayo Correa, A.: Symposium sobre epidemiología del cáncer de cuello uterino, Editado por OICC, 3, 1973.
4. Burghardt, E.: Diagnóstico histológico precoz del carcinoma de cuello uterino. (Ed. Salvat), 1973.
5. Fluhmann, C.F.E.: The cervix uteri and its diseases. Saunders, Philadelphia, 1961.
6. Di Fiore, M.: Diagnóstico histológico (Ed. El Ateneo) 1; 420, 1974.
7. Buckeley Ch, Butler, H.: Cervical intraepithelial neoplasia. J. Clin. Pathol. 35: 1, 1982.
8. Oriel J.: Genital warts. Sexually Transmitted Dis. 8: 326, 1981.
9. Oriel, J.: Genital warts; recent advances. Clin Exp. Dermatol. 7: 361, 1982.
10. Meisels, A., Fortin R.: Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I Cytologic patterns. Acta Cytol. 20: 505, 1976.
11. Laverty C., Booth, N., Hills E., Cossart Y., Wills E.: Non-condylomatous wart virus infection of the post meno-

- pausal cervix. *Pathology*, 10:373, 1978.
12. Orth G, Domp Martin D.; Agache, P., Favre, M., Croissant, O.: Pluralité du virus des Papillomes humains. *Ann. Dermatol. Venereol. (Paris)* 105: 279, 1978.
  13. Hills E., Lavery C.: Electron Microscopic Detection of Papillomavirus in Selected Koilocytotic Cells in a Routine Cervical Smear. *Acta Cytol.* 23, 53: 1979.
  14. Woodruff D., Braun L., Cavaleri R., Gupta P. Pass F., Pass K.: Immunologic Identification of Papillomavirus Antigen in Condyloma Tissues from the Female Genital Tract. *Obst. Gynecol.* 56: 7-17, 1980.
  15. Reid R.: Genital Warts and Genital Cancer II. Is Human Papillomavirus Infection the Trigger to Cervical Carcinogenesis?. *Gynecol. Oncol.* 5: 239, 1983.
  16. Kurman R., Sanz E., Jenson B., Perry S., Lancaster W.: Papilloma Virus Infection of the Cervix I. Correlation of Histology with Viral Structural Antigens and DNA Sequences. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1; 17, 1982.
  17. Gissman L., De Villiers E., zur Hausen H.: Analysis of Human Genital Warts (Condylomata Acuminata) and other Genital Tumors for Human Papillomavirus Type 6 DNA. *Int. J. Cancer* 29: 143, 1982.
  18. Reid R., Stanhope C.; Herschman B. et al.: Genital Warts and Cervical Cancer. Evidence of an Association between Subclinical Papillomaviral Cancer Infection and Cervical Malignancy. *Cancer*, 50: 377, 1982.

19. De Palo G., Stafano D.: Colposcopic Patterns of Condylomatous Lesions of the Uterine Cervix. *The Cervix* 1: 17, 1983.
20. Meisels A., Roy M., Fortier M. et al.: Human Papillomavirus Infection of the Cervix. The Atypical Condyloma. *Acta Cytol.* 25: 7, 1981.
21. Boon M., Fox C.: Simultaneous Condyloma Acuminatum and Dysplasia of the Uterine Cervix. *Acta Cytol.* 25: 393, 1981.
22. Crum R., Egawa K., Fu Y., Lancaster W., Barron B., Levine R., Fenoglio C., Richart R.: Atypical Immature Metaplasia: A Sub-set of Papillomavirus Infection. *Cancer*, 2214, 1983.
23. Govan A., Haines R., Langley F., Taylor C., Woodcock A.: The Histology and Cytology of Changes in the Epithelium of the Cervix Uteri. *J. Clin. Pathol.* 22: 383, 1969.
24. Richart R.: Cervical Epithelial Neoplasia. A Review. *Pathol. Ann.* 8: 301, 1973.
25. International Committte on Histological Definitions. *Acta Cytol.* 6: 235, 1961.
26. Burghadt E.: Premalignant Conditions of the Cervix. *Clin, Obst. Gynecol.* 3: 257, 1976.
27. Koss L.: Dysplasia: A Real Concept or a Misnomer? *Obst. Gynecol.* 51: 374, 1978.
28. Ferenczy A.: Cervical Intraepithelial Neoplasia. En Blains-tein A.: *Pathology of the Female Tract.* (Springer Verlag, editor) 143, 1977.
29. Rigoni-Stern D. Fatti relativi alle malattie cancerosa che servono de base alle poche cose dette dal Dott. Gior.Servire. *Prog. Pathol. Temo.* 2: 257; 1942.

