

Evaluación del tratamiento con imiquimod en infección persistente por el virus del papiloma humano con el método de reacción en cadena de la polimerasa

Tomás Hernández Quijano,* Berenice Illanes Aguiar,** Natividad Salas Linares,** Luz del Carmen Alarcón Romero,** Marcelino Hernández Valencia*

Nivel de evidencia: II-2

RESUMEN

Antecedentes: por medio de estudios moleculares se ha demostrado que los genotipos oncovírgenes del virus del papiloma humano son el principal factor de riesgo para tener cáncer de cuello uterino. La lesión subclínica no produce síntomas y es diagnosticada por colposcopia o histología. Además, la infección latente está relacionada con el ADN del virus del papiloma humano en el tejido que no tiene anomalías clínicas e histológicas, por lo tanto, sólo las técnicas moleculares detectan esta infección.

Objetivo: determinar si el tratamiento complementario con imiquimod (fármaco con potente actividad antiviral *in vitro* e *in vivo*) reduce la persistencia del virus del papiloma humano cervical.

Pacientes y método: se estudiaron 87 pacientes con antecedentes del virus del papiloma humano cervical y lesión intraepitelial de bajo grado. Se dividieron en pacientes tratadas con crioterapia, asa diatérmica e imiquimod. Todas tenían diagnóstico por citología cervical, colposcopia y reacción en cadena de la polimerasa para virus del papiloma humano. A los 3, 6 y 12 meses después del tratamiento se realizó control por reacción en cadena de la polimerasa, colposcopia y citología cervical.

Resultados: de las 87 pacientes estudiadas, las que se trataron con citología cervical fueron positivas para el virus del papiloma humano 11% (10 mujeres); por colposcopia 8% (7 mujeres) y por reacción en cadena de la polimerasa 40% (34 mujeres). La persistencia fue menor con los métodos combinados de asa e imiquimod, con 29% de las pacientes (5); sin embargo, cuando se utilizó sólo imiquimod la persistencia fue del 55% (11), que se determinó por el método de reacción en cadena de la polimerasa.

Discusión: el imiquimod aparentemente tuvo ventajas en 45% de las pacientes, en contraste con la eficacia reportada del 85% en verrugas genitales y anales. Se demostró la capacidad de eliminar el virus; por lo tanto, es probable que su efecto potencial se observe a largo plazo. Es evidente que los porcentajes de detección viral mejoran con el método de reacción en cadena de la polimerasa, comparado con los métodos indirectos como la citología cervical y la colposcopia. Esto es favorable cuando los genotipos del virus son de alto grado de transformación y nuestros métodos ablativos deban ser conservadores por motivos de fertilidad.

Palabras clave: diagnóstico del virus del papiloma humano, imiquimod, neoplasia intraepitelial cervical, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Background: Molecular studies have shown that oncogenic genotypes of human papillomavirus (HPV) are the main risk factor for cervical cancer development. Sub-clinical wound does not cause symptoms and is diagnosed by colposcopy or histology, in addition the latent infection is associated with the presence of DNA of the HPV, but when clinical and histological abnormalities are not presented only molecular techniques can detect this infection.

Objective: To determine if complementary processing with imiquimod, recent medicament with powerful antiviral activity *in vitro* as *in vivo*, reduces the cervical persistence of HPV.

Patients and methods: This study was carried out with 87 patients, who had antecedents of HPV cervical and intraepithelial wound with low degree. Patients were divided as follows: treated with cryotherapy, cervical loop electrosurgical and imiquimod, all with diagnosis by cervical cytology, colposcopy and polymerase chain reaction (PCR) for HPV. At 3, 6 and 12 months after the processing, PCR, cervical cytology and colposcopy control were carried out again.

Results: Out of the 87 patients studied, 11% (10) patients treated with cervical cytology were positive for VPH; with colposcopy 8% (7) of patients and with PCR 40% (34) of patients; decreased persistence with combined methods of loop and imiquimod was obtained in 29% (5) patients; however, when utilized imiquimod alone, there were 55% (11) patients with persistence determined by PCR method.

Discussion: Imiquimod appears to be beneficial in 45% of the patients, in contrast with efficacy reported until 85% in genitais and annals warts, in addition, the capacity of eliminating the viruses has been shown, therefore it is possible that its potential effect could be observed long-time. It is evident that the percentages of viral detection are improved for PCR method, compared with indirect methods as cervical cytology and colposcopy, which is favorable when virus serotypes are of high degree of transformation and ablative methods should be conservatives due to fertility motives.

Key words: HPV diagnosis, imiquimod, cervical intraepithelial neoplasm, polymerase chain reaction.

RÉSUMÉ

Antécédents : les études moléculaires ont démontré que les génotypes oncogéniques du virus du papillome humain sont le principal facteur de risque pour avoir cancer du col utérin. La lésion subclinique ne produit pas de symptômes et elle est diagnostiquée à l'aide de colposcopie ou histologie. En plus, l'infection latente est liée avec l'ADN du virus du papillome humain dans le tissu qui ne présente pas des anomalies cliniques et histologiques, donc, seules les techniques moléculaires détectent cette infection.

Objectif : déterminer si le traitement complémentaire avec imiquimod (médicament récent à puissante activité antivirale *in vitro* et *in vivo*) réduit la persistance du virus du papillome humain cervical.

Patients et méthode : étude comprenant 87 patientes avec des antécédents du virus du papillome humain cervical et lésion intra épithéliale de bas grade. Elles ont été classées en patientes traitées avec cryothérapie, avec anse diathermique et avec imiquimod. Toutes avaient un diagnostic par cytologie cervicale, colposcopie et réaction en chaîne de la polymérase pour virus du papillome humain. Aux 3, 6 et 12 mois après le traitement on a fait un contrôle par réaction en chaîne de la polymérase, colposcopie et cytologie cervicale.

Résultats : des 87 patientes étudiées, celles qui ont été traitées par cytologie cervicale ont résulté positives pour le virus du papillome humain 11% (10 femmes) ; par colposcopie 8% (7 femmes) et par réaction en chaîne de la polymérase 40% (34 femmes). La persistance a été mineure avec les méthodes d'anse et d'imiquimod, avec 29% des patientes (5) ; toutefois, lorsqu'on a seulement employé imiquimod la persistance a été de 55% (11), déterminée par la méthode de réaction en chaîne de la polymérase.

Discussion : en apparence l'imiquimod a eu des avantages chez 45% des patientes, en contraste avec l'efficacité rapportée de 85% dans des verrues génitales et anales. On a démontré la capacité d'éliminer le virus ; donc il est probable que son effet potentiel s'observe à long terme. Il est évident que les pourcentages de détection virale améliorent avec la méthode de réaction en chaîne de la polymérase, en comparaison avec les méthodes indirectes comme la cytologie cervicale et la colposcopie. Ce qui est favorable quand les génotypes du virus comportent un haut degré de transformation et nos méthodes ablatives doivent être conservatrices pour des raisons de fertilité.

Mots-clé : diagnostic du virus du papillome humain, imiquimod, néoplasie intra épithéliale cervicale, réaction en chaîne de la polymérase.

RESUMO

Antecedentes: os estudos moleculares demonstraram que os genotipos oncogénicos do vírus do papiloma humano são o principal fator de risco para ter câncer no colo do útero. A lesão subclínica não produz sintomas e é diagnosticada por coloscopia ou histologia. Além do mais, a infecção latente está relacionada com o ADN do vírus do papiloma humano no tecido que não apresenta anormalidades clínicas e histológicas, então, somente as técnicas moleculares detectam essa infecção.

Objetivo: determinar se o tratamento complementário com imiquimod (fármaco recente com atividade potente antiviral *in vitro* e *in vivo*) reduz a persistência do vírus do papiloma humano cervical.

Pacientes e método: estudo de 87 pacientes com antecedentes do vírus do papiloma humano cervical e lesão intraepitelial de baixo grau. Dividiram-se em pacientes tratadas com crioterapia, asa diatérmica e imiquimod. Todas tinham diagnóstico por citologia cervical, colposcopia e reação em cadeia da polimerase para vírus do papiloma humano. Aos 3, 6 e 12 meses depois do tratamento se fez controle por reação em cadeia da polimerase, colposcopia e citologia cervical.

Resultados: das 87 pacientes estudadas, aquelas tratadas por citologia cervical foram positivas para o vírus do papiloma humano 11% (10 mulheres); por coloscopia 8% (7 mulheres) e por reação em cadeia da polimerase 40% (34 mulheres). A persistência foi menor com os métodos combinados de asa e imiquimod, com 29% das pacientes (5); todavia, quando se utilizou imiquimod só, a persistência foi do 55% (11), que foi determinado pelo método de reação em cadeia da polimerase.

Discussão: o imiquimod teve aparentes vantagens no 45% das pacientes, em contraste com a eficácia reportada do 85% em verrugas genitais e anais. Se demonstrou a capacidade de eliminar o vírus, então, é provável que seu efeito possa ser observado ao longo prazo. É evidente que as porcentagens de detecção viral melhoram com o método de reação em cadeia da polimerase, comparado com os métodos indiretos tais como a citologia cervical e a coloscopia. Isto é favorável quando os genotipos do vírus são de alto Grau de transformação e os nossos métodos ablativos devem ser conservadores por motivos de fertilidade.

Palavras chave: diagnóstico do vírus do papiloma humano, imiquimod, neoplasia intraepitelial cervical, reação em cadeia da polimerase.

* Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. México, DF.
** Laboratorio de Investigación en Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guerrero.

Correspondencia: Dr. Marcelino Hernández Valencia.
E-mail: mhernandezvalencia@prodigy.net.mx. Tel./fax: 5627-6913.
Recibido: septiembre, 2005. Aceptado: abril, 2006.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

Gran cantidad de factores influyen para padecer cáncer cervicouterino; sin embargo, los estudios epidemiológicos y moleculares demostraron que los genotipos oncogénicos del vírus del papiloma humano¹⁻² son el principal factor de riesgo para tener este tipo de cáncer y sus lesiones precursoras (intraepiteliales escamosas). El ADN del vírus del papiloma humano se encuentra en 99.7% de los casos de cáncer cervicouterino.³⁻⁵ La lesión clínica es visible y se distingue por condilomas o verrugas genitales; la

lesión subclínica no produce síntomas y se diagnostica por colposcopia o histología.⁶⁻⁷ La infección latente se relaciona con el ADN del virus del papiloma humano en el tejido que no tiene anormalidades clínicas e histológicas. Sólo las técnicas moleculares detectan esta infección, sin que la enfermedad, aún no latente, evolucione a intraepiteliales escamosas y luego a cáncer cervicouterino.⁸⁻¹⁰

En la actualidad existen varios tratamientos para las infecciones intraepiteliales escamosas, pero no son efectivos para el virus del papiloma humano. Estos tratamientos comprenden citotoxicidad inducida químicamente y métodos ablativos que permiten la destrucción y escisión del tejido infectado por el virus del papiloma humano, como: crioterapia, electrocoagulación diatérmica, termocoagulación, vaporización con láser de CO₂, asa diatérmica, conización con bisturí e hysterectomía.¹¹⁻¹⁶ Existen tratamientos tópicos, como: ácidos orgánicos, ácido tricloracético y bicloracético, y los antimetabolitos que comprenden al 5-fluorouracilo y agentes antimicóticos, como la podofilina y la podofilotoxina. También existen las vacunas terapéuticas, antivirales (aciclovir, vidarabina) y finalmente los inmunorreguladores, como el interferón-alfa y el imiquimod. Este último se administra frecuentemente en el tratamiento de verrugas con el propósito de eliminar el agente causal.¹⁷⁻²⁴ El imiquimod es una molécula que representa a la familia de las imidazoquinolinas y es un modulador de la respuesta inmunitaria con potente actividad antiviral y antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Se desarrolló para el tratamiento de verrugas genitales, pero también demostró eficacia, por su capacidad para estimular la producción del factor de necrosis tumoral alfa y otras citocinas en las células infectadas, en contra del virus del papiloma humano.²⁵⁻²⁹

La división más reciente se basa en el potencial oncogénico del virus del papiloma humano y se establecieron dos categorías diferentes. La primera son los relacionados con neoplasia intraepitelial cervical I, producidos por el virus del papiloma humano del genotipo 6, 11, 42, 43 y 44, los cuales se relacionan con verrugas genitales benignas y en raras ocasiones con cáncer cervical invasor. Los segundos se relacionan con: neoplasia intraepitelial cervical II, neoplasia intraepitelial cervical III, cáncer cervical, del pene, vulva y ano, provocados por el virus del papiloma de los

genotipos 16, 18, 31 y, con menos frecuencia, los 33, 35, 45, 51 y 56.^{18,19,30-34} El virus del papiloma es el resultado de la relación huésped-agente y el tratamiento de las infecciones intraepiteliales escamosas consiste en métodos ablativos y quirúrgicos que no tienen efectividad del 100%. El propósito de este estudio es evaluar el resultado de los distintos tratamientos administrados en estas lesiones, relacionados con el uso del imiquimod, y la eliminación de la lesión y del virus del papiloma humano.

PACIENTES Y MÉTODO

Estudio experimental realizado en mujeres derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social, de la clínica de displasias del Hospital General de Subzona Núm. 3, con seguimiento de tres años. Se incluyeron 87 mujeres y se dividieron en cinco grupos de estudio conforme el diagnóstico se estableció mediante colposcopia (lesión clínica), Papanicolaou (picnócitos) y la detección del virus del papiloma humano por reacción en cadena de la polimerasa. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Biomedicina Molecular y Citopatología de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. El grupo I se trató con crioterapia (20 pacientes), el II con conización (20 pacientes), el III con imiquimod crema al 5% (20 pacientes), el IV con crioterapia más imiquimod crema al 5% (10 pacientes) y el V con conización más imiquimod crema al 5% (17 pacientes). Se solicitó el consentimiento informado de cada paciente para obtener la muestra cervical y se les garantizó confidencialidad de los resultados. Se utilizaron materiales desechables para la toma de la muestra. Los desechos de las muestras y los reactivos contaminados se eliminaron de acuerdo con las normas de seguridad para la eliminación de residuos biológicos y tóxicos que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995.

En la evaluación inicial se realizó una encuesta y se registraron datos sociodemográficos, de comportamiento sexual y de salud reproductiva. Después del tratamiento, en todos los grupos se repitieron los estudios de colposcopia, Papanicolaou y la detección para tipificación de ADN del virus del papiloma humano a los seis meses y al año para el seguimiento del caso.

Después de seis meses de tratamiento se consideró que las pacientes se habían curado cuando no tenían lesión ni ADN del virus del papiloma humano (PCR). Se consideró que había persistencia del padecimiento cuando se encontró lesión (Papanicolaou y colposcopia) y ADN del virus del papiloma humano antes de un año del tratamiento. Se consideró que había recurrencia del padecimiento cuando tenían lesión y ADN del virus del papiloma humano después de un año del tratamiento.

Se seleccionó a mujeres sexualmente activas, con diagnóstico de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y con infección por el virus del papiloma detectada por reacción en cadena de la polimerasa, que no se trataron la lesión ni la infección. Para el estudio citológico se realizaron dos extendidos exocervicales con una espátula y se aseguró la muestra de la zona de transformación escamocolumnar y de la lesión visible; con un cepillo cervical se obtuvo la muestra endocervical.

El cepillo cervical con la muestra endocervical, para el estudio molecular, se colocó en un tubo Eppendorf con solución de lisis compuesta por Tris 10 mm ph 8.0, EDTA 20 mm ph 8.0 y SDS 0.5%; todo en condiciones de esterilidad. Para obtener el ADN cervical se lavaron con fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico, previa incubación en un baño metabólico con proteinasa K (100 mg/mL) a 65°C. Esto con el propósito de degradar las proteínas del medio. Después se realizaron cuatro lavados con fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico, se mezclaron con vortex durante 45 segundos y se centrifugaron 5 minutos a 1,400 rpm a 4°C. El fenol, al igual que el cloroformo, tienen la función de desnaturizar activamente las proteínas y se obtienen tres fases: acuosa, proteica y de restos celulares y fenólicos. Se recuperó la fase acuosa, se agregó LiCl 8M para separar el RNA de la muestra, se centrifugó durante cinco minutos a 1,400 rpm, se recuperó nuevamente la fase acuosa en un tubo Eppendorf limpio y se agregó NaCl 5M. Se agitó por unos segundos y se le agregó isopropanol para visualizar la hebra de ADN y para tenerlo libre de sales se utilizó etanol al 70%. Cuando se obtuvo el ADN se resuspendió en 55 µL de agua desionizada estéril y se midió su concentración y pureza en un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Después, al ADN se le realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.³⁵

Amplificación del ADN viral por reacción en cadena de la polimerasa

A la muestra de ADN genómico se le aplicó la técnica de la PCR con los iniciadores MY09 y MY11 de Bauer y Manos, que son complementarios a una región del gen L1 del VPH, la cual se conserva y el producto de la amplificación es de aproximadamente 450 pb. La mezcla de reacción se hizo con H₂O desionizada estéril, Buffer PCR 1X (GOLD), 4 desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dGTP) 0.6 mM (GOLD), MgCl₂ 2mM (GOLD), iniciadores MY09 y MY11, 1 µM y 2.0 U de Taq ADN polimerasa (GOLD) y se agregó de 0.5 a 2 µg del ADN genómico; la mezcla final fue de 50 µL. La amplificación se realizó en el termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin Elmer). Se comenzó con un periodo de desnaturización a 95°C durante 10 minutos. Después se realizaron 40 ciclos con desnaturización a 95°C durante un minuto, alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores a 54°C durante un minuto y extensión de la cadena de ADN a 72°C durante 10 minutos. Como controles positivos se usó ADN de la línea celular HeLa que contiene VPH 18 y ADN de las células Caski, las cuales contienen virus del papiloma humano tipo 16 que se clonó en olásmido (1ng, 1pg como controles de sensibilidad). Como controles negativos se usaron ADN genómico sano y agua desionizada estéril. Se incluyó como control interno el gen de la β-globina humana y se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores GP20 y PC04 que amplifican un fragmento de 286 pb. Este último permite confirmar la integridad del ADN, al que se le realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Dicha amplificación se realizó sólo en muestras seleccionadas al azar y aproximadamente en 2 µg de ADN purificado, y se obtuvo una muestra final de 50 µL.³⁶

Tipificación del virus del papiloma humano por restricción de fragmentos polimórficos (RFLPs)

Después de obtener el producto de la reacción en cadena de la polimerasa se tomaron 5 µL de la reacción final y se hizo un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5%. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz UV (Foto/UV 15). Se imprimió la imagen (Fotodyne Incorporated) y se capturó en un fotodocumentador (GeneGenius Syngene).

Las muestras positivas a la reacción en cadena de la polimerasa se restringieron con una mezcla de Buffer 1X, H₂O, RNAasa 0.1 mg /mL, 2 U de cada enzima: *Bam* *Hi*, *Dde* *I*, *Inf*. *I*, *Pst* *I*, *Rsa* *I*, *Sau* 3*AI* y ADN amplificado para cada reacción. Para visualizar los resultados se realizó nuevamente un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2.5%, con 14 µL del producto final de la restricción. Después, con la ayuda de un patrón de restricción establecido para 44 tipos virales diferentes, se determinó el tipo de virus del papiloma humano.^{35,36}

Tratamientos

Crioterapia

Se realizó en una sesión, de tres a cinco minutos, con equipo de crioterapia por óxido nitroso con crioprobos de oro. Se congeló el tejido cervical dañado y después de que el crioprobo tuvo contacto con el cuello uterino se activó un anillo alrededor del tejido congelado llamado bola de hielo.

Asa diatérmica

Se realizó el corte y coagulación del tejido dañado con un asa de platino mediante corriente de alta frecuencia. Después de delimitar la zona de transformación atípica, se infiltró el cuello uterino con anestesia local y un vasoconstrictor. La punta del asa se colocó de 3 a 5 mm fuera del margen lateral de la lesión, en la posición correspondiente a las tres y se desplazó lentamente a lo largo hasta alcanzar un punto situado de 3 a 5 mm del margen lateral en el lado contrario. La profundidad del tejido escindido fue de 6 a 8 mm por debajo del epitelio superficial.

Imiquimod crema al 5%

Se administraron 250 mg de imiquimod crema al 5% en el cuello uterino con un aplicador de plástico en forma

de jeringa, una vez por semana en 12 ocasiones. Los lavados vaginales se realizaron tres horas después de la primera aplicación, seis horas después de la segunda aplicación y si no había síntomas se suspendieron en caso de tener molestias. En la tercera aplicación los lavados se realizaron ocho horas después.

Crioterapia o asa térmica más imiquimod

La aplicación de 250 mg de imiquimod crema al 5% fue cada 12 semanas. Se inició a la sexta semana de la crioterapia o del uso del asa diatérmica.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las encuestas y los resultados de los estudios se capturaron en una base de datos del programa SPSS-10, donde se obtuvieron frecuencias simples que incluían desviación estándar y porcentajes. Además, se realizó la prueba de X² para comparar los grupos en estudio.

RESULTADOS

Se evaluaron mujeres entre 32 y 37 años de edad con diagnóstico de infección por el virus del papiloma humano latente. El inicio de la vida sexual en estas mujeres fue entre 19 y 24 años de edad. Las características ginecoobstétricas de la población por grupo de estudio se presentan en el cuadro 1. Los cambios después de los diferentes tratamientos se analizaron por cada método de diagnóstico que se utilizó para identificar el virus del papiloma humano o la lesión.

La frecuencia de infección por el virus del papiloma humano latente, detectada mediante los cambios celulares por Papanicolaou, se eliminó en 95% (19/20) de las pacientes que recibieron asa, seguida por los tratamientos combinados, como: crioterapia más

Cuadro 1. Características de las pacientes incluidas en el estudio descritas como promedio ± desviación estándar

Variable	Crioterapia <i>n</i> = 20	Asa diatérmica <i>n</i> = 20	Imiquimod <i>n</i> = 20	Crioterapia + imiquimod <i>n</i> = 10	Asa diatérmica + imiquimod <i>n</i> = 17
Edad (años)	33 ± 8	37 ± 6	37 ± 2	33 ± 4	32 ± 1
IVS (años)	19 ± 3	21 ± 3	20 ± 2	24 ± 5	20 ± 3
Menarquia (años)	13 ± 2	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 2
Embarazos	2 ± 2	3 ± 2	3 ± 2	2 ± 1	2 ± 1
Partos	2 ± 2	2 ± 1	2 ± 2	1 ± 1	1 ± 1

IVS: inicio de vida sexual.

Cuadro 2. Persistencia de infección demostrada por cambios celulares (picnocirosis) con papanicolaou después de un año del tratamiento

Citología	Crioterapia n = 20 (%)	Asa diatérmica n = 20 (%)	Imiquimod n = 20 (%)	Crioterapia-imiquimod n = 10 (%)	Asa diatérmica-imiquimod n = 17 (%)
Normal	17 (85)	19 (95)	17 (85)	9 (90)	15 (88)
LIEBG	3 (3)	1 (5)	3 (15)	1 (10)	2 (12)

LIEBG = lesión intraepitelial de bajo grado

imiquimod con 90% (9/10) de efectividad y asa más imiquimod con 88% (15/17). La crioterapia y el imiquimod, como monoterapia, tuvieron efectividad del 85% (17/20) en la eliminación de la lesión (cuadro 2).

La lesión provocada por el virus del papiloma humano (lesión intraepitelial de bajo grado), que se detectó mediante colposcopia postratamiento, reveló que al combinar la crioterapia más imiquimod y al aplicar imiquimod solo se logra 100% de eliminación de la infección. El asa más imiquimod tienen 94% (16/17) de efectividad, el asa 90% (18/19) y finalmente la crioterapia tiene 89% de regresión del virus del papiloma humano (cuadro 3).

El resultado del estudio molecular por reacción en cadena de la polimerasa, en la detección y tipificación del virus del papiloma humano, indica que la combinación de la crioterapia más imiquimod (7/10), asa más imiquimod (12/17) y crioterapia sola (14/20) fue más efectiva en la eliminación de la infección viral con 70% de efectividad, seguidos por el asa y el imiquimod con 55 y 45%, respectivamente (cuadro 4).

La frecuencia de los genotipos que producen la infección por el virus del papiloma humano, posterior a los tratamientos, demostró que en el grupo tratado con crioterapia el virus disminuyó del 100 al 30% en el tejido obtenido del cuello uterino, donde 5% fue del tipo de bajo riesgo (VPH MM7 (PAP291) LVX82) y 5% de alto riesgo (VPH 31). En otro 5% de la población no se identificó el tipo viral y en 15% (3/20) de los tipos virales no se logró distinguirlos.

La frecuencia de infección por el virus del papiloma en el grupo tratado con conización disminuyó a 45%; de estas pacientes, 15% fue de bajo riesgo (54, 61 y CPA4173/LVX100), 5% de alto riesgo (VPH 31) y del 25% (5/20) no se pudo distinguir el tipo viral (figura 1).

La frecuencia de la infección por el virus del papiloma humano en el grupo tratado con imiquimod disminuyó a 55%, de donde 15% fueron tipos de virus de papiloma humano de bajo riesgo (6, 61 y 62), 5% de alto riesgo (16) y 35% (7/20) de tipos virales no distinguibles.

La frecuencia de la infección por el virus del papiloma humano en el grupo tratado con conización más

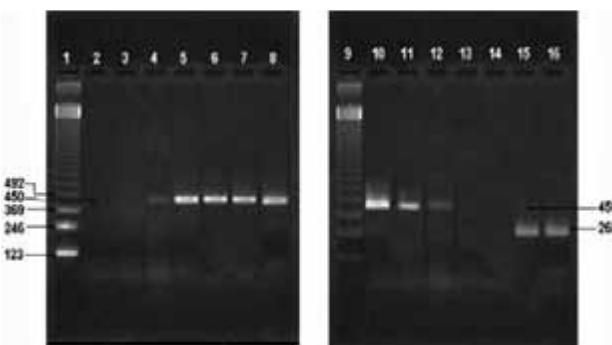


Figura 1. Se muestra la electroforesis de los productos de reacción en cadena de la polimerasa para la identificación del tipo de virus del papiloma humano en las muestras de las pacientes en estudio. Carriles 1,9: marcador de peso molecular de 123 pb. Carriles 1,2: muestras negativas. Carriles 4, 5, 6, 7 y 8: muestras positivas. Carriles 10, 11 y 12: controles positivos (ADN del virus del papiloma humano 18 de células HeLa, ADN del virus del papiloma humano 16 a 1ng y 1pg). Carriles 13 y 14: muestras negativas (ADN sano y agua).

Cuadro 3. Persistencia de lesión demostrada por colposcopia después de un año del tratamiento

Colposcopia	Crioterapia n = 20 (%)	Asa diatérmica n = 20 (%)	Imiquimod n = 20 (%)	Crioterapia-imiquimod n = 10 (%)	Asa diatérmica-imiquimod n = 17 (%)
Normal	16 (80)	18 (90)	20 (100)	10 (100)	16 (94)
LIEBG	4 (20)	2 (10)	0 (0)	0 (0)	1 (6)

LIEBG = lesión intraepitelial de bajo grado

Cuadro 4. Persistencia de infección por virus del papiloma humano demostrada por PCR después de un año del tratamiento

PCR	Crioterapia n = 20 (%)	Asa diatérmica n = 20 (%)	Imiquimod n = 20 (%)	Crioterapia-imiquimod n = 10 (%)	Asa diatérmica-imiquimod n = 17 (%)
(-)	14 (70)	11 (55)	9 (45)	7 (70)	12 (71)
(+)	6 (30)	9 (45)	11 (55)	3 (30)	5 (29)

LIEBG = lesión intraepitelial de bajo grado

PCR = reacción en cadena de la polimerasa (técnica de biología molecular)

imiquimod disminuyó a 30%. El 12% correspondió al virus del papiloma humano de bajo riesgo (VPH CP141, LVX160 y CP8304) y 18% por tipos virales indistinguibles (cuadro 5).

Estos resultados carecen de diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de persistencia entre los tratamientos para la lesión intraepitelial de bajo grado ($p = 0.85$) y para la infección latente ($p = 0.35$), aun cuando las frecuencias revelan que alguno de los tratamientos es más efectivo para eliminar la lesión intraepitelial de bajo grado o la infección latente.

CONCLUSIONES

La crioterapia eliminó la lesión del 80 (16/20) al 85% (17/20), que se comprobó por colposcopia y Papanicolaou, respectivamente. La efectividad de la crioterapia en la eliminación de la infección por el virus del papilo-

ma humano latente fue del 70%; por lo tanto, se puede decir que se curaron 14 de 20 mujeres, de las cuales una tenía infección por el virus del papiloma humano CP8304 (de bajo riesgo) y en el resto de las mujeres la infección no se pudo distinguir. Sin embargo, hubo dos casos de persistencia; uno fue de un tipo viral de alto riesgo (VPH 31), en el que la lesión desapareció, y el otro caso de un virus de papiloma humano de bajo riesgo (MM7/PAP291), en el que, aún después del tratamiento, el Papanicolaou y la colposcopia mostraron datos de que la lesión persistió. En otro caso la infección era por dos tipos diferentes. Se logró eliminar la de un tipo, aunque no se pudo identificar. Esto indica que si bien los métodos ablativos son efectivos en la eliminación de la lesión, los ciclos de congelamiento no siempre alcanzan el sustrato basal y pueden quedar algunas células infectadas por el virus, lo que permite la persistencia y la posibilidad de que la lesión aparezca nuevamente.

Cuadro 5. Genotipos virales del virus del papiloma humano en los casos de persistencia después del tratamiento

Genotipos	Crioterapia n = 20 (%)	Asa diatérmica n = 20 (%)	Imiquimod n = 20 (%)	Crioterapia-imiquimod n = 10 (%)	Asa diatérmica-imiquimod n = 17 (%)
Negativos	14 (70)	11 (55)	9 (45)	7 (70)	12 (71)
31	1 (5)	-	-	-	-
54	-	1 (5)	-	-	-
61	-	1 (5)	1 (5)	-	-
52	-	1 (5)	-	-	-
6	-	-	1 (5)	-	-
16	-	-	1 (5)	-	-
62	-	-	1 (5)	-	-
58	-	-	-	1 (10)	-
MM7(PAP291)LVX82	1 (5)	-	-	-	-
CP141(LVX160)	-	-	-	-	1 (6)
LVX100	-	1 (5)	-	-	-
Similar al tipo 45	1 (5)	-	-	-	-
Similar al tipo CP8304	-	-	-	-	1 (6)
Producto de PCR					
Insuficiente	3 (15)	5 (25)	7 (35)	2 (20)	3 (17)

PCR = reacción en cadena de la polimerasa (técnica de biología molecular)

El asa diatérmica mostró efectividad en la eliminación de la lesión del 90 (18/20) al 95% (19/20) por colposcopia y Papanicolaou, respectivamente, lo que coincide con otros resultados reportados previamente.¹²⁻¹⁴ Además, la efectividad del asa para la eliminación de la infección por el virus del papiloma humano es del 55%. A pesar de esta baja efectividad, es importante mencionar que se logró curar a 25% (5/20) de las mujeres que tenían infección por genotipos virales de alto riesgo. Sin embargo, se encontraron casos de posible reinfección: uno es el caso del virus del papiloma humano 52, ya que la paciente inicialmente tenían el tipo 18; dos casos que al principio tenían infección mínima y después del tratamiento se identificaron como virus 54 y 61 (de bajo riesgo), y otro caso de persistencia del virus CP4173/LVX100, en el cual el estudio colposcópico reveló lesión por el virus, caso similar a lo reportado en otros estudios.^{8,26,35}

En las pacientes en quienes después de haber eliminado la lesión persistió la infección por el virus del papiloma humano, fue importante erradicar la infección. Para esto se valoró la efectividad del imiquimod crema al 5%. Actualmente, el imiquimod no es el tratamiento de elección para eliminar la infección clínica; sin embargo, en nuestro estudio la efectividad para eliminar la infección y la lesión visible fue del 85% (17/20) por Papanicolaou y 100% (20/20) por colposcopia. Sólo siete pacientes tenían diagnóstico inicial de lesión del epitelio; por lo tanto, la eliminación de la infección por el virus del papiloma humano latente se logró sólo en 45% (9/20). En la población que no se logró eliminar se disminuyó la infección: del 55% de persistencia general a 35% (7/20) que refirió infección mínima por el virus del papiloma humano.

Aunque la efectividad del imiquimod sea baja, hay resultados importantes, como los que corresponden a los cuatro casos que tenían el virus del papiloma humano 16, ya que se eliminó la infección, incluso cuando dos pacientes tenían infección clínica y sólo en un caso hubo persistencia de la infección latente, pero no clínica. Se logró eliminar la infección en un caso de VPH31 sin lesión evidente por Papanicolaou, lo que permite deducir que el imiquimod incrementa la respuesta inmunitaria y contribuye a eliminar la infección. Esto se muestra en mujeres con infección mínima; en cuatro casos se eliminó completamente la infección clínica y la latente.

Sin embargo, el virus del papiloma humano 61, 62 y 6 persistieron, por lo que el tiempo de evaluación y el periodo de aplicación quizás sean factores importantes que influyeron en esta persistencia. Desafortunadamente, hasta el momento se carece de publicaciones en las que se utilice imiquimod en el cuello uterino. Sólo se utilizó en la vulva en el tratamiento de neoplasia intraepitelial vulvar y sus resultados reportan que es un tratamiento prometedor para eliminar este tipo lesiones. En todos los estudios donde se reportó la administración de imiquimod para tratar verrugas genitales y anales, la mayoría de las pacientes tuvo reacciones secundarias, aún cuando la aplicación del imiquimod fue en zonas diferentes. En nuestros resultados no se observaron pacientes con reacciones secundarias.

La efectividad de la crioterapia más imiquimod y del asa diatérmica más imiquimod crema al 5% para eliminar la lesión intraepitelial de bajo grado fue similar. Por lo tanto, el Papanicolaou y la colposcopia tienen porcentaje mayor para los casos que recibieron la crioterapia sin la crema (90 y 100%, respectivamente), es decir, que se logró curar a 9 de 10 mujeres. El asa diatérmica, como tratamiento único, tuvo efectividad del 88 al 94%, respectivamente: se logró curar a 15 de 17 mujeres. Nuestros resultados son similares a otra investigación,¹⁷ donde se estudiaron cuatro pacientes con diagnóstico de neoplasia intraepitelial vulvar 3 más virus del papiloma humano. Se les administró imiquimod crema al 5% después de la crioterapia o vulvectomía parcial. Se observó que la aplicación de imiquimod crema al 5%, después del tratamiento ablativo o la aplicación de un agente tópico, es efectiva en la eliminación de la infección por el virus del papiloma humano. El 70% de las mujeres tratadas con imiquimod lograron eliminar al virus del papiloma humano. De ellas, tres casos tenían virus de alto riesgo y uno persistencia del virus 58: el Papanicolaou y la colposcopia resultaron negativos. El uso del asa diatérmica más imiquimod crema al 5% tiene 70% de efectividad para curar la infección latente, incluso cuando en la mayor parte de los casos se trataba de infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo y sólo hubo un caso de persistencia al VPHCP8304. Además, un caso tuvo reinfección del virus CP141 (LVX160) y en 18% de los casos restantes la infección fue mínima.

En los casos de infección mínima se eliminó la clínica por completo. Por este motivo existe la posibilidad de que el imiquimod crema al 5%, con más tiempo de aplicación y en un periodo de evaluación más largo, tenga mejores resultados.

En este trabajo, desafortunadamente, no se controló la posibilidad de reinfección, ya que el virus del papiloma humano es una enfermedad de transmisión sexual y fue imposible vigilar al compañero sexual de las mujeres. Esto también es causa importante en los casos de persistencia. Tampoco se controló el uso de preservativo y el consumo de vitamina E.

Agradecimientos

Se reconoce la importante labor del personal de enfermería en la atención y seguimiento de las pacientes del estudio. También, agradecemos a los directivos de la Universidad Autónoma de Guerrero y del Hospital de subzona Núm. 3 y al Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo para realizar este estudio.

REFERENCIAS

1. Bosch FX. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:175-83.
2. Garfias CR, Peral CV, Azpilcueta AJ. Conceptos actuales sobre la infección por virus papiloma humano. *Ginecol Obst Mex* 1995;63:509-13.
3. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang SF. Human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* 1999;274:2696-705.
4. Meyer T, Arndt R, Chistophers E, et al. Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J Infect Dis* 1998;178:252-5.
5. Zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:55-78.
6. Sisk E, Robertson ES. Clinical implication of human papillomavirus infection. *Front Biosci* 2002;7:77-84.
7. Cox JT. Management of cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 1999;353:857-9.
8. Beutner KR. Patient-applied treatment for external genital warts: the time has come. *West J Med* 1998;169:288-97.
9. Manos MM, Waldman J, Zhan TY, et al. Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomavirus. *J Infect Dis* 1994;160:1096-9.
10. Shanta V, Krishnamurthi S, Gajalakshmi CK, Swaminathan R, Ravichandran K. Epidemiology of cancer of the cervix: global and national perspective. *J Indian Med Assoc* 2000;98:49-52.
11. Berth-Jones J, Bourke J, Eglitis H, et al. Value of a second freeze-thaw cycle in cryotherapy of common warts. *Br J Dermatol* 1994;131:883-6.
12. Chirenje ZM, Rusakaniko S, Akino V, Milingo M. A randomized clinical trial of loop electrosurgical excision procedure (LEEP) versus cryotherapy in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *J Obstetric Gynaecol* 2001;21:617-21.
13. Fraught W, Prevost MR, Fung MFK, Senterman M. The efficacy of loop electrosurgical excision procedure as compared to cold-knife cone biopsy in patients with unsatisfactory colposcopy. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999;3:116-20.
14. Kucera E, Sliutz G, Czerwenka K, et al. Is high-risk human papillomavirus infection associate with cervical intraepithelial neoplasia eliminated after conization by loop excision of transformation zone. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2001;100:72-76.
15. Thompson AD, Duggan MA, Nation J, Penny MA. Investigation of laser cervical cone biopsies negative for premalignancy or malignancy. *J Lower Genital Tract Disease* 2002;6:84-91.
16. Tseng CJ, Lin CC, Huang CT, Chou KG, Chang TC. A study of diagnostic failure of loop conization in microinvasive carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1999;73:91-95.
17. Arany I, Tyring SK, Stanley MA, et al. Enhancement of the innate and cellular immune response in patients with genital warts treated with topical imiquimod cream 5%. *Antiviral Res* 1999;44:55-63.
18. Beetheide W, Bernard HU, Tan YJ, et al. Potential drugs against cervical cancer: Zinc-ejecting inhibitors of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1211-20.
19. Edwards L, Ferenczy A, Eron L, et al. Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. HPV study Group. *Arch Dermatol* 1998;134:25-30.
20. Phelps WC, Alexande KA. Antiviral therapy for human papillomaviruses: rational and prospects. *Ann Intern Med* 1995;123:368-72.
21. Stanley M. Papillomavirus: biology and clinical implications for immunotherapy. *Mol Med Today* 1997;3:239-40.
22. Tyring SK. Human papillomavirus infection: Epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:18-30.
23. Vardy DA, Baadsgaard O, Hansen Er, Lisby S, Vejilsgaard GL. The cellular immune response to human papillomavirus infection. *Int J Dermatol* 1990;29:603-10.
24. Yliskoski M, Cantell K, Syrjanen K, Syrjanen S. Topical treatment with human leukocyte interferon of HPV 16 infections associated with cervical and vaginal intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1990;36:353-7.
25. Arany I, Tyring SK, Brysk MM, et al. Correlation between pre-treatment levels of interferon response genes and clinical response to an immune response modifier (Imiquimod) in genital warts. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1869-73.
26. Beutner KR, Spruance SL, Hougham AJ, et al. Treatment of genital warts with an immune-response modifier (imiquimod). *J Am Acad Dermatol* 1998;38:230-39.
27. Dahl MV. Imiquimod: an immune response modifier. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:1-5.
28. Stockfleth E, Rowert J, Arndt R, Chistophers E, Meyer T. Detection of human papillomavirus and response to topical 5% imiquimod in a case of stucco keratosis. *Br J Dermatol* 2000;143:846-50.
29. Trindle RW, Frazer IH. Immunology and anogenital human papillomavirus (HPV) infection. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1990;30:370-5.
30. Golfarb MT, Gupta AK, Gupta MA, Sawchuk WS. Office therapy for human papillomavirus infection in nongenital sites. *Dermatol Clin* 1991;9:287-96.

31. Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002;78:1-7.
32. Mayrand ME, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3388-93.
33. Rosseau MC, Franco EL, Villa LL, et al. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:469-76.
34. Schiff M, Beckert TM, Masuk M, et al. Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in Southwestern American Indian Women. *Am J Epidemiol* 2000;152:716-726.
35. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infection Diseases* 1994;170:1077-85.
36. Harnish DG, Belland LM, Sheid EE, Rohan TE. Evaluation of human papillomavirus consensus primers for HPV detection by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1999;13:9-21.