

Estudio piloto para la detección del Virus del Papiloma Humano en niños menores de dos años y en sus madres.



Diana Carolina Zambrano Ríos

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2015

Estudio piloto para la detección del Virus del Papiloma Humano en niños menores de dos años y en sus madres.



Diana Carolina Zambrano Ríos

Trabajo de investigación presentado para optar al título de magister en Ciencias Biomédicas

Director

Enrique Herrera Castañeda MD.

Co-Director

Andrés Orlando Castillo Giraldo PhD.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
SANTIAGO DE CALI
2015

Nota de aceptación:

Los integrantes del jurado, designados por el comité de postgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle, abajo firmantes, revisaron y aprobaron el presente trabajo de investigación presentado por el estudiante **Diana Carolina Zambrano Ríos**, para optar al título de magister en Ciencias Biomédicas, el día ____ de _____de 2015.

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

DEDICATORIA

A mi Abuela Ofelia, mi amiga, mi motor, alegría y fuerza, a mi mamá por su respaldo y amor, a mi familia por su apoyo incondicional y a Andrés Jenuer por su gran amor, apoyo, lealtad, amistad, y comprensión en cada momento.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de personas valiosas como lo es en primera instancia a los Doctores: Enrique Herrera Castañeda y Andrés Orlando Castillo quienes fueron pilares fundamentales en este proyecto, no solo fueron mis tutores y directores durante todo el proceso sino también mis referentes a seguir, Agradezco inmensamente por haberme dado la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación por formarme académica y personalmente.

A la Dra. Cecilia Aguilar de Plata por depositar en mí su confianza, orientarme en el trabajo y brindarme su valiosa amistad.

A mi Universidad y a mis compañeros del laboratorio de Nutrición, Bioquímica y Biología molecular: Alejandra Arbelaéz, Laura Rodríguez, Guillermo Ortega, Eliecer Jiménez, Carlos Echandía, Fabian Fernández, Diego Piedrahita y Stephania Góngora, por su apoyo incondicional.

Y Finalmente a Dios por ser mi eje central y mi fuerza, a mi familia, por su comprensión, dedicación, paciencia y amor, a Andrés Jenuer por estar siempre a mi lado respaldándome en cada decisión, por escucharme y darme ánimos cuando no veía una salida, por demostrarme en cada acción su amor, comprensión y paciencia durante la realización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.	9
2. INTRODUCCIÓN	10
3. JUSTIFICACIÓN.	13
4. MARCO TEÓRICO.	15
4.1. Generalidades.	15
4.2. Estructura del virus del Papiloma Humano.	16
4.3. Tipos de virus.	16
4.4. Clasificación del Virus del Papiloma Humano.	17
4.4.1. <i>Genotipos de Bajo Riesgo.</i>	17
4.4.2. <i>Genotipos de Alto Riesgo.</i>	18
4.5. Transmisión de la infección VPH.	18
4.6. Infección por VPH en niños a temprana edad.	19
4.7. Transmisión del VPH de madre a hijo.	20
4.8. Cofactores de adquisición de la infección por VPH.	21
4.9. Interacción virus-huésped.	22
4.10. Epidemiología.	22
4.11. Prevalencia de la Infección VPH.	23
4.12. Ciclo de replicación.	24
4.13. Patología	24
4.14. Mecanismo de transformación.	25
4.15. VPH y Cáncer.	26
4.16. Métodos para la detección de la infección por VPH.	28
4.16.1. <i>Métodos no moleculares</i>	28
4.16.2. <i>Métodos moleculares.</i>	30
4.17. <i>Estado del arte.</i>	34
5. OBJETIVOS	37
5.1. Objetivos.	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	38
6.1.1. <i>Descripción general del estudio</i>	38
6.1.2. <i>Criterio de selección de la población.</i>	39
6.1.3. <i>Procedimiento de captación de pacientes</i>	40
6.1.4. <i>Procedimiento para obtener consentimiento.</i>	41
6.1.5. <i>Procedimiento de toma de muestras .</i>	41
6.1.6. <i>Procedimientos.</i>	43
6.1.7. <i>Análisis estadístico.</i>	44
6.2.1. <i>Características sociodemográficas de la población de mujeres participante.</i>	45
6.2.2. <i>Características de comportamiento sexual de las mujeres participantes.</i>	45
6.2.3. <i>Características sociodemográficas de niños menores de 2 años participantes.</i>	47

7. DISCUSION.	53
8. CONCLUSIONES.	56
9. RECOMENDACIONES.	58
10. REFERENCIAS.	59
ANEXOS 1. Tablas de Resultados.	75
ANEXO 2. Consideraciones Éticas	79

Lista de abreviaciones

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AR: Alto Riesgo

BR: Bajo Riesgo

E: Early

HSIL: Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto grado

ITS: infección de Transmisión Sexual

L: Late

LCR: Long Control Region

LSIL: Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado

PCR: Polymerase Chain Reaction

PRR: Papilomatosis Respiratoria Recurrente

P53: Proteína 53

Rb: Retinoblastoma protein

RR: Riesgo Relativo

TGI: Tracto Genital Inferior

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VPH: Virus del Papiloma Humano

1. RESUMEN.

La presente propuesta fue un estudio piloto que evaluó la metodología para la detección del VPH en mucosa oral y los cofactores presentes para la infección en un grupo de niños menores de 2 años y sus madres residentes en la ciudad de Cali, Colombia, con o sin lesiones benignas en la cavidad oral; En este, se evaluó la posible correlación entre el genotipo del VPH en la mucosa oral de la madre y la de su hijo, así como el posible contagio del virus de madre a hijo directo por autoinoculación o heteroinoculación y/o indirecta por fómites contaminados. Se realizó extracción de ADN de las muestras con el kit comercial pure gene bucal cell kit (Quiagen); La detección de VPH se realizó por PCR utilizando los primers generales MY09/MY11 y GP5+/Gp6+. Los resultados se analizaron empleado el programa estadístico SPSS, edición 15.0, aplicando un análisis estadístico descriptivo y de las distribuciones de frecuencia y de las medidas de tendencia central; la presencia de VPH, se determinó empleando el test de *ji-cuadrado* con un grado de significancia de 0.05 y un nivel de confiabilidad de 95%.

Se incluyeron 76 participantes mujeres con edades comprendidas entre 22 y 25 años, de las cuales, el 61.8% pertenecían al estrato social 1, el 69.7% vivían en unión libre, 2.6% manifestó el hábito del tabaco, 59.2% no consumió alcohol y el 86.8% no consumió sustancias sicoactivas, a demás de los 76 participantes niños menores de 2 años de edad, el 50% fueron de sexo femeninos, 77.6% de ellos nació por parto natural, 23.7% asistió a la guarderia y ninguno de ellos presentó verrugas corporales.

Para los resultados obtenidos se puede concluir que la prevalencia de detección para el VPH en mucosa oral de madres fue de 6.6% (n=5) mientras que en la cavidad oral de los niños fue del 1,3% (n=1); Los genotipos identificados en la mucosa oral de las madres fueron: VPH11, VPH43 y VPH 73; y el genotipo identificado en la cavidad oral del niño fue: VPH6. Finalmente, en este trabajo no se logró determinar asociación entre la presencia del VPH en cavidad oral de las madres con respecto a los hijos.

Palabras Clave

Virus del Papiloma Humano (VPH), Mucosa Oral, Cáncer, Papilomatosis Respiratoria Recurrente.

2. INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha demostrado que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico del cáncer de cuello uterino al rededor del mundo y su presencia también se ha reportado en cáncer de vulva, vagina y ano en mujeres, y cáncer de ano y pene en hombres (1)(2).

Dentro de las infecciones de transmisión sexual, la infección por VPH es una de las más comunes en el mundo, se estima que hasta un 80% de los adultos sexualmente activos ha tenido alguna vez infección por este tipo de virus. La mayoría de estas infecciones (70% – 90%) son transitorias y se eliminan de forma espontánea en un período de 12 a 30 meses. Las infecciones persistentes que se observan en el 10-15% de las mujeres infectadas, se han asociado con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer cervical (3). Los factores que determinan que una infección sea eliminada o persista en el tiempo son aún desconocidos, sin embargo, la alta frecuencia de infección, reinfección por el VPH y de lesiones premalignas en mujeres inmunosuprimidas sugiere que el sistema inmune tiene un papel importante en el control de dicha infección (4)(5).

Estudios de la naturaleza de la infección por VPH han descrito un aumento en la incidencia y/o prevalencia del virus después del inicio de la actividad sexual, la cual declina con la edad. Aunque parte de este descenso podría ser reflejo de la exposición reducida hacia VPH por la disminución de compañeros sexuales en edades adultas, el efecto acumulativo de la inmunidad naturalmente adquirida podría también ser considerado un factor contribuyente en este descenso (6). Se ha contemplado la hipótesis que los anticuerpos generados por la infección natural podrían proteger contra reinfecciones por VPH del mismo tipo o relacionados, contribuyendo a la disminución de la persistencia de la infección en edades adultas (7)(8).

En contraste, en algunos países en vía de desarrollo como Colombia, un segundo pico de prevalencia del virus se ha observado en mujeres adultas mayores de 45 años (9)(10). Numerosos factores han sido propuestos para explicar la existencia de este segundo pico de prevalencia, dentro de los cuales se puede enumerar: fluctuaciones en los niveles de ADN

viral, infecciones incidentes por contacto sexual con nuevos compañeros (11)(12) y la reactivación de infecciones latentes debido a una disminución en la respuesta inmune con la edad (11)(13).

Los tipos virales son clasificados por el grado de homología de su genoma. Un nuevo genotipo es definido cuando la secuencia de los genes E6, E7 y L1 presenta una homología inferior al 90%. Los virus que presentan entre un 90 y 98% de homología y un perfil de restricción diferente del VPH de referencia son denominados subtipos. Las variantes de VPH son definidas como aislamientos que presentan menos de 2% de variaciones en su secuencia de ADN (14) Además, dependiendo de la asociación o no con el riesgo para el desarrollo del cáncer, los VPH se han dividido en dos subgrupos: los de bajo riesgo (VPH 6 y 11 principalmente) que se encuentran en los condilomas genitales y los de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58, 59, entre otros) que están implicados en el desarrollo de neoplasias del cuello uterino, faringe, ano, vulva, pene, cabeza y cuello (14)(15).