30. Coppleson M.: Epidemiology of Cervical Carcinoma. En Contemporary Obstetrics y Gynecology (Northwoods Press) .348, 1977.
31. zur Hausen H.: Herpes Simplex Virus in Human Genital Cancer. Rev. Exp. Pathol. 25: 307, 1983.
32. Rotkin L.: Epidemiology of the cervix. III Sexual Characteristics of a Cervical Cancer Population. Am. J. Publ. Health 57: 815, 1967.
33. Rotkin L.: A Comparative Review of Key Epidemiological Studies in Cervical Cancer Related to Current Searches for Transmissible Agents. Cancer Res. 33: 1353, 1973.
34. Kessler I., Aurelian L.: Cancer Epidemiology and Prevention. Current Concepts. (Ed. Schottenfeld) Thomas, Springfield, Ill., 1975.
35. Singer A., Reid B., Coppleson M.: The Role of the High Risk Male Factor in Cancer of the Cervix. Am. Obst. Gynecol. 110: 126, 1976.
36. Skegg D., Corwin D., Paul C., Doll R.: Importance of the Male Factor in Cancer of the Cervix. Lancet, 581: 1982.
37. Doll R.: Etiología del Carcinoma de Cuello Uterino. En Simposio sobre Epidemiología del Carcinoma del Utero (UICC) 118, 1962.
38. Aurelian L., Kessler I.: Subclinical Herpes Virus Infections of the Genital Tract are Commonly Associated with Viral Shedding. The Cervix, 3: 235, 1985.

39. Schechter A, Avran E., Beckerman A, Ovadia J.: Perspectives of the Increasing Risk of Cervical Carcinoma in Israel. *The Cervix* 3:, 225, 1985.
40. Kumari S., Bhatia D., Agarwal S., Mitra A., Luthra U.: *Indian Journal of Medical Research* 75: 83, 1982.
41. Douglas G.: DNA Virus Herpetoviridae, E, "Principles and Practices of Infectious Diseases and their Etiologic Agents" (Ed. Wiley Medical) 1282, 1984.
42. Melnick J: Taxonomy of Viruses. En "Progress in Medical Virology", 207, 1978
43. Gentry G.A., Randal C.: The Physical and Chemical Properties of the Herpes Viruses (Kaplan Ed.) *The Herpesviruses*.
44. Munk K.: Latency of Herpes Simplex Virus: Present Knowledge and recent Developments. Conferencia Congreso Internacional del Cáncer, Budapest, 1986.
45. Rawls W. et al.: Genital Herpes in Two Social Groups. *Am. J. Obst. Gynecol.* 110: 682, 1970'
46. Hanshaw J.: Herpes Virus Hominis Infections in the Fetus and the New-born. *Am. J. Sis. Chil.* 126: 546, 1973.
47. De Thé G.: Epidémiologie des virus Herpes en médecine humaine. *Develop. Biol. Standard* 52: 13, 1982.
48. Hirsch M.: Herpes Simplex Virus. En *Principles and Practice of Diseases and their Etiologic Agents*" (Ed. Wiley Medical): 1283, 1984.

49. Watson J.D.: Biología Molecular del Gen. Fondo Educativo Interamericano (Ed.) 668, 1978.
50. Roizman B.: The Biochemical Features of Herpesvirus - Infected Cells. En "Proceedings of the 3 rd. International Symposium on Applied and Medical Virology., St. Louis, Warren Green: 37, 1971.
51. Epstein A.: Herpes Simplex Virus: Un virus no tan simple. Adel. Microbiol. Enf. Infecc. 5: 37, 1986.
52. Naib Z. et al.: Relation of Cytohistopathology of Genital Herpesvirus Infection to Cervical Anaplasia. Cancer Res. 33: 1452. 1973.
53. Nahmias A. et al: Antibodies to Herpesvirus Hominis Types 1 and 2 in Humans I. Patients with Genital Herpetic Infections. Am. J. Epidemiol. 91: 539, 1970.
54. Nahmias A. et al.: Prospective Studies of the Association of Genital Herpes Simplex Infections and Cervical Anaplasia. Cancer Res. 33: 1941, 1973.
55. Janda Z., Kanka J., Vonka V., Svodova B.: A Study of Herpes Simplex Type 2 Antibody Status in Groups of Patients with Cervical Neoplasia in Czechoslovakia. Int. J. Cancer, 12: 626, 1973.
56. Royston I. et al.: The Association of Genital Herpesvirus with Cervical Atypia and Carcinoma "in situ". Am. J. Epidemiol. 91: 531, 1970.
57. Kessler I.: Veneral Factors in Human Cervical Cancer. Cancer: 39, 1912, 1974.

58. Freedman R., Joosting A., Ryan J.: A Study of Associated Factors including Herpes in Black Women en Johannesburg. S. African Med. J. 48:175-7, 1974.
59. Muñoz H.: Model Systems for Cervical Cancer. Cancer Res. 36: 792, 1976
60. Rawls W. et al.: Serological and Epidemiological considerations of the Role of Herpes Simplex Virus Type 2 in Cervical Cancer. Can. Res.36:8-29, 1976.
61. Notter C.F. & Dogherty J.: Comparative Diagnostic Aspects of Herpes Virus Tumor Associated-Antigens. J. Nat. Cancer Inst. 57: 483, 1976.
62. Heise E.R. & Kucera L.: Antibodies in Human Carcinoma to Herpes Simplex Virus Type 2 (HVS2) Induced Antigens. Proc. Amer. Soc. Microbiol.:217, 1976.
63. Kawana T., Cornish J., Smith M., Aurelian I.: Frequency of Antibody-Induced Tumor Associated Antigens (Ag4) in Japanese Sera from Patients with Cervical Cancer and Controls. Cancer 36:8-10, 1976.
64. Kawana T., Sakamoto S., Kasamatu T. Aurelian I.: Frequency of Anti Ag4 Antibody in Patients with Uterine Cervical Cancer and Controls. Gunn 69:58-9, 1978.
65. Arsenakis M., Georgiou G., Welsh J., Cauchi M., May J.: Ag4 Complement Fixing Antibodies in Cervical Cancer and Herpes-Infected Patients Using Local Herpes Simplex Virus Type 2. Int. J. Cancer: 25, 67. 1980.
66. Teysié A, de Holstein B., Alonio L., Distefano A., Lucero J., Pascualini R., y de Torres R.: Detection of Herpes Simplex Associated Antigens in Patients with Cervical Carcinoma in Buenos Aires. Cell. Mol. Biol: 26, 123, 1980.



67. Athanasiu P., Nastac E., Stoian M., Predescu E., Hozoc M.: Immunofluorescence Study of the Presence of Herpes Type 1 and 2 Antigens in Patients with Cancer of Uterine Cervix. Rev. Roum. Med. Virol. 29: 251, 1978.
68. Aurelian L.: Possible Role of Herpes Virus Hominis Type 2 in Human Cervical Cancer. Fed. Proc. 31: 1851, 1972.
69. Aurelian L., Gupta P., Frost I., Resenhein N., Smith C., Tyrer H. et al.: Fluorescence-activated Separation of Cervical Abnormal Cells using Herpesvirus Antigenic Markers. Anal. Quant. Cytol. I. 89:197,1979.
70. Pacsa A., Kummerlander L., Pejtsik B., Krommer K., Pali K.: Herpes Virus Specific Antigens in Exfoliated Cervical Cells from Women with and without Cervical Anaplasia. Cancer Res.36: 2130, 1976.
71. Adelusi B., Osukoya B., Tabiyi A.: Herpes Type 2 virus Antigens in Human Cervical Carcinoma. Obst. Gynecol. 47: 545, 1976.
72. Minui G., Yuexin P., Xuejun J., Wenxian Z.: Detection of Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV2) Antigens in Cells of Human Cervical Carcinoma by Indirect Immunofluorescence Method. Chin.J. Oncol. I: 255, 1979.
73. Smith C., Aurelian L., Gupta P., Frost J., Rosenhein N., Kacsman K., Gueddes S.: An Evaluation of Herpes Simplex Virus Antigenic Markers in the Study of Established and Developing Cervical Neoplasia. Anal. Quant.Cyt 1. 2: 131, 1980.
74. Dressman G., Burk J., Ada E., Kaufman R., Melnick J., Powell L., Purifoy D.: Expression of Herpesvirus-induced Antigens in Human Cervical Cancer. Nature (Londres), 283: 591, 1980.

75. Gupta P., Aurelian L., Carpenter J., Kacsman K., Rosenhein N., Frost J.: Herpesvirus Antigens as Markers for Cervical Cancer. *Gynecol. Oncol.* 12, S232, 1981.
76. Melnick J., Adam E., Lewis R., Kaufman R.: Cervical Cancer Lines Containing Herpesvirus Markers. *Intervirology* 12: 11, 1979.
77. Melnick J., Dressman G., Adam E., Kaufman R.: The Role of Herpes Simplex Virus in Cervical and Vulvar Cancer. *Develop. Biol. Standard*: 52, 87, 1982.
78. Strnad B., Aurelian L.: Proteins of Herpesvirus Type 2. II Studies Demonstrating a Correlation between a Tumor-associated Antigen and a Virion Protein. *Viol.* 73: 244, 1976.
79. Aurelian L., Mank M., Mac Kineay M., Smith C., Klacsmann K., Gupta P.: The Herpesvirus Hypothesis are Koch's Postulates Satisfied? *Gynecol. Oncol.* 12: S56, 1981.
80. Frenkel N., Roizman B., Cassai E., Nahmias A.: A DN Fragment of Herpes Simplex 2 and its Transcripts in Human Cervical Tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 378 4, 1972.
81. zur Hausen H.: Herpes Simplexvirus in Human Genital Cancer. *Rev. Exp. Pathol.*: 25: 307, 1983
82. Galloway D., Mc Dougall J.: The Oncogenic Potential of Herpes Simplex Virus: Evidences for a "hit and run" Mechanism. *Nature*, 302: 21, 1983.
83. Galloway D., Nelson J., Mc Dougall J.: Small Fragments of Herpesvirus DNA with transforming Activity Contain Insertion Sequence-like Structures. *Proc. Natl. Acad. Scien. USA* 81: 4736, 1984.

84. Jones K., Fenoglio C., Shevchuc-Chaban M., Maitland N.,  
Mc Dougall J.: Detection of Herpes Virus mRNA in Human Cervical  
Biopsies by "in situ" Cytological Hybridization. En "Oncogene-  
sis and Herpes Viruses", 3: 917, 1978.
85. Mc Dougall J., Galloway D., Fenoglio C.: Cervical Carcinoma:  
Detection of Herpes Simplex Virus RNA in Cells undergoing  
Neoplastic Change. Int. J. Cancer, 25, 1: 1980.
86. Eglin R. Sharp F., Mac Lean J. Mac Nab J., Clements J.:  
Detection of RNA Complementary to Herpes Simplex Virus DNA in  
Human Cervical Squamous Cell Neoplasma. Cancer Res. 41: 3697,  
1981.
87. Maitland N., Kinross J., Busuttill A., Ludgate S., Smart G.,  
Jones K.: The Detection of DNA Tumour Virus-specific RNA Se-  
quences in Abnormal Human Cervical Biopsies by "in situ" Hy-  
bridization. J. Gen. Virol. 55: 123, 1981.
88. Duff R., Rapp F.: Oncogenic Transformation of Hamster  
Embryo Cells after Exposure to Inactivated Herpes Simplex Vi-  
rus Type 1. J. Virol. 12: 209, 1973.
89. Duff R., Rapp F.: Properties of Hamster Embryo Fibroblast  
Transformed "in vitro" after exposure to Ultraviolet-Irradiated  
Herpes Simplex Virus Type 2. J. Virol. 8: 469, 1971.
90. Albrecht T., Rapp F.: Malignant Transformation of Hamster  
Embryo Fibroblast following Exposure to Ultraviolet-Irradiated  
Human Cytomegalovirus. Virology 55: 53, 1973.
91. Gelb L., Huang J., Wellinghoff W.: "In vitro" Transformation  
with Varicella zoster Virus. J. Virol. 51: 172, 1980.

92. Flannery V., Courtney R., Schafter P.: Expression of an Early Non-Structural Antigen of Herpes Simplex Virus in Cells Transformed "in vitro" by Herpes Simplex Virus. J. Virol. 21; 284, 1977.
93. Scholehofer J., zur Hausen H.: Inductions of Mutations within the Host Cell Genome by Partially Inactivated Herpes Simplex Virus Type 1. Virol. 122: 471, 1982.
94. Hampar B., Ellison S.: Chromosomal Aberrations Induced by an Animal Virus. Nature: 192: 145, 1961.
95. Wauble R., zur Hausen H., Henle W.: Chromosomal and Autoradiographic Studies of Cells Infected with Herpes Simplex Virus. J. Virol. 2: 1047, 1968.
96. Lorentz A., Munk K., Darai G.: DNA Repair Replication in Human Embryonic Lung Cells Infected with Herpes Simplex Virus. Virol. 82: 401, 1977.
97. Scholehofer J., Gissman L., Matz B., zur Hausen H.: Herpes Simplex Virus-induced Amplification of SV40 Sequences in Transformed Chinese Hamster Embryo Cells. Int. J. Cancer 32, 99, 1983.

98. zur Hausen.: Human Genital Cancer: Synergism between two Viral Infections or Synergism between Virus Infections and Initiating Events. The Lancet 18: 1370, 1982.
99. St Jeor S., Albrecht T., Funk F., Rapp F.: Stimulation of Cellular DNA Synthesis by Human Cytomegalovirus. J. Virol. 13: 353, 1974.
100. Geder L, Lausch R., O'Neill F., Rapp F.: Oncogenic Transformation of Human Embryo Lung Cells by Cytomegalovirus. Science 192: 1134, 1976
101. Giraldo G., Beth E., Kourilsky F., Henle W. et al.: Antibody Patterns to Herpes Viruses in Kaposi's Sarcoma: Serological Associations of European Kaposi's Sarcoma with Cytomegalovirus. Int, J. Cancer 15: 839, 1975.
102. Lang D., Kummer J.: Demonstration of Cytomegalovirus in Semen. N. England J. Med. 287: 756, 1972.
103. Sanford E.J.; Geder L., Laycock A., Rohner T., Rapp F.: Evidence for the Association of Cytomegalovirus with Carcinoma of the Prostate. J. Urol. 118: 789, 1977.
104. Huang E., Roche J.K.: Cytomegalovirus DNA and Adenocarcinoma of the Human Colon: Evidence for Latent Viral Infections. The Lancet 1: 957, 1978
105. Vertergaard B., Hornsleth A., Pedersen S.: Occurrence of Herpes and Adenovirus Antibodies in Patients with Carcinoma of the Cervix Uteri: Measurement of Antibodies to Herpes Virus Hominis (Type 1 and 2), EB Virus and Adenovirus. Cancer 30: 69, 1972.

106. Fuccilo D., Sever J., Moder F., Chen T., Catalano L., Johanson L.: Antibodies in Patientes with Carcinoma of the Uterine Cervix. *Obst, Gynecol. N.Y.* 38: 599, 1971.
107. Smith H., Springbett A., Norval M.: Lack of Association of Cytomegalovirus Antibody Level with Carcinoma of the Uterine Cervix. *Gynecol. Obst. Invest.* 14: 300, 1982.
108. Shope O., Moshe Y.: Structure and Function of Paillomavirus Genomes. *Advances in Viral Oncology* (Ed. E. Klein) 3: 59, 1983.
109. Smith K., Campo M.: The Biology of Papillomavirus and their Role in Oncogenesis. *Anticancer Res.* 5: 31, 1985.
110. Shope R., Hurst E.: Infectious Papillomatosis of Rabbits with a Note on Histopathology. *J. Exp. Med.* 58: 607, 1933.
111. Gross L.: A Filtrable Agent recovered from AK Leukemic Extracts, causing Salivary Gland Carcinoma in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83: 414, 1953.
112. Sweet B., Hilleman M.: The Vacuolating Virus SV40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105: 420, 1960.
113. Pfister H.: Biology and Biochemistry of Papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 99: 11, 1984.
114. Lancaster W., Olson C.: Animal Papillomaviruses. *Microbiol. Rev.* 46: 191, 1982.
115. Jarret W., Campo M., O'Neill B., Laird H., Coggins L.: A Novel Bovine Papillomavirus (BVP6) causing True Epithelial Papillomas of Mammary Gland Skin: a Member or a Proposed new VP Sub-group. *Virology.* 136: 255, 1984.

116. Orth G., Jeanteur P., Croissant O.: Evidence for Localization of Vegetative Viral DNA Replication by Autoradiographic Detection of RNA-DNA hybrids in sections of tumors induced by Shope Papillomavirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68; 1976, 1971.
117. Jablonka S., Orth G., Lutzner M.: Immunopathology of Papillomavirus-induced Tumors in Different Tissues. Springer Semin. Immunopathol. 5: 33, 1982.
118. Syrjanen K.: Current Concepts of Human Papillomavirus Infections in the Genital Tract and their Relationship to Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma. Obs. Gyn. Survey 39: 252, 1984.
119. Gissman, Lutz: Papillomaviruses and their Association with Cancer in Animals and Man. Cancer Surveys 3: 163, 1984.
120. Jason A., Rosenthal J., Olson C., Pass F., Lancaster W., Shah K.: Immunological Relatedness of Papillomaviruses from Different Species. J. Natl. Cancer Inst. 64: 495, 1980.
121. Pfister H., Krubke J., Dietrich W., Iftner T., Fuchs P.: Classification of the Papillomaviruses Mapping the Genomes. En Papillomaviruses CIBA Symposium. 120 Ed. Fundación CIBA 3, 198.
122. Smith K., Campo S.: Papillomaviruses and their Involvement in Oncogenesis. Biomedicine and Pharmacology. 39:, 405, 1985.
123. Lorincz A., Lancaster W., Kurman R., Jenson B., Temple G.: Characterization of Human Papillomaviruses in Cervical Neoplasias and their Detection in Routine Clinical Screening. En. Viral Etiology of Cervical Cancer (Ed. Cold Spring Harbor Lab) 225; 1986.
124. Beudenon S., Kremsdorf D., Croissant O., Jablonska S., Wain Jobson S., Orth G.: A Novel Type of Human Papillomavirus Associated with Genital Neoplasias. Nature 321: 146, 1986.

125. Kawashima M., Jablonska S., Favre M., Obalek S., Croissant O., Orth G.: Characterization of a new type of Human Papillomavirus found in lesions of Bowen's Disease of the Skin. *J. Virol.* 57: 688, 1986.
126. Beaudemon S., Praetorius F., Kremsdorf D., Lutzner M., Worsae N., Pehau-Arnaudet G., Orth G.: A new type of human Papillomavirus associated with Oral Focal Epithelial Hyperplasia. *J. Inv. Dermatol.* (en prensa).
127. Kawashima M., Favre M., Hablonska S., Obalek S., Orth G.: Characterization of a New Type of Human Papillomavirus (HVP) related to HPV5 from a case of Actinic Keratosis. *Virology.* 154: 389, 1986.
128. Scherleun W., Gissman L. Gross G., zur Hausen H.: Molecular Cloning of two new HPV Types (HPV 37 y HPV 38) from a Kercantoma and a Malignant Melanoma. *Int. J. Cancer;* 37: 505, 1986.
129. Durst M., Gissman L., Ikenberg H., zur Hausen H.: A Papillomavirus DNA from a Cervical Carcinoma and its prevalence in Cancer Biopsies from Different Geographic Regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60: 3812, 1983.
130. Pettersson U. Ahola A., Stenlund P., Bergman P., Ustav M., Moreno-López: Organization and Expression of the Genome of Bovine Papillomavirus Type 1. En *Papillomavirus CIBA Symposium* 120, Ed. Fundación CIBA. 23; 1986.
131. Gissman L., Schwartz E.: Persistence and Expression of Human Papillomavirus DNA in Genital Cancer. En *Papillomavirus CIBA, Symposium* 120, Ed. Fundación CIBA.



132. Howley P., Yang Y., Spalholz B. Rabson M.: Papillomaviruses Transforming Functions. En Papillomavirus CIBA Symposium. Ed. Fundación CIBA 48, 1986.
133. Watts S. L., Phelps W. Ostrow R., Zachow K., Faras A.: Cellular Transformation by Human Papillomavirus DNA "in vitro". Science 225: 634, 1984.
134. Kreider J., Hoett M., Lill N., Berlett G., Zaino R., Sedlacek T., Mortel R.: In vivo Transformation of Human Skin with Human Papillomavirus Type 11 from Condyloma Acuminata. J. of Virol. 59: 369, 1986.
135. Yasumoto S., Burkhardt A., Doniger J., Di Paolo J.: Human Papillomavirus Type 16 DNA Induce Malignant Transformation of NIH 3T3 Cells. J. of Virol. 57: 572, 1986.
- 136a Howley P, Law F., Heilman C., Engel L., Alonso M., Israel M., Lowly D., Lancaster W.: Molecular Characterization of Papillomavirus. Cold Spring Harbor; Conf. Cell. Prolif. 7: 233, 1980.
- 136b Jarret W., Mc Neil P., Grimshaw W., Selman E., Mc Intyre W.: High Incidence Area of Cattle Cancer with a Possible Interaction between an Environmental Carcinogen and Papillomavirus. Nature. 274: 215, 1978.
137. Orth G.: Epidermodysplasia Verruciforme: A Model for Understanding the Oncogenity of Human Papillomaviruses. En Papillomaviruses CIBA Symposium 120. Ed. Fundación CIBA 157, 1986.
138. Mounts P., Shah L., Kashima H.: Viral Etiology of Juvenile and Adult Onset of Squamous Papilloma of the Larynx. Pro. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5425, 1982.
139. Gissman L., Diehl V., Scultz-Coulon H., zur Hausen H.: Molecu-

- cular Cloning and Characterization of Human Papillomavirus DNA derived from a Laryngeal Papilloma. *J. Virol.* 44: 393, 1982.
140. Crum C., Levine R.: Human Papillomavirus-Infection an Cervical Neoplasia: New Perspectives. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 3: 376, 1984.
141. Koss L., Durfee G.: Unusual Patterns of Squamous Epithelium of the Uterine Cervix: Cytologic and Histologic Study of Koilocytotic Atypia. *Ann. NY Acad. Sci.* 63: 1245, 1956.
142. Purola E., Savia E.: Cytology of Gynecologic Condyloma Acuminatum. *Acta Cytol.* 21: 26, 1977.
143. Reid.R., Laverty C., Coppleson M. et al.: Non - Condylomatous Cervical Wart Virus Infection. *Obst. Gynecol.* 55:. 476, 1981.
144. Kurman R., Shah K., Lancaster W. et al: Immunoperoxidase Localization of Papillomavirus Antigens in cervical dysplasias and Vulvar Condyloma. *Am. J. Obst. Gynecol.* 140: 931, 1981.
145. Ferenczy A., Braun L., Shah K.; Human Papillomavirus (HPV) in Condylomatous Lesions of the Cervix: A Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Study. *Am. J. Surg. Pathol.* 5: 661, 1981.
146. Gissman L., zur Hausen H.: Partial Characterization of viral DNA from Human Genital Warts.(Condylomata Acumminata). *Int. J. Cancer* 25: 605, 1980
147. Meisels A.,Mörin C.: Human Papillomavirus and Cancer of the Uterine Cervix. *Gynecol. Oncol.* 12: 111, 1981.

148. Fu Y., Reagan J., Richart R.: Definition of Precursors. *Gynecol. Oncol.* 12: 220, 1981.
149. Crum C., Egawa K., Barron B. et al.: Human Papillomavirus Infection (Condyloma) and Cervical Intrepthelial Neoplasia: A Histopathologic and Statistical Analysis, *Gynecol. Oncol.* 15: 88, 1983.
150. Walker P., Singer A., Dyson J., Shah K., To H., Coleman D.: The revalence of Human Papillomavirus Antigen in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Br. J. Cancer* 48: 99, 1983.
151. Coleman D., Wickenden C., Malcolm D.: Association of Human Papillomavirus with Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. En *Papillomaviruses CIBA Symposium 120*. Ed. Fundación CIBA 175, 1986.
152. Crum C. Ikenberg H., Richart R., Gissman L.: Human Papillomavirus Type 16 and early Cervical Neoplasia. *N. Engl. J. Med.* 310: 880, 1984.
153. Gröss G., Ikenberg H., De Villiers E., Schneider A., Wargner D., Gissman L.: Bowenoid Papulosis: a Venereally Transmissible Disease as Reservoir for HPV 16. *Viral Etiology of Cervical Cancer (Cold Spring Harbor Lab.)* 21: 149, 1986.
154. Crawford L.: Criteria for the Establishing that a Virus is Oncogenic. En *Papillomaviruses CIBA Symposium 120*. Ed. Fundación CIBA 110, 1986.
155. zur Hausen H.: The Role of Viruses in Human Tumors. *Advances in Cancer Res.* 33: 77, 1980.

156. Stenberg B.: Laryngeal Papillomatosis is Associated with a defect in Cellular Differentiation. En Papillomavirus CIBA Symposium 120. Ed. Fundación CIBA. 208, 1986.
157. zur Hausen H.: Human Genital Cancer: Synergism between two Viral Infections or Synergism between a Viral Infection and Initiating Events. The Lancet 18: 1370, 1983.
158. Reid R.: Genital Wart and Cervical Cancer. Cancer. 53: 943, 1984.
159. Syrjänen K., Pyrhönen S.: Immunoperoxidase Demonstration of Human Papillomavirus (HPV) in Dysplastic Lesions of the Uterine cervix. Arch. Gynecol. 233: 53, 1982.
160. Pauls P., Dowle W.: Serologic Study of Herpes Virus Homini Strains by Microneutralization Test. J. Immunol. 98: 941, 1967.
161. Lascano E., Berría M., Candurra N.: Diagnosis of Junin Virus in Cell Cultures by Immunoperoxidase Staining. Arch. Virol. 70: 79; 1981.
162. Lack E., Jenson A., Smith H. Healy G., Pass F., Vawter G.: Immunoperoxidase Localization of Human Papillomavirus in Laryngeal Papilloma. Intervirology 14: 148, 1980.
163. Lewis V., Jones W., Brooks J., Cherry W.: Technical Consideration in the Preparation of Fluorescent Antibody Conjugates. Applied Microbiol. 12: 343, 1964.
164. Bayliss G., Marsden H., Hay J.: Herpes Simplex Virus Proteins: DNA binding Proteins in Infected Cells and in the Virus Structure. Virology, 68: 124, 1975.

165. Powell K., Purifoy D.: DNA Binding Proteins Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 and 2. Intervirology 7: 225, 1976
166. Purifoy D., Powell K. : DNA Binding Proteins Induced by Herpes Simplex Virus Type 2 in Hep-2 Cells. J. Virol. 19: 717, 1976.
167. Powell K., Littler E., Purifoy D.: Non-structural Proteins of Herpes Simplex Virus I. Major Virus Specific DNA Binding Protein. J. Virol. 39: 94, 1981.
168. Littler E., Purifoy D., Manson A., Powell K.: Herpes Simplex Virus Non-structural Proteins III Function of the Major DNA Binding Protein. J. Gen. Virol. 64: 983, 1983.
169. Flannery V., Courtney R., Shaffer P.: Expression of an Early Non-structural Antigen of Herpes Simplex Virus in Cells Transformed in vitro by Herpes Simplex Virus. J. of Virol. 21: 1844, 1977.
170. Powell K., Purifoy D., Courtney R., Adam E. : Herpes Virus Induced Antigens in Squamous Cell Carcinoma in situ of the Vulva. New England J. Med. 305: 483, 1981.
171. Buttel J., Tevethia S, Melnick J.: Oncogenicity and Cell Transformation by Papovavirus SV 40: The Role of the Viral Genome. Advance in Cancer Research 15: 1, 1972.
172. Tooze E. (Ed.): Molecular Biology of Tumor Viruses Part II: DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Lab., N.Y. 1980.
173. McDougall J., Crum C., Fenoglio C., Goldstein L., Galloway D.: Herpes Virus Specific RNA and Protein in Carcinoma of the Uterine Cervix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3853, 1982.

174. Lehtinen M.; HSV Infected RAJI Cells Specify HSV specific Immediate early and/or early DNA Binding Proteins. Arch. of Virol. 87: 107, 1986.
175. Gissman L., Schneider A.: Human Papillomavirus DNA in Prenoplastic Genital Lesions. En "Viral Etiology of Cervical Cancer" (Ed. Cold Spring Lab.) pág. 217, 1986.
176. Syrjänen S., Syrjänen K., Mantyjärvi R., Parkkinen S., Vayrynen M., Sarkoski S., Castren O.: Human Papillomavirus (HPV) Sequences Demonstrated by in situ Hybridization in Serial Paraffin-embedded Cervical Biopsies. Arch. Gynecol. 239: 39, 1986.
177. Crum C., Nagai N., Levine R., Silverstein S.: In situ Hybridization Analysis of HPV 16 DNA Sequences in Early Cervical Neoplasia. Am. J. Pathol. 123: 174, 1986.
178. Brigatti D., Myerson D. Leary J., Spalholz B. et al: Detection of Genomes in Cultured Cells and Paraffin-embedded tissue Sections using biotin-labelled hybridization Probes. Virol. 126: 32, 1983.
179. Tsunokawa Y., Takebe N., Nozwa S. et al.: Presence of Human Papillomavirus Type 16 and Type 18: DNA Sequences and their Expression in Cervical Cancer and Cell Lines from Japanese Patients. Int. J. Cancer 37: 499, 1986.
180. Villa L., Lopez A.: Human Papillomavirus DNA Sequence in Penile Carcinomas in Brazil. Int. J. Cancer 37: 853, 1986.
181. Gupta J., Schneider A., Shah K.: Detection of Papillomavirus Antigen and DNA in Cells and Tissues. En Viral Etiology of Cervical Cancer (Ed. Cold Spring Harbor Lab.) pág 147, 1986.

182. Yoonessi M., Wieckowska W., Mariniello, D., Antkowisk A.: Cervical Intraepithelial Neoplasia in Pregnancy. Int. J. Gynecol. Obst. 20:, 111, 1982.
183. Alonio L., Distefano A., Dalbert D., Mural J., Bart O., Bazan G., Adducci H., Teyssié A.: Virus Papiloma: Estudio en Pacientes Embarazadas. Primer Congreso Argentino de Virología (Ed.). Libro de Resúmenes 1983, pág. 36.
184. Fidler H., Boyes D. Worth A.: Cervical Cancer Detection in British Columbia. Br. J. Obstet. Gynecol. 105: 386, 1969.
185. Richart R.: Cervical Intraepithelial Neoplasia. Clin. Obst. Gynecol. 10: 778, 1967.
186. Koss L.: Dysplasia: A Real Concept or a Misnomer? Obst. Gynecol. 51: 374, 1978.
187. Buckeley C., Butler F., Fox H.: Cervical Intraepithelial Neoplasia, J. Clin. Pathol. 35: 1, 1982.
188. Berman A., Winkelmann R.: Flat Warts Undergoing Involution. Arch. Dermatol. 113: 1219, 1977.
189. Tagami H., Takinawa M., Ogino A., Imamura S., Ofuji S.: Spontaneous Regression of Plain Warts after Inflammation. Arch. Dermatol. 113: 1209, 1977.
190. Syrjänen K.: Immunocompetent cells in Uterine Cervix Lesions of Human Papillomavirus (HPV) Origin. Gynecol. Obst. 62: 327, 1983.

191. Lehtinem M., Lehtinem T., Aaram R., Aromaa A., Hakama M. et al.: Herpes Simplex Type 2 Infection is Associated with Fatal Outcome of Cervical Carcinoma. Abstract-Intl. Congress of Cancer, pág. 906, 1986.
192. Mc Dougall J., Crum C., Fenoglio C., Golstein L., Galloway D.: Herpesvirus Specific RNA and Protein in Carcinoma of the Uterine Cervix. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 3853, 1982.
193. Schelehofer J.: Interaction of Herpes Simplex Virus Infections with Host Cell DNA. En Viral Etiology of Cervical Cancer (Ed. Cold Spring Harbor Lab.) 211, 1986.
194. Mounts P., Shah K.: Etiological Relation to Genital Tract Papillomavirus. En Prog. Virol. (Ed. Karger Basel) 29: 90, 1984.
195. Doll R.: Implications of Epidemiologic Evidence in Future Progress. En Virology of Cervical Cancer (ed. Cold Spring harbor) pág. 321, 1986.
196. Di Fiore M.: Diagnóstico Histológico (Ed. El Ateneo) pág. 92, 1984.
197. Di Fiore M.: Diagnóstico Histológico (Ed. El Anteneo) pág. 557, 1974.
198. Alberts B., Herrick G.: DNA-Cellulosa Chromatography. En Methods in Enzymology, (Ed. Academic Press N.Y.) 21: 198, 1971.
199. Bush H.: Isolation and Purification of Nuclei. En Methods of Enzymology (E. Academic Press) 22:, 421, 1971.
200. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.: Molecular Cloning. (En Cold Spring Harbor Lab.-Press, N.Y.) 1982.