Recientemente, se ha reportado la presencia de VPH de alto riesgo oncológico en diferentes tipos de cánceres de cavidad oral (16) y del sistema aerodigestivo (17)(18), lo cual sugiere que el virus podría participar en la etiología de algunas de estas enfermedades (19). Similares resultados han sido reportados por otros grupos de investigación estudiando diferentes poblaciones humanas a nivel mundial (4). La infección puede adquirirse en diferentes etapas de la vida, se ha demostrado la presencia del VPH en la población infantil y adolescentes, siendo la población adulta la más afectada, específicamente quienes poseen vida sexualmente activa (20). El virus se transmite por contacto directo a través de relaciones genitales, orogenitales y autoinoculación, también se detectó el ADN del VPH en el líquido amniótico, las membranas fetales, la sangre del cordón umbilical y la placenta, lo que indica un posible contacto indirecto en los recién nacidos pudiendo estar expuestos a infección cervical por VPH proveniente de la madre o intrauterinamente (21). Los modos de transmisión viral en los niños son controvertidos, siendo el método más evidente el contacto directo y la transmisión prenatal o en el parto, aunque no está claro con qué frecuencia progresan las lesiones clínicas, ya sea genitales, de laringe o bucales (22).

De allí que el propósito de este estudio estuvo encaminado a determinar la presencia del VPH en la mucosa oral de un grupo de niños menores de 2 años y comparar los genotipos virales identificados con los detectados en la mucosa oral de las madres, concientizando con ello de la realización de un diagnóstico precoz en niños a temprana edad, lo cual permitiría un tratamiento preventivo adecuado en lesiones benignas en cavidad oral, evitando su transformación y progresión a lesiones premalignas y/o malignas. Es preciso tener presente que la infección por VPH a los 2 años de edad es autolimitada debido a la inmunidad adaptativa que ha empezado a adquirir el individuo (23). La importancia de este estudio radica en demostrar que pueden encontrarse genotipos de VPH en cavidad oral de niños menores de dos años aparentemente sanos y debido a la inmadurez de su sistema inmune podrían presentar variaciones fluctuantes en la actividad del mismo conllevando a la reactivación del virus en estado de latencia que podría ocasionar manifestaciones clínicas crónicas que comprometen la vida del niño.

3. JUSTIFICACIÓN.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) representa un importante problema de salud pública (24)(25). Es especialmente notable su participación en la patogenia del cáncer de cuello uterino, de manera que casi todos los casos de esta enfermedad están asociados a una infección persistente por un tipo oncogénico de VPH (26). Por ello, en el contexto de los programas de tamizaje para la detección precoz de las lesiones premalignas del cuello de útero y del propio cáncer cervical uterino, se realizan análisis moleculares por reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), encaminados a detectar y, en su caso, tipificar el VPH en las mujeres afectadas por dichas patologías (27)(28).

La mayor parte de estas infecciones presentan una evolución benigna en el tiempo, pero el estudio de la persistencia de algunas de estas lesiones ha llevado a establecer y probar por algunos científicos su relación con el Cáncer de Cuello Uterino (29). En el mundo, el Cáncer Cérvicouterino, corresponde a la segunda causa de mortalidad por Cáncer en mujeres. Anualmente a nivel mundial se diagnostican más de 450.000 casos nuevos, resultando en un total cercano a un cuarto de millón de muertes por esta causa (30).

El mayor rango de incidencia de infección por el VPH en mujeres se ha reportado a los 15 hasta los 45 años presentándose el pico de mayor prevalencia entre los 15 a los 25 años de edad, múltiples investigaciones describen que la infección por el VPH ocurre a una edad más temprana, lo cual se correlaciona con inicio de la vida sexual a una edad precoz entre los adolescentes y población joven (31)(32). La desinformación sobre el virus, las formas de contagio, y la fragilidad del sistema inmunológico a estas edades, son las principales causas de dicha enfermedad que puede o no causar daños permanentes (33).

Las infecciones por VPH en los genitales femeninos durante el embarazo generalmente en el tercer trimestre de gestación incrementan la probabilidad de contagiar al recién nacido durante el parto, tratándose de una infección de difícil resolución denominada

papilomatosis respiratoria recurrente o papilomatosis laríngea, justamente por la aparición de verrugas o papilomas en la laringe y vías aéreas digestivas superiores del niño, ocasionando cuadros graves de dificultad respiratoria que pueden ocasionar la muerte si no son tratados de manera oportuna (34). Los síntomas más característicos de esta enfermedad son: disfonía, disnea, disfagia, dificultades respiratorias, entre otras (35). Cuando estas lesiones son visibles el diagnóstico de contagio en el parto se hace más fácil y manejable ya que la madre manifiesta en su hijo la presencia de dichas lesiones desde el nacimiento (36).

La presente propuesta es un estudio piloto que pretendió evaluar la presencia del VPH en mucosa oral en un grupo de niños menores de 2 años y sus madres residentes en la ciudad de Cali, Colombia, con o sin lesiones benignas en la boca. Además, se evaluó la existencia de correlación entre el genotipo del VPH en la mucosa oral de la madre y la de su hijo que permita evaluar si hay contagio del virus de madre a hijo directo por autoinoculación o heteroinoculación y/o indirecta por fómites contaminados.

Del mismo modo, la presente investigación identificará si los genotipos de VPH tanto de alto riesgo (AR) como de bajo riesgo (BR) que puedan estar infectando la mucosa oral de niños a una edad temprana, en cuyos casos la inoculación con la vacuna profiláctica vigente en la edad escolar solo les daría una protección parcial o nula. Esta información es de una altísima importancia para el actual programa de vacunación en contra del VPH que realiza el gobierno colombiano, ya que permitirá tener unos estimativos más precisos de las características de la población infantil candidatas a vacunación a demás de cuanta población infantil podría realmente ser inmunizada.

4. MARCO TEÓRICO.

4.1. Generalidades.

El Virus del Papiloma Humanos es un conjunto de pequeños virus de ADN de doble cadena encapsulados, al igual que los demás virus, aprovechan la maquinaria celular del hospedero para replicarse. Son epiteliotropicos y una vez que alcanzan la capa de células basales de los epitelios planos, estratificados, mucosos o queratinizados, pueden permanecer en forma episomal, en estado letente hasta por mas de 10 años, o bien abandonar esa latencia y aprovechar la diferenciación celular propia del epitelio con el fin de dar origen a nuevos viriones que infectaran las células adyacentes o por el contrario al abandonar el estado de latencia pueden integrar su genoma en el genoma del hospedero aumentando el riesgo de transformación neoplásica del tejido infectado (37).

El VPH expresa sus genes de forma secuencial; en primer, lugar los genes tempranos (E1-E7) en las células basales y, posteriormente, en las células diferenciadas de la superficie del epitelio expresan proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside viral y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repitiran el ciclo. En determinadas circunstancias de permisividad inmunológica y tras un periodo de persistencia de la infección, las partículas de ADN viral que se encuentran en forma episomal, se integran al genoma celular, en conjunto con la expresión de genes del hospedero en el ciclo vital se expresan los genes virales que luego son traducidos en proteínas que tienen la función de intervenir en el funcionamiento de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular tales como P53 y Rb, promoviendo alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical, por lo tanto se incrementa la acumulación de errores genéticos (clastogénesis) que son la base de la transformación tumoral (38).

El virus del Papiloma humano puede tipificarse cuando dos secuencias víricas presentan en la región L1 una diferencia mayor al 10% considerándose genotipos distintos. Cada uno tiene su propio tropismo celular y potencial patógeno (39).

Actualmente se han caracterizado mas de 100 tipos de VPH con mas de 40 tipos danogenitales, de los cuales 15 de ellos son oncogénicos. En los seres humanos, constituyen uno de los grupos virales mas frecuentes que infectan el tejido epitelial de piel y mucosas:

conjuntivas, cavidad oral, laringe, árbol traqueobranquial, esófago, vejiga, ano y tracto genital (40). En los últimos 30 años se ha observado un alarmante incremento en la prevalencia de la infección por el VPH y su relación con los procesos oncogénicos.

4.2. Estructura del virus del Papiloma Humano.

Taxonómicamente los VPHs pertenecen a la familia Papillomaviridae, son virus muy estables, con capacidad de infección duradera y resistencia a numerosos agentes terapéuticos. Es un grupo de virus pequeños, constituidos por una cápside icosaédrica y un genoma compuesto de una doble hélice de ADN, formada por 8.000 pares de bases (41). Su genoma se divide en tres regiones:

Región temprana (E: Early): representa el 45% del genoma. Tiene hasta ocho marcos de lectura abierta (E1-E7) que codifican las proteínas no estructurales, cuya función es controlar la replicación del ADN viral:

- Las proteínas E1-E2 pueden actuar como activadoras de la transcripción.
- E4: Responsable de la maduración y replicación.
- E5: Estimula la proliferación.
- Las proteínas E6-E7: son oncoproteínas transformantes.

Región tardía (L: Late): corresponde al 40% del genoma. Consta de dos genes (L1-L2) cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cápside viral.

Región larga de control (LCR): constituye el 15% del genoma viral. Controla la expresión de los genes E6 y E7.

Los genes de expresión temprana (E) difieren en su secuencia entre los diferentes tipos de VPHs. Los genes de expresión tardía (L), presentan notables similitudes entre ellos (1).

4.3. Tipos de virus.

Entre los más de 130 tipos del virus del Papiloma Humano que se han identificado, se han

podido clasificar en tres grandes grupos de acuerdo a la localización de la infección en el hospedero:

- a) Los localizados en la piel, causantes de las verrugas vulgares y las verrugas plantares.
- b) Los ubicados en la zona genital, causantes de verrugas genitales.
- c) Los localizados en la zona genital, asociados al desarrollo de cáncer de cuello de útero (42).

La infección por el VPH es causa necesaria pero no suficiente para el cáncer de cérvix, ya que sólo una fracción de las mujeres infectadas con el virus desarrollará más adelante un cáncer de este tipo. Hay múltiples factores genéticos, socioculturales, ambientales entre otros que aumentan la probabilidad de desarrollo tumoral ante la presencia del VPH en el tejido infectado, tales como: consumo de tabaco, alcohol y sustancias psicoactivas, mutaciones en genes supresores de tumores tales como P53, P21 y proteínas de la familia Retinoblastoma (11,26,38).

4.4. Clasificación del Virus del Papiloma Humano.

Los Virus de Papiloma Humano se pueden clasificar en 3 grandes grupos dependiendo del riesgo que tienen de provocar lesiones cancerígenas: Bajo Riesgo, Mediano Riesgo y Alto Riesgo. Los de bajo riesgo son los más frecuentes y los menos agresivos dentro de este grupo se destacan los genotipos 6 y 11, los genotipos de mediano riesgo mas representativos son: 31, 33, 35, 51, 52 y los de alto riesgo son los más frecuentes y agresivos los más representativos de este grupo son los genotipos 16 y 18.

4.4.1. Genotipos de Bajo Riesgo.

Algunos tipos de VPH se conocen como de "**bajo riesgo**" puesto que su presencia en determinado tejido no implica un riesgo alto para el desarrollo de lesiones cancerígenas, los tipos de VPH de bajo riesgo pueden causar cambios leves en el epitelio infectado y no conducen al cáncer. No son perjudiciales y desaparecen con el tiempo; los genotipos virales mas representativos de este grupo son: VPH 6, 11.

Estos genotipos virales al infectar el tejido epitelial, son causantes de lesiones verrugosas conocidas como condilomas (43). Dentro de este grupo se lesiones benignas se encuentran las verrugas genitales, las cuales son crecimientos anormales del tejido epitelial plano, estratificado, queratinizado o mucoso que recubre los genitales masculinos y femeninos, por lo general son indoloros y su aspecto es variable ya que algunas pueden ser elevadas, planas, pequeñas o grandes, simples o múltiples. Se desconoce por qué el VPH de bajo riesgo causa verrugas genitales en algunos casos, pero no en otros que pueden terminar en cáncer (43).

4.4.2. Genotipos de Alto Riesgo.

El segundo grupo de tipos de VPH genital se conoce como de "**alto riesgo**" porque estos tipos se asocian con el cáncer cervical e incluyen el VPH 16, 18. De estos tipos el VPH 16 y el 18 son, sin duda, los más representativos dado que se encuentran con más frecuencia vinculados al desarrollo de lesiones oncogénicas cuando infectan el tejido epitelial. Son los genotipos mas frecuentemente aislados de lesiones malignas cervicouterinas.

Por lo general, el 90% de las infecciones causadas por el VPH de **alto riesgo** se resuelven en el transcurso de 18 meses, sin embargo en ocasiones, la infección por este tipo de virus puede provocar transformaciones celulares malignas que en el tiempo, pueden conducir al cáncer, si no son tratados oportunamente. La infección persistente de VPH por genotipos de alto riesgo aumenta el riesgo de desarrollar cáncer en el hospedero (43).

Dentro de la lesiones malignas causadas por VPHs de alto riesgo mas frecuentemente estudiadas se encuentra el cáncer de cérvix, por lo general comienza con lesiones planas, pequeñas y casi invisibles, comparados con las verrugas externas causadas por los VPH6 y VPH11 de bajo riesgo, lo cual dificulta el diagnóstico y por ende el tratamiento oportuno.

4.5. Transmisión de la infección VPH.

El VPH se transmite con por contacto sexual, a través de erosiones mínimas de la piel y mucosas. El cuello del útero es especialmente vulnerable al contagio, probablemente a través del epitelio metaplásico de la unión escamoso-cilíndrica. Las vías de transmisión genital, distintas al coito, son probables aunque menos comunes. El riesgo de transmisión

por contacto digital-genital u oral-genital parece ser mínimo. Se ha descrito la transmisión vertical de la madre al neonato en más del 80% de los casos nacidos de madres infectadas con VPH genital al determinarse el ADN del VPH en la región naso-faríngea y mucosa oral (44).

4.6. Infección por VPH en niños a temprana edad.

La detección de ADN del VPH en mujeres vírgenes, bebés y niños sugiere que el contacto sexual no es el único modo de transmisión del VPH (45)(46), por lo que se propone una transmisión no sexual horizontal directa por auto inoculación o hetero inoculación e indirecta por fómites contaminados (47). Otras rutas de transmisión no sexuales se han propuesto, tales como: la sangre, la saliva y la leche materna pero aun no hay pruebas suficientes que las confirmen (48). Igualmente, la transmisión no sexual del VPH puede ocurrir de manera vertical durante el parto entre la madre y el recién nacido (49).

Las verrugas o papilomas son las manifestaciones clínicas más comunes de las infecciones por VPH en los niños en edad temprana. La papilomatosis respiratoria juvenil recurrente es una rara enfermedad pediátrica causada principalmente por el VPH 6 y 11 (45)(50). El condiloma genital materno durante el embarazo es reconocido como un reservorio para el VPH asociado con el desarrollo del síndrome de la papilomatosis respiratoria recurrente en los recién nacidos (45)(50). En un estudio retrospectivo de cohorte de nacimientos en Dinamarca, entre los años 1974 y 1993, se encontró que las madres que presentaban verrugas genitales durante el embarazo conferían un riesgo mayor de papilomatosis respiratoria recurrente a sus hijos con aparición de la patología en edades muy tempranas, promedio de 4,3 años, en comparación con los nacidos de mamás sin verrugas genitales cuya aparición de la enfermedad fue a una edad promedio de 5,9 años (51).

La incidencia de verrugas ano-genitales en los niños ha aumentado constantemente durante las últimas décadas (49). Las tasas de detección de ADN del VPH en la mucosa genital de los niños varía desde el 0% al 53% (52)(53) y en la mucosa oral desde el 0% al 61% (54). (55). Un estudio en la región de Wielkopolska en Polonia reportó una detección del VPH del 1.1% en 4.150 niños y adolescentes escolares, entre los 10 a 18 años edad (56).

4.7. Transmisión del VPH de madre a hijo.

Estudios realizados en Finlandia, el grupo de la Dra. Syrjanen de la Universidad de Turku, han reportado que la presencia de VPH es 17,9% en muestras orales de recién nacidos y que el numero de genotipos de VPH identificados es menor a los hallados en muestras cervicales maternas, con lo anterior ellos sugieren que una posible ruta de transmisión del virus de madre a hijo seria a través de la placenta y del cordón umbilical (57). En estudios de cohorte, en 72 familias Finlandesas, reportados por el mismo grupo de investigación, analizaron la presencia del VPH en muestras de semen y en verrugas orales y genitales, encontrando un 29% de infección por genotipos de VPH de AR en todos los miembros de las familia, en donde el 26% de los genotipos identificados fueron comunes entre madres e hijos y el 11% entre el padre y el recién nacido. La proporción de VPH detectado en mucosa oral al momento de nacimiento en el recién nacido fue del 10%, a los seis meses fue del 21% y a los 24 meses del 10% (58). Un posterior reporte siguiendo a la misma línea de investigación señaló un cambio en el porcentaje de detección del VPH del 12% al 21% en muestras orales, y del 4% al 15% en muestras genitales en los niños desde el momento de su nacimiento hasta los 3 años de edad. Adicionalmente, se observo en las muestras orales de los niños un 42% de nuevas infecciones por VPH adquiridas durante el seguimiento, de las cuales 11% fueron eliminadas por sistema inmune y el 10% fueron persistentes (59).

Otros estudios realizados en Estados Unidos han mostrado una baja detección de VPH en muestras orales de la madre (3,0%) y de sus hijos (0,9%), asimismo se halló en mucosa cervical de la madre una infección del 27,9% con una concordancia entre lo detectado en ambas mucosas del 29,7% (60) como también una poca concordancia entre los genotipos de VPH identificado en la madre e hijo y el padre e hijo, en un caso cada uno. En Colombia son escasos los estudios en donde se ha reportado la transmisión de VPH de madre al recién nacido, solo un caso clínico positivo para VPH en mucosa oral se ha evidenciado la transmisión verticalmente de madre a hijo (61).

Una propuesta de transmisión no sexual del VPH (62)(63), por vía vertical explicaría la infección en recién nacidos (64). Además, se ha demostrado que la mucosa oral puede ser

reservorio del virus en los niños (65) y en la adolescencia (66), cuya persistencia podría estar asociada a desarrollo de patologías en edades avanzadas.

4.8. Cofactores de adquisición de la infección por VPH.

El riesgo de infectarse por el VPH está relacionado con el comportamiento sexual: edad del primer coito, número de compañeros sexuales y relaciones sexuales con compañeros que tienen o han tenido múltiples parejas sexuales.

Edad del primer coito: las características histológicas de la zona de transformación escamoso-cilíndrica en el exocérnix de las mujeres jóvenes, pueden explicar el mayor riesgo de infección entre las mujeres que inician tempranamente la actividad sexual (67). La inmadurez cervical, las deficiencias de flujo cervical protector y la ectopia cervical aumentada pueden conducir a una mayor susceptibilidad para la adquisición de una infección por el VPH en mujeres adolescentes y adultas jóvenes.

Número de compañeros sexuales: La asociación entre el número de parejas sexuales y la probabilidad de detectar ADN del VPH en el tracto genital inferior es consistente. El tiempo que transcurre entre una pareja y otra, es otro factor influyente, ya que existe más riesgo de infección si el lapso de tiempo entre una pareja y otra es corto (68).

Otras Infecciones de transmisión sexual como clamidiasis, herpes, VIH, entre otras, actúan como cofactores en el desarrollo de lesiones pre neoplásicas y cáncer de cuello uterino. El VIH se asocia tanto a la prevalencia, como a la progresión de infecciones por VPH a lesiones neoplásicas del Tracto Genital Inferior (TGI) y del canal anal. Las pacientes portadoras de VIH tienen más riesgo de infección por el VPH (RR: 17) y 9 veces más riesgo de desarrollar cáncer de cérvix. Es debido a las modificaciones que se producen en la inmunidad general y local de estas pacientes (69).

La **circuncisión masculina** actúa como factor protector frente a la infección, se asocia con un menor riesgo de infección por VPH y con menor riesgo de transmisión y progresión a cáncer de cérvix en sus compañeras sexuales (70).

El uso del **preservativo** durante el contacto sexual es una barrera que disminuye la posibilidad de contagio, pero no se previene por completo la transmisión del VPH (69).

4.9. Interacción virus-huésped.

En la mayoría de las ocasiones, las partículas virales en la superficie del epitelio cervical o del tracto genital inferior son eliminadas durante la descamación propia del epitelio estratificado o por los agentes de la inmunidad inespecífica como los macrófagos. El VPH es un patógeno intracelular estricto, por tanto, requiere internalizarse en la célula huésped para que se considere una infección verdadera. En el tercio inferior del epitelio tiene lugar la replicación de las células basales, cuya maquinaria utilizarán los VPH para su propagación. Este contacto se ve favorecido por los micro traumatismos y por las características del epitelio como son la ectopia y la metaplasia escamosa. A este nivel los agentes de inmunidad inespecífica, inflamatorios y los anticuerpos naturales, son capaces de eliminar las partículas virales que colonizan el epitelio.

Una vez producida la infección de las células basales, los VPHs expresan sus genes de forma secuencial, primero los genes de expresión temprana (E1y E7) en las capas basales, que dan lugar a las proteínas E6-E7 que actúan como proteínas oncogénicas ya que bloquean a las proteínas de control celular, evitando la apoptosis. En las capas superiores, donde el epitelio es diferenciado, comienzan a expresarse los genes de las proteínas estructurales (L1 y L2) que permiten el ensamblaje viral (71).

4.10. Epidemiología.

La epidemiología de la infección por VPH no se conoce con precisión, ya que la condición latente solo puede ser diagnosticada por técnicas moleculares que no se utilizan de rutina. El VPH genital es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente en la población mundial. El 60 – 75% de la población sexualmente activa esta infectada por

algún tipo de VPH genital. Se han descrito otras formas alternativas de transmisión viral (vertical o materno fetal y horizontal o por fómites) (72)(73).

4.11. Prevalencia de la Infección VPH.

El VPH representa la infección de transmisión sexual más frecuente. Su prevalencia es muy elevada en varones y en mujeres jóvenes sexualmente activos. En la segunda década de la vida se estima una prevalencia del 20-25%, pero en algunos grupos de adolescentes o de mujeres jóvenes la infección llega a afectar hasta a un 70% de individuos (72). En la tercera década la prevalencia disminuye, y a partir de los 35 años se mantiene estable en unos valores próximos al 5% (74).

La prevalencia de la infección por VPH en mujeres asintomáticas, varía entre el 2 y el 44% (75). La prevalencia del VPH-AR en la población general se correlaciona muy bien con las tasas de incidencia de cáncer de cuello uterino en todas las regiones del mundo (27). Las tasas ajustadas por edad son más altas en los países con mayor incidencia de carcinoma de cérvix.

Los valores más elevados se observan en África (23,4%) y en América (12,8%), España se sitúa entre los países de baja frecuencia. La prevalencia del ADN del VPH en mujeres con citología normal, es de un 10,2% a nivel global, en África un 22,4%, en América un 13%, en Europa un 8,2% y en Asia un 7,9% (5) y, concretamente, en Málaga del 11.43% (76).

En América latina y España se ha observado un segundo pico de infección en mujeres alrededor de la menopausia, que puede estar asociada a la reactivación de infecciones latentes, causadas por una pérdida gradual de la inmunidad o infecciones nuevas que ocurren en el periodo perimenopáusico (77).

En España se estima que la prevalencia del VPH en mujeres de la población general es de aproximadamente el 9% en el conjunto de edades, con una prevalencia superior en las mujeres jóvenes y un descenso gradual con la edad hasta llegar a valores inferiores al 4% en edades perimenopáusicas (77) Esta prevalencia es similar a la estimada para Europa (9,7 %) y significativamente más baja que la mundial (77). El VPH 16 es el más prevalente en mujeres con citología normal, LSIL y HSIL (78).

4.12. Ciclo de replicación.

El ciclo de replicación del virus esta ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales del huésped con un alto grado de tropismo por el epitelio escamoso en diferentes regiones (región oral, vías respiratorias superiores, región ano genital).

Los elementos que determinan la especificidad del virus son los factores de transcripción producidos por las células hospederas. La expresión de los genes de los diferentes tipos de VPH la regulan de manera estricta y específica los factores de transcripción: 1/CTF, CEFI, CEFII y TEFI. El virus inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes.

El VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio a través de las lesiones, micro traumas, y abrasiones del tejido (79). El virus se une a la célula blanco a través de un receptor de membrana ($\alpha 6$ integrina), se establece dentro del núcleo de las células basales, el ADN viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose lentamente (80).

Cuando las células infectadas se diferencian y desde la capa basal hasta el estrato espinoso del epitelio, hay replicación viral y acumulación de viriones dentro del núcleo. La expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo, la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos córneos, así como el ensamblado de las capsides virales que dan lugar a la formación de viriones. El VPH no tiene fase lítica.

4.13. Patología

El virus induce la formación de lesiones papilomatosas, la manifestación morfológica más común es la verruga, que es hiperplasia epitelial benigna con acantosis.

El proceso neoplásico asociado con el VPH involucra el epitelio escamoso y células columnares. La afección produce cambios importantes en la morfología celular, como vacuolas peri nucleares, núcleo agrandado, irregular e hipercromico (coilocitos) (81).

La malingnizacion de una lesión, transcurre lentamente en lesiones pre malignas y pre invasivas.

La historia natural de la infección por VPH en carcinoma cervical es:

1. Remisión completa: después de un periodo de incubación de 3 semanas a 8 meses aparecen lesiones condilomatosas o aplanadas típicas de la infección con una posterior eliminación del virus por parte del sistema inmune (81).
2. Infección latente: se presenta sin evidencia clínica ni histológica, solo es posible detectarla con métodos de detección del ADN. Se desconoce el tiempo y las condiciones para que una lesión latente evolucione a una fase subclínica o clínica aunque los estados de inmunodeficiencia pueden activarla (81)(82).
3. Infección progresiva y activa: evolución a lesiones precancerosas) neoplasia intra epitelial cervical (NICI, NIC II, carcinoma in situ), seguido de una lesión invasiva o cancerosa (81).

La infección en mucosa puede ser asintomática, subclínica o clínica. En la mayoría de los casos, la infección es latente y el virus se detecta mediante técnicas de identificación viral. Los tipo 6 y 11 tienen un bajo potencial oncogénico (bajo grado). Causan condilomas y lesiones precancerosas. Los subtipos 16 y 18 (alto grado) son responsables de las lesiones intra epiteliales que progresan a carcinoma (68)(83).

4.14. Mecanismo de transformación.

Las regiones E6 y E7 son esenciales para la oncogénesis y la replicación viral. Producen las proteínas necesarias para la transformación. Estas se unen a las proteínas supresoras de tumores p53 y del gen de retinoblastoma (Rb) respectivamente y les impiden actuar de forma normal al cegarlas e inactivarlas (82)(84). Durante la integración del virus con el genoma de la célula hay sobre expresión de E6 y E7 (85)(86).

La proteína E6 de los VPH de alto riesgo se une con la molécula p53, regulador de la replicación celular y supresor tumoral capaz de detectar daños sufridos por el ADN. Si el daño ha sido en una etapa del ciclo celular en la que aun no ocurrido la replicación, p53 envía una señal para que el ciclo celular se detenga y el daño sea reparado.

Cuando el daño es sufrido durante o después de la replicación, envía una señal para detener el ciclo celular y sufre un proceso de apoptosis dirigido por la misma p53, así el ADN

dañado no se hereda a las células hija (84).

La proteína E7 se une al producto del gen represor de tumores Rb este fue descubierto y caracterizado en el retinoblastoma, como regulador del ciclo celular, que se une al factor transcripcional E2F, que induce la transcripción. Cuando la célula es infectada por el VPH de alto riesgo, la proteína E7 de VPH se une a este sitio de Rb impide la regulación de E2F, el cual queda libre e induce la replicación celular continua.

Los genes E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células, produciendo tumores cervicales a largo plazo. Su actividad esta regula por la expresión del gen E2, que reprime la transcripción de los genes. Cuando el genoma viral se integra, se observa una ruptura del ADN viral a nivel del gen E2, perdiendo sus funciones lo que resulta en la sobreexpresión de los oncogenes virales E6 y E7; Esta transformación es independiente de la existencia de lesiones benignas o malignas en el tejido infectado.

4.15. VPH y Cáncer.

El comportamiento biológico del virus y su potencial oncogénico es complejo (87).

Un prerrequisito es que el VPH se integre al ADN del huésped, como ocurre en los cánceres invasores o indiferenciados (88).

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

Todas las células de la lesión contienen genomas de tipo viral, pero la activación depende de la diferenciación celular. La mayoría de los genes virales se activan cuando los queratinocitos infectados dejan la capa basal. Las partículas virales se producen en los queratinocitos diferenciados. Los virus se producen en la superficie epitelial y salen al medio ambiente (89).

La multiplicación viral esta confinada al núcleo. Las células muestran un alto grado de

atipia celular. Los coilocitos son característicos en la infección por VPH, se observan halos perinucleares claros y núcleos picnoticos (83). Cada tipo de VPH tiene afinidad por sitios específicos de piel o mucosa. En mucosa nasal, bucal, laringe y conjuntiva se han encontrado los subtipos 6 y 11 (89).

Los VPH se encuentra distribuido en la población y algunos de ellos asociados con procesos malignos: tracto genital (cáncer cervical) (90), carcinoma de cavidad oral amígdalas (91) laringe (92), pulmon (93), esófago y colorectal (94) esto demuestra el potencial papel de los VPH en la patogénesis de los tumores malignos.

Los VPH de alto riesgo han sido encontrados en el 99.7% de los tumores cervicales analizados. El cáncer cervical, es la primera o segunda causa de morbilidad en mujeres en países en desarrollo (95)(96). Los mismos tipos virales que afectan al cérvix están asociados a otros tumores genitales en ambos sexos (pene, vulva, vagina y ano) y algunas neoplasias presentes en la cavidad oral, oro faringe y piel (97). En cavidad oral se encuentran más comúnmente en lengua, paladar, encía y labio, sin embargo la malignización es menos frecuente (98).

Se ha observado la relación de cáncer de cabeza y cuello con la presencia de VPH, como factor de riesgo y pronóstico favorable. Se encuentra en pacientes jóvenes (< 45 años), sin antecedentes de alcoholismo o tabaquismo. Los subtipos identificados 16 y 18 en lesiones pre malignas (leucoplasia). Aun no se conoce el mecanismo de transmisión y malignización celular (89)(83).

En cáncer de mama se ha identificado VPH tipo 16 y 18, (99). Por el contrario Gopalkrishna et al. No lo encontraron (100). Estudios recientes, sugieren la asociación de infección viral por VPH en cáncer de mama, con una correlación de 0-86%, sin relación con lesiones ano genitales. Desconociendo el mecanismo por el cual llega a infectar las mamas. La prevalencia reportada es del 24 - 46% (99)(101).

El VPH se relaciona con carcinoma epidermoide de oro faringe (amígdalas) donde se ha identificado el virus en 80% de los casos. En un estudio realizado en México por Gallegos-Hernandez (89) identificó el VPH16 en 42% de los pacientes estudiados con cáncer avanzado de cabeza y cuello mediante hibridación in situ y PCR. Otros autores han reportado encontrarlo en 11-83% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello (83)(102).

4.16. Métodos para la detección de la infección por VPH.

4.16.1. Métodos no moleculares

Se trata de métodos indirectos que más que objetivar la presencia de VPH, sirven para poner de manifiesto las consecuencias clínicas, citológicas o histológicas de la infección.

a- Técnicas de inspección visual:

Consiste en observar la presencia de manifestaciones clínicas de la infección por VPH, mediante la exploración física e inspección con ácido acético o lugol.

Mediante la exploración física, las verrugas genitales se detectan fácilmente a simple vista, sin requerirse más que condiciones de iluminación adecuadas y algún dispositivo de aumento.

La inspección del cérvix uterino precisa de una mesa ginecológica, espéculos, fuentes de luz y compuestos químicos reveladores de lesiones tales como el ácido acético y el lugol.

La inspección con ácido acético consiste en aplicar una solución diluida de dicha sustancia (3-5%) sobre la zona a estudiar, de manera que se produce una tinción de las áreas de epitelio que contienen células con relación núcleo/citoplasma aumentada, por mecanismos desconocidos. Estas lesiones se denominan “zonas acetoblancas”. Existe un amplio rango de cambios epiteliales que se tiñen de blanco con el ácido acético, que incluyen la metaplasia escamosa inmadura, las displasias producidas por el VPH (tanto las de bajo como las de alto grado), y el cáncer cervical (1). En el caso del varón esta prueba no está estandarizada por lo que es frecuente que dé resultados falsamente positivos debido a la presencia de lesiones de otras dermatosis que también se tiñen de blanco con ácido acético (103)(104). La prueba del lugol se basa en que el yodo que contiene esta sustancia oscurece los depósitos de glucógeno de las células epiteliales de la mucosa cervical, de manera que las áreas de metaplasia inmadura, neoplasia, atrofia y condilomas se tiñen solo de manera parcial o no lo hacen, dado que contienen menos glucógeno.

Estas técnicas tienen la limitación de que la definición de un caso como positivo puede variar, ya que los resultados se evalúan de forma subjetiva. Además, se trata de pruebas de baja especificidad y escaso valor predictivo positivo, siendo en cambio de alto valor

predictivo negativo, por lo que son útiles para los programas de tamizaje (26).

b- Colposcopia

Es una técnica que permite la visualización estereoscópica del cérvix uterino con iluminación y aumento (6-40x). El procedimiento habitual para la realización de una colposcopia incluye la aplicación secuencial de diferentes líquidos al cuello uterino (suero fisiológico, ácido acético y lugol). Se observa la zona de transformación en busca de anomalías, que se valoran en función de una serie de variables, que incluyen la tinción de blanco con el ácido acético, los márgenes de la lesión, el aspecto de los vasos sanguíneos y la captación del yodo.

La colposcopia resulta más útil como prueba de diagnóstico de las lesiones cervicales como medio para orientar las biopsias, en el caso de obtenerse una citología positiva, como prueba de *screening*. Además, muestra una mayor sensibilidad para la detección de lesiones de alto grado y cáncer, con respecto a las lesiones de bajo grado (26).

La colposcopia se ha empleado en el estudio de las infecciones por VPH, aparte de la patología cervical, sobre todo para la detección de lesiones subclínicas en vagina, vulva, pene, ano y región perianal (26). En el caso del pene, existe un estudio que, comparando la prevalencia de lesiones acetoblancas evidenciadas por medio de colposcopia con la detección de ADN viral mediante PCR y la determinación de la carga viral, ha demostrado que en pacientes con mayor carga viral las lesiones acetoblancas son más frecuentes y de mayor tamaño (105).

La anoscopia de alta resolución es una variante de la colposcopia para orientar las biopsias de diagnóstico de cáncer anal y sus lesiones precursoras (26). La utilidad de esta técnica, no obstante, es controvertida, ya que, a pesar de que se recomienda su uso en algunas guías de práctica clínica (106), existen autores que la consideran poco sensible y/o específica (107) (108).

c- Citología e histopatología.

El diagnóstico de una infección por VPH basándose en la citología es muy difícil, ya que la mayoría de los signos citológicos, como la atipia, son indicativos de la presencia de lesiones precursoras del cáncer cervical, pero no de la infección por VPH en sí que suele

pasar desapercibida, a diferencia de las técnicas de detección de ADN viral. El dato citológico más orientativo de una infección por VPH en sí misma es la coilocitosis, consistente en la combinación de atipia nuclear y la formación de un halo claro peri nuclear.

La histopatología es también una técnica poco sensible a la hora de detectar una infección por el VPH. La presencia de coilocitos en las secciones de tejido muchas veces es difícil de evaluar ya que puede haber células con halos peri nucleares debidos a artefactos producidos durante su procesamiento (26).

4.16.2. Métodos moleculares.

a- Detección de proteínas de VPH en tejidos infectados

Se basa en el uso de anticuerpos específicos frente a las proteínas tardías de la cápside del virus, las proteínas tempranas o frente a proteínas celulares que se expresan cuando una célula está infectada por el VPH. Pueden aplicarse a diferentes técnicas, ya sea la detección de estas proteínas en citologías o secciones de tejido, por visión directa (inmunohistoquímica), o en extractos proteicos virales (*western blot* o inmunoprecipitación) (26).

La detección de proteínas tardías tiene la desventaja de que solo diagnostica infecciones productivas. Se ha realizado para la proteína L1 de VPH 16 o para las de un *pool* de tipos de VPH de alto riesgo (109).

Las proteínas tempranas son difíciles de detectar debido a que se expresan en escasa cuantía. Existen anticuerpos frente a E5, E6 y E7, que solo tienen aplicación a estudios *in vitro*, así como un antisuero policlonal de conejo frente a E7, que sirve para detectar VPH 16 en secciones de tejido (110).

La infección de una célula por el VPH trastoca su ciclo celular de manera que se expresan proteínas que normalmente no lo hacen o lo hacen en menor cuantía. La detección de estas proteínas puede ser utilizada, por lo tanto, como método para diagnosticar las infecciones por el VPH. Es el caso del inhibidor de las kinasas dependientes de ciclina p16^{INK4a}, cuya presencia guarda una relación inversa con la de la proteína RB (pRb), de manera que

aquellas células que presentan una delección, mutación o inactivación de pRb expresan p16^{INK4a}, mientras que esta es indetectable en las células que expresan pRb de manera normal (111). La proteína E7 de los VPH mucosos de alto riesgo inactiva a la pRb, de manera que las células infectadas por ellos sobre expresan p16^{INK4a}. Este hecho puede utilizarse para detectar las infecciones por el VPH por medio de un anticuerpo monoclonal frente a p16^{INK4a}, mediante la técnica de inmunohistoquímica (112).

b- Detección de ácidos nucleicos de VPH .

La detección del genoma de los VPH, o de los productos de su transcripción, puede realizarse de manera directa mediante métodos basados en hibridación (que incluyen *southern blot*, *northern blot*, *dot blot* e *Hybrid Capture*) y en secuenciación del ADN. Además también pueden utilizarse diferentes pruebas basadas en PCR (26)

Métodos basados en PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) permite amplificar de manera selectiva fragmentos del ADN viral, para dar lugar a un producto que, posteriormente, será analizado por diferentes procedimientos.

Existen diferentes métodos para la detección de genoma de VPH basados en PCR, cuyos datos de sensibilidad y especificidad son variables, según una serie de factores, sobre todo los *primers* utilizados, el tamaño del producto de amplificación obtenido y la ADN polimerasa utilizada. Los protocolos más ampliamente aceptados utilizan *primers* de consenso que se dirigen a una zona altamente conservada del gen L1, de manera que en teoría podrían detectar todos los tipos mucosos de VPH. No obstante, es importante señalar que algunos *primers* tienen una capacidad para detectar el ADN de determinados tipos de VPH mayor que otros, especialmente en el caso de muestras con varios tipos de VPH, de manera que no son todos equivalentes (26).

Existen diferentes kits comerciales, basados en PCR, para el diagnóstico molecular de la infección por VPH. También existen técnicas basadas en la PCR que permiten la cuantificación de la carga viral de VPH, como es el caso de la PCR en tiempo real (26).

Además de la determinación de ADN de VPH, que simplemente nos sirve para detectar la presencia del mismo, últimamente se da cada vez más importancia a la determinación de ARN, que, en caso de ser positiva, indica que se está produciendo una transcripción del genoma viral, de manera que puede servir para detectar las infecciones clínicamente relevantes. La principal limitación de la determinación de ARN es la dificultad para la conservación de las moléculas del mismo, que se degradan muy fácilmente (26).

Otra aplicación de la PCR es la detección de múltiples tipos virales en una muestra, que no es posible por otras técnicas rutinarias como Captura Híbrida 2 (*Hybrid Capture, HC2*) (26).

Métodos comerciales de hibridación de ácidos nucleicos (*Captura Híbrida, Hybrid Capture®*).

En la actualidad el único kit comercial que permite la detección de ADN de VPH por medio de hibridación es el *Hybrid Capture*. Se basa en la hibridación de sondas de ARN con secuencias complementarias de ADN de VPH en solución. Posteriormente, estos híbridos son capturados por anticuerpos específicos que están unidos a unos pocillos. Estos híbridos, ahora fijados a los pocillos por los anticuerpos, son detectados por una serie de reacciones que terminan dando lugar a una luminiscencia que puede cuantificarse, dando una medida semicuantitativa de la carga viral. Permite detectar ADN de 13 tipos de alto riesgo y 5 de bajo riesgo, aunque no discrimina qué tipos detecta en particular dentro de cada muestra. Actualmente está en desarrollo una nueva generación de este test, denominada *Hybrid Capture 3*, cuyo objetivo es mejorar la especificidad de la versión actual (26).

Southern y Northern blot.

Se trata de dos procedimientos de hibridación en fase sólida que permiten detectar la presencia de ADN (*southern blot*) o ARN (*northern blot*) con gran fiabilidad. Tienen como desventajas el hecho de requerir mucho tiempo y ser técnicamente complicados. Además se necesitan grandes cantidades de ácidos nucleicos altamente purificados, y bien conservados, con moléculas completas, por lo que no pueden aplicarse a cualquier muestra, en especial a tejidos fijados. Por todo ello, no son técnicas adecuadas para estudios a gran

escala.

A pesar de ello, el *southern blot* se considera el “*golden standard*” para la detección de ADN de VPH, gracias a la gran precisión y especificidad que obtiene. Además, permite diferenciar el ADN integrado en el genoma de la célula infectada del que está en forma de episoma, y da una medida semicuantitativa de la carga viral. No obstante, la sensibilidad del *southern blot* es menor que la que se obtiene mediante PCR o *Hybrid Capture* (26).

Hibridación in-situ.

Esta técnica permite la detección de secuencias específicas de nucleótidos en células o en secciones de tejido, conservando su morfología, de manera que localiza de manera precisa los genomas estudiados en la muestra. Puede aplicarse a tejidos fijados. Permite también conocer si el genoma viral está en episomas o integrado en el genoma, según cómo se distribuya la señal dentro del núcleo celular. Además, también se puede aplicar a la detección de ARN mensajero.

Como principal limitación de la técnica cabe citar su complejidad técnica, que impide que pueda aplicarse a estudios epidemiológicos a gran escala.

Comparando las diferentes técnicas para la detección de genoma de VPH, se puede observar una buena concordancia entre los resultados de *Hybrid Capture 2* y PCR. Además, dentro de la PCR, cuando se usan métodos estandarizados, la concordancia entre los resultados de distintos laboratorios es excelente (113).

c. Estudios serológicos.

Existen métodos para estudiar la respuesta humoral a diferentes antígenos del VPH, que se detallan a continuación.

La determinación de anticuerpos frente a la cápside del VPH permite conocer el estado de la inmunidad protectora frente a la infección por dicho virus. Asimismo, aporta información sobre exposición al virus, ya sea en la actualidad o en el pasado, que podría servir para predecir posibles lesiones malignas o premalignas asociadas al virus.

La presencia de anticuerpos frente a las proteínas E6 y E7 de los VPH tipos 16 y 18 es un

marcador indirecto de la presencia de lesiones malignas asociadas a esos VPH. Sin embargo, carece de utilidad como método de diagnóstico de estos tumores, ya que gran parte de los pacientes afectados por ellos no muestra estos anticuerpos (26).

4.17. Estado del arte.

Las infecciones de transmisión sexual (ITS), son aquellas enfermedades causadas por agentes infecciosos en los cuales la vía sexual tiene importancia epidemiológica. Las ITS constituyen un problema importante de salud pública debido a su elevada incidencia y prevalencia, a demas por la gravedad de secuelas que pueden ocasionar como infertilidad, cáncer anogenital, trastornos psicologicos y sexuales, a demas de las consecuencias económicas derivadas (114). Las infecciones causadas por el virus del Papiloma Humano son una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes en el mundo, se caracterizan en ciertos casos por presentar cuadros asintomáticas durante largos periodos de tiempo, lo cual depende de la naturaleza del virus presente en el tejido infectado y la fase de su ciclo replicativo en el interior de la celula hospedera (2)(115).

El virus del papiloma humano se caracteriza entre otras, por poseer un genoma pequeño representado en un cromosoma circular de ADN de doble cadena, cuyos genotipos mas frecuentemente identificados en lesiones benignas son: VPH 6 y VPH 11, asociados con el condiloma acuminado (verrugas venéreas); lesión que es considerada cada vez más frecuente como una enfermedad de transmisión sexual. Un fenómeno especialmente importante en estos trastornos, es su asociación con la displasia cervical, el carcinoma in situ; el carcinoma epidermoide cervical y el posible papel etiológico desempeñado por esta familia de virus en otras lesiones especialmente papilomas laríngeos, que están siendo comúnmente reportados cada vez con mayor incidencia, pudiendo ser adquiridos por via de transmisión sexual, trasmisión vertical en el momento del parto y en menor proporción por transmisión horizontal.(116). En la gran mayoría de lesiones precancerosas de alto grado y de carcinomas cervicales invasores se han identificado los genotipos virales de alto riesgo como: VPH 16, VPH 18 y VPH 31. El contacto genital es el principal factor de riesgo para la infección por Virus del Papiloma Humano, este riesgo aumenta

proporcionalmente con el número de parejas sexuales (117), el bajo nivel socioeconómico; un inicio temprano de la actividad sexual; la edad temprana del primer embarazo; multiparidad; uso de anticonceptivos hormonales, consumo de alcohol y de tabaco. (118).

La naturaleza infecciosa del VPH no se describió sino hasta 1894, aunque a principios del siglo XX hacia 1907 ya se había especulado el origen viral de las infecciones anogenitales, que se caracterizaban por la presencia de verrugas, sin embargo, no fue sino hasta 1949 que las partículas virales pudieron ser observadas por primera vez bajo un microscopio electrónico. Actualmente no existe ningún método para cultivar el VPH en tejidos (119).

Su transmisión no se consideró de carácter sexual hasta 1956, cuando se comprobó la aparición frecuente de verrugas genitales en los soldados de la guerra de Corea que habían tenido relaciones sexuales con mujeres afectadas por condilomas. En los años 60 hubo un gran incremento de las infecciones por VPH, situación que persiste en la actualidad.

En 1963, Crawford y cols. revelaron la estructura del genoma de los papiloma virus; aunque, debido a la falta de un procedimiento para cultivarlos y a la aparente benignidad de las verrugas en seres humanos, se retardaron los estudios para verificar su potencial oncogénico. (119).

En los años setenta, Zur Hausen sugirió al VPH como un candidato a la génesis de las neoplasias del sistema genital; en la misma época Meisel descubrió, una lesión condilomatosa de cérvix inducida por el VPH; resaltandolo intranuclearmente en las células coilocíticas asociadas con neoplasia intraepitelial cervical.

En el siguiente decenio se inicio el aislamiento de diferentes genotipos de papiloma virus en humanos; los primeros fueron los tipos 6 y 11 en las verrugas genitales y después los tipos 16 y 18 en biopsias de carcinoma de cuello uterino. A pesar de estos avances, tuvieron que pasar varios años para que se aceptara la causa-efecto entre el papiloma virus y el cáncer de cuello uterino (119). Las secuencias de ADN viral en las lesiones preneoplásicas, en los cánceres e incluso en metástasis de cánceres del epitelio estratificado plano sustentan con firmeza, la posibilidad de que el virus del papiloma humano desempeñe un papel etiológico en el desarrollo del cáncer cervical, de vagina y de vulva (120).

Dentro del amplio rango de manifestaciones clínicas asociadas a los genotipos virales 6 y 11 se puede destacar la papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), enfermedad caracterizada por la prpliferación de papilomas escamosos en el tracto aerodigestivo (121)(122)(35). La PRR es la neoplasia benigna mas común en niños y la segunda causa mas frecuente de disfonía crónica infantil (123). A pesar de que es una enfermedad beningna que normalmente involucra solamente la laringe, la PRR tiene un curso clínico impredecible, tiende a la recurrencia y a extenderse al resto del tracto aerodigestivo y llegando a sufrir transformación maligna en un 3% a 7% de los casos. (124)(125).

La PRR presenta una distribución bimodal con una forma infantil y otra adulta. La de aparición infantil ocurre en niños menores de 5 años, mientras que el segundo pico ocurre entre los 20 y 40 años de edad, posiblemente asociado a la activación del virus latente desde la niñez o exposición a en la vida adulta por contacto sexual. La manifestación clínica antes de los 3 años es un factor de riesgo para que el paciente presente enfermedad severa (34)(125-129).

En la actualidad son muchos los tipos de VPH que infectan el aparato genital, transmitiéndose sexualmente. El 1, 6, 10, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41 y 42 son los más frecuentemente implicados. El 6 y el 11 suelen estar relacionados con la aparición de lesiones condilomatosas en vagina, vulva y cérvix CIN (I-II-III) y de vulva VIN (I-II-III), además el 33 se asocia con carcinoma maligno de cérvix. El 2,6 y 11 se asocian papilomas laríngeos (que se transmiten de la madre al hijo en el momento del parto) (130).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos.

5.1.1. Objetivo General.

Determinar la Prevalencia de ADN del VPH en muestras de mucosa oral en un grupo de niños menores de 2 años y en muestras de mucosa oral de sus madres.

5.1.2. Objetivo Específico.

Identificar los genotipos de VPH de alto riesgo (AR), bajo riesgo (BR) y sus cofactores de riesgo en las muestras de mucosa positivas para el virus.

5.1.3 Objetivo Específico.

Evaluar la concordancia de la presencia del VPH en las muestras de mucosa oral de los niños y sus madres.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1.1. Descripción general del estudio

Esta investigación correspondió a un estudio piloto de tipo corte transversal donde se incluyeron 76 parejas participantes, de quienes se obtuvieron las muestras de mucosa oral tanto de mujeres como de sus hijos menores de dos años; obtenidas del banco de participantes del proyecto financiado por la Universidad del Valle titulado: “Efecto de la complementación con micronutrientes antioxidantes durante la gestación sobre la regulación epigenética de los genes relacionados con estrés oxidativo en el niño menor de dos años”, dicho banco estuvo constituido por 400 participantes, se realizó el calculo para el tamaño de muestra en el software Epi Info versión 7.1.5, con un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 10%, lo cual nos permitió establecer para la población establecida en el banco de participantes un total de 78 unidades muestrales que para nuestro estudio contituyeron 78 parejas conformadas por madre e hijo, de las cuales solo 76 parejas cumplieron los criterios de inclusión y exclusión para ser participantes de este proyecto.

Las muestras Fueron tomadas mediante raspado superficial con citocepillo estéril para la determinación de la presencia del DNA viral, por personal previamente entrenado y aplicando correctamente las medidas de bioseguridad. De cada paciente se consignaron datos de sexo, edad, nivel de escolaridad, características sociodemográficas y se establecieron los factores de riesgo de la infección mediante la aplicación de una encuesta basada en los estudios previos para determinar los factores de riesgo para la detección del ADN del VPH que permitió determinar sus estilos de vida, historia reproductiva y antecedentes de actividad sexual, a demás por cada menor de edad se consignó un consentimiento informado que fue debidamente comprendio y firmado por el representante legal del menor en presencia de dos testigos.

Los procedimientos que se realizan para cumplir con todos los objetivos específicos expuestos serán: toma de la muestra de mucosa oral; extracción del ADN; detección de la presencia del VPH; identificación de los genotipos virales presentes en cada muestra, de detectarse el genotipo VPH 16 se procederá a la medición de su carga viral; determinación

del estado físico del genoma del VPH 16; secuenciación del VPH para determinar genotipos del VPH y variantes moleculares del VPH 16.

Los procedimientos que se realizan para cumplir con todos los objetivos específicos expuestos serán: toma de la muestra de mucosa oral; extracción del ADN; detección de la presencia del VPH; identificación de los genotipos virales presentes en cada muestra, de detectarse el genotipo VPH 16 se procederá a la medición de su carga viral; determinación del estado físico del genoma del VPH 16; secuenciación del VPH para determinar genotipos del VPH y variantes moleculares del VPH 16.

6.1.2. Criterio de selección de la población.

6.1.2.1. Criterio de inclusión.

Para las madres:

- Ser mayor de edad (≥ 18 años de edad)
- Comprender y firmar el consentimiento informado
- Diligenciar la encuesta sobre datos sociodemográficos y de comportamiento sexual
- No haber consumido alimentos por lo menos dos horas antes de la toma de muestra.
-

Para los niños:

- Tener ≤ 2 años de edad
- Consentimiento informado comprendido y firmado por el representante legal.
- El representante legal previamente a la toma de muestra haya diligenciado la encuesta sobre datos sociodemográficos del menor de edad.
- No haber consumido alimentos por lo menos dos horas antes de la toma de muestra.

6.1.2.2. Criterio de exclusión.

Para las madres:

- Ser menor de edad (< 18 años de edad)
- No haber participado en el proyecto titulado “Efecto de la complementación con

micronutrientes antioxidantes durante la gestación sobre la regulación epigenética de los genes relacionados con estrés oxidativo en el niño menor de dos años”.

- Asistir a la cita de consulta sin el niño menor de dos años.

Para los niños:

- Asistir a la cita de consulta sin la madre.
- No haber participado en el proyecto titulado “Efecto de la complementación con micronutrientes antioxidantes durante la gestación sobre la regulación epigenética de los genes relacionados con estrés oxidativo en el niño menor de dos años”.
- No tener autorización del representante legal para participar en la investigación.

6.1.3. Procedimiento de captación de pacientes

Para captar los pacientes se diseñaron dos manuales de procedimientos disponibles en el Laboratorio de biología molecular del grupo de Nutrición, Bioquímica y Biología molecular de la Universidad del Valle.

Los participantes se captaron mediante un sorteo realizado al azar donde tuvieron la misma probabilidad de ser elegidos de entre la población participante del proyecto titulado: “Efecto de la complementación con micronutrientes antioxidantes durante la gestación sobre la regulación epigenética de los genes relacionados con estrés oxidativo en el niño menor de dos años”.

Una vez seleccionados los participantes se contactaron vía telefónica, se les presentó los objetivos del proyecto y se invitaron a participar de él, posteriormente se les comunicó la fecha, hora y lugar donde se realizaría la intervención con el fin de que las participantes y sus hijos cumplieran a la citación.

Luego de que los participantes llegaron a la cita de intervención se procedió a explicar nuevamente los objetivos del proyecto, y la metodología para la toma de la muestra, se les presentó el consentimiento informado y se les explicó cada punto del mismo, una vez comprendido las participantes accedieron a participar del estudio y con ellas también sus hijos.

Posterior a esto se les aplicó de manera individual y en presencia de un profesional de la salud, la encuesta que tuvo como objetivo recolectar información a cerca de datos socioemográficos de madres y de sus hijos y comportamiento sexual de las madres, finalizado este paso se procede a la toma de muestra de la mucosa oral en cada participante.

El objetivo de esta actividad fue promover la intervención de participantes adultos y menores de edad que serían la base de este estudio al permitir recolectar la muestra de mucosa oral y los datos sociodemográficos y de comportamiento sexual que fueron el punto de partida para el desarrollo de esta investigación . El lugar destinado para este fin fue: el edificio 100 de la facultad de salud de la Universidad del Valle Sede San Fernando, correspondiente a Nutrición, Desarrollo y Medicina Familiar. Se apoyó esta actividad con personal entrenado para la captación de la muestra, el diligenciamiento de la encuesta y del consentimiento informado y con recursos físicos.

6.1.4. Procedimiento para obtener consentimiento.

Se procedió a explicar a cada una de las participantes los objetivos del proyecto, y la metodología para la toma de la muestra, se les presentó el consentimiento informado y se les explico cada punto del mismo, una vez comprendido las participantes accedieron a participar del estudio y con ellas también sus hijos, eso se evidencia en la firma del consentimiento en presencia de dos testigos.

Personal entrenado en presencia del coordinador del trabajo de campo ejecutó los procedimientos para obtener el consentimiento.

6.1.5. Procedimiento de toma de muestras .

Posterior a la aplicación del consentimiento informado, se les aplico de manera individual y en presencia de un profesional de la salud, la encuesta que tuvo como objetivo recolectar información a cerca de datos socioemograficos de madres e hijos y comportamiento sexual de las madres, finalizado este paso se procede a la toma de muestra de la mucosa oral en cada participante.

La toma de muestra fue realizada por dos profesionales en bacteriología y laboratorio clínico egresados de la Universidad del Valle pertenecientes del Grupo de Investigación en Nutrición, Bioquímica y Biología molecular de la universidad en mención. Sin embargo la coordinación y la presencia física en el desarrollo de todas las fases del trabajo de campo estuvieron a cargo del estudiante de doctorado, el estudiante de maestría y el investigador principal de este trabajo de tesis.

Para una adecuada toma y manejo de muestras se diseñaron protocolos que se encuentran disponibles en los manuales de procedimientos del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Grupo de Investigación en Nutrición, Bioquímica y Biología molecular de la Universidad del Valle.

6.1.5.1. Protocolo para la toma de muestras.

El objetivo de la toma de muestra de mucosa oral es principalmente la colección de células del epitelio estratificado mucoso de la cavidad oral. Para ello se describirá a continuación el procedimiento completo que se llevó a cabo.

Como primera medida, fue necesario tener a la mano y disponibles los materiales que se utilizaron durante el procedimiento, para ello se requirieron citocepillos esteriles y la solución transportadora que para este caso será buffer fosfato salino (PBS 10%). Un vez listos los materiales y firmado el consentimiento ético por cada participante, se realizó la toma del raspado de mucosa oral con el hisopo estéril, mediante movimientos circulares por aproximadamente 20 veces, luego de terminar el procedimiento, el citocepillo fue introducido en un tubo eppendorf nuevo libre de ADN, RNA, DNAsas y RNAsas que contenía 500 uL de PBS al 10%, para su posterior transporte al lugar de procesamiento que fue el laboratorio del grupo de nutrición, bioquímica y biología molecular de la Universidad del Valle.

Este procedimiento se realizó tanto a la madre como al hijo teniendo en cuenta de aplicar todas las normas de bioseguridad establecidas en la normatividad del país y de la Universidad del Valle

6.1.6. Procedimientos.

Todos los procedimientos que se describen a continuación se realizaron para cumplir con todos los objetivos específicos.

6.1.6.1. Extracción del ADN.

El ADN de las muestras de mucosa oral, fueron extraídas con el Kit comercial: Puregene Bucal Cell Kit (400) de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se calculó las concentraciones y grado de pureza del ADN, absorción (260/280) entre 1.8 a 2.0, con el espectrofotómetro de última generación Nanodrop.

6.1.6.2. Detección del VPH.

La presencia de ADN del VPH se analizó en todas las extracciones de ADN obtenidas de las muestras de mucosa oral de la madre y su hijo por el método de amplificación molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un amplio espectro de cebadores MY09/MY11 y GP5+/GP6+ para VPH (130).

Para cada amplificación se utilizó un volumen de 25 µL de mezcla de reacción que consistió de 0.2 ng de dNTPs, 10 pmol de cada cebador, Buffer Taq 1x (100 mM tris-HCl (pH entre 8 y 9 a 25°C) y 15mM de MgCl. Se agregaron 5 µL del ADN de cada muestra y 1,5 unidades de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer), por mezcla de reacción. Para cada ensayo se empleó como control positivo de la amplificación una muestra de ADN extraída de células HELA. Como control negativo se realizó la amplificación con la mezcla de reacción en ausencia de ADN. La amplificación se efectuó en un equipo termociclador automático (MJ Research PTC-100®) empleando un programa que consistió de 40 ciclos con el siguiente esquema: 1 min a 94°C seg, 1 min a 45°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C para completar los fragmentos. El fragmento amplificado se visualizó mediante la separación por peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando para la tinción el reactivo no contaminante, ni perjudicial para la salud, EZ visión in gel solution 10,000X AMRESCO, la presencia de ADN del Virus del Papiloma Humano fue posible debido a la exposición a la luz ultravioleta del gel de agarosa teñido previamente.

6.1.7. Análisis estadístico.

Toda la información obtenida se registro en la base de datos diseñada para tal fin. El análisis de datos se realizó empleando el programa estadístico SPSS, edición 15.0 para Windows (“Statistical Package for the Social Sciencies”). Una vez recolectados la totalidad de los datos se aplicó un análisis estadístico, descriptivo de los resultados, se realizo un análisis de las distribuciones de frecuencia y de las medidas de tendencia central. (media, mediana, varianza) en el grupo de estudio, la asociación entre la presencia del VPH y las variables sociales y ginecobtetricas, fue determinada empleando el test de *ji*-cuadrado con un grado de significancia de 0.05 y un nivel de confiabilidad de 95%.

La presencia de DNA viral fue cruzada con cada una de las variables sociodemográficas. La posible asociación, fue determinada empleando el test de *ji*-cuadrado con un grado de significancia de 0.05 y un nivel de confiabilidad de 95%. Para determinar la significancia estadística ($p < 0,05$) se realizo un análisis univariado y bivariado. La variable dependiente será la presencia del Virus del Papiloma Humano por método de la PCR convencional.

6.1.8 Consideraciones éticas

El Comité Institucional de Revisión Ética Humana(CIREH), de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, regido por la resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, aprobó la realización de este proyecto, dejándolo establecido en el Acta de Aprobación N° 05-013 del primero (01) de Marzo del año 2013. (Anexo 2)

6.2. Resultados.

A continuación se indican los resultados del análisis frecuencial y porcentual de los datos que permitieron correlacionar los factores sociodemograficos asociados con la infección por el Virus del Papiloma Humano en cavidad oral.

6.2.1. Características sociodemográficas de la población de mujeres participante.

Se incluyeron 76 participantes mujeres con edades comprendidas entre 18 y 34 años de edad, 61.8% (n=47) pertenecía al estrato social 1, el 69.7% (n=53) vive en unión libre, el 2.6% (n=2) manifestó hábitos del cigarrillo, el 59.2% (n=45) no consume alcohol y el 86.8% (n=66) no consume sustancias psicoactivas. (Tablas 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas de madres participantes en esta investigación residentes en Cali-Colombia

Características	Mujeres	
	n (76)	%
Edad		
18-21	34	44.7
22-25	30	39.5
26-29	9	11.8
30-34	3	3.9
Estrato Social		
1	47	61.8
2	26	34.2
3	2	2.6
4	1	1.3
Estado civil		
Soltera	17	22.3
Unión libre	53	69.7
Casada	3	3.9
Separada	3	3.9
Hábito de Cigarrillo		
Nunca ha fumado	52	68.4
Exfumador	22	28.9
Fuma Actualmente	2	2.6
Ingesta de alcohol		
Si	28	36.8
No	45	59.2
Otros	1	1.3
No responde	2	2.6
Consumo de sustancias psicoactivas		
Si	10	13.2
No	66	86.8

6.2.2. Características ginecobstétricas de las mujeres participantes.

De las 76 mujeres encuestadas, 61.8% (n=47) tuvo su menarquia entre los 14 y 14 años de

edad, 51.3% (n=39) manifestaron que entre los 13 a 16 años de edad tuvieron la primera relación sexual, 82.9% (n=63) tuvieron un (1) embarazo, el 76.6% (n=59) presentaron parto vaginal, el 86.8% (n=66) no presentaron abortos, el 72.4% (n=54) son activas sexualmente en el momento de la encuesta, el 93.4% (n=71) no presentaron enfermedades de transmisión sexual y el 71.1% (n=54) no presentaron verrugas corporales. (Tabla 2).

Tabla 2. Características ginecobstétricas de madres participantes en esta investigación residentes en Cali-Colombia

Características	Mujeres	
	n (76)	%
Menarquia		
9-11	13	17.1
12-14	47	61.8
15-17	16	21
Edad de la primera relación sexual		
13-16	39	51.3
17-20	34	44.7
21-23	3	3.9
No. Embarazos		
1	63	82.9
2	11	14.5
3	2	2.6
Tipos de partos		
Vaginal	59	77.6
Cesárea	17	22.4
No. Abortos		
0	66	86.8
1	9	11.8
2	1	1.3
Actividad sexual		
Si	55	72.4
No	21	27.6
Enfermedad de transmisión sexual		
Si	2	2.6
No	71	93.4
No sabe/No responde	3	3.9
Presencia de Verrugas		
Si	21	27.6
No	54	71.1
No sabe	1	1.3

6.2.3. Características sociodemográficas de niños menores de 2 años participantes.

Se incluyeron 76 participantes niños menores de 2 años de edad de los cuales, el 50% (n=38) fue de sexo femenino, 77.6% (n=59) de la población nació por parto natural, el 23.7% (n=18) asistió a la guardería y en ninguno de los niños se manifestó la presencia de verrugas corporales. (Tabla3).

Tabla 3. Características sociodemográficas de niños menores de 2 años participantes en esta investigación residentes en Cali-Colombia

Características	Niños	
	n (76)	%
Sexo		
Femenino	38	50.0
Masculino	38	50.0
Tipo de parto		
Natural	59	77.6
Cesarea	17	22.4
Asistencia a guardería		
Si	18	23.7
No	58	76.3
Presencia de verrugas.		
Si	0	0.0
No	76	100.0

6.2.4. Identificación de la presencia del VPH en muestras de mucosa oral en niños menores de 2 años y en mucosa oral de sus madres

En las muestras de mucosa oral obtenidas a partir de mujeres, la presencia positiva del virus del VPH con respecto a las características socio demográficas, mostro los siguientes resultados: Se detectó presencia de ADN del VPH en 6.6% (n=5) de las mujeres participantes, 2.6% (n=2) de ellas se encontraba en el rango de edad de 18 a 21 años, 2.6% (n=2) entre los 26 y 29 años y 1.3% (n=1) entre 30- 34 años de edad, con una significancia estadística de $p= 0.040$; Todas las mujeres positivas para VPH en mucosa oral 6.6% (n=5) pertenecieron al estrato social 1 con un $p= 0.170$; 5.3% (n=4) manifestaron vivir en union libre y 1.3% (n=1) eran solteras al momento de la encuesta, no se obtuvieron diferencias significativas al compararlo con las demás características $p= 0.824$; 6.6% (n=5)

manifestaron nunca haber fumado con un $p=0.138$; 3.9% ($n=3$), manifestaron consumir licor, 1.3% ($n=1$) no manifestaron el consumo de licor y el 1.3% ($n=1$) no sabía o no respondió la pregunta no se obtuvieron diferencias significativas al compararlo con las demás características $p= 0.142$; Ninguna mujer positiva para el VPH en cavidad oral manifestó consumir sustancias psicoactivas. (Tabla 4).

Tabla 4. Características sociodemográficas y presencia de VPH en mucosa oral de madres participantes en esta investigación residentes en Cali-Colombia

Características	n(76)	VPH-(%)	VPH+(%)	P
Edad				
18-21	34	32 (42.1)	2 (2.6)	0.040
22-25	30	30 (39.5)	0	
26-29	9	7 (9.2)	2 (2.6)	
30-34	3	2 (2.6)	1 (1.3)	
Estrato Social				
1	47	42 (55.2)	5 (6.6)	0.170
2	26	26 (34.2)	0	
3	2	2 (2.6)	0	
4	1	1 (1.3)	0	
Estado civil				
Soltera	17	16 (21.1)	1 (1.3)	0.824
Unión libre	53	49 (64.5)	4 (5.3)	
Casada	3	3 (3.9)	0	
Separada	3	3 (3.9)	0	
Hábito de Cigarrillo				
Nunca ha fumado	52	47 (61.8)	5 (6.6)	0.138
Exfumador	22	22 (29)	0	
Fuma Actualmente	2	2 (2.6)	0	
Ingesta de alcohol				
Si	28	25 (32.9)	3 (3.9)	0.142
No	45	44 (57.9)	1 (1.3)	
Otros	1	1 (1.3)	0	
No responde	2	1 (1.3)	1 (1.3)	
Consumo de sustancias psicoactivas				
Si	10	10 (13.1)	0	0.226
No	66	61 (80.3)	5 (6.6)	

Al evaluar la presencia del virus de VPH con respecto a las características de ginecobstétricas de las madres participantes, se encontró que de las 76 mujeres participantes sólo 6.6% ($n=5$) fueron positivas para el VPH en la mucosa oral, 1.3% ($n=1$)

de las mujeres encuestadas positivas para el virus manifestó la menarquia a la edad de 9 a 11 años, mientras que 2,6% (n=2) manifestaron la menarquia de los 12 a 14 años de edad y de 15 a 17 años de edad ambos interválos con la misma frecuencia, no se obtuvieron diferencias significativas al asociar estas características con la presencia del VPH en mucosa oral manifestando un $p= 0.541$; 2,6% (n=2) de las mujeres participantes positivas para el virus manifestaron haber tenido el primer contacto sexual de 13-16 años de edad, 2,6% (n=2) de los 17 a los 20 años y 1,3% (n=1) de los 21 a los 23 años de edad, no se determine asociación estadística $p= 0.356$; 5,3% (n=4) de las mujeres con un solo embarazo y 1,3% (n=1) con dos embarazos, fueron positivas para el virus con $p= 0.827$; según el tipo de parto, se evidenció que 3,9% (n=3) de las mujeres participantes positivas para el virus dio a luz a sus hijos por cesaréa mientras que el 2,6% (n=2) dio a luz por parto vaginal con un $p= 0.059$; el 5,3 % (n=4) de las mujeres participantes positivas para el virus manifestaron que nunca se sometieron a un aborto mientras que el 1,3% (n=1) manifestó practicarse un aborto, no se evidencia una asociación estadística $p= 0.811$; Todas las mujeres participantes positivas para el virus, 5,6% (n=5) indicaron ser sexualmente activas al momento de la encuesta, evidenciándose una significancia estadística de $p= 0.067$, igualmente, el 6,6% (n=5) de las mujeres participantes que resultaron positivas para el virus, nunca presentaron ninguna enfermedad de transmisión sexual, $p= 0.931$; 2,6% (n=2) confirmaron la presencia de verrugas en cualquier localización corporal mientras que 3,9% (n=3) no lo manifestaron no se evidenció asociación estadística entre estas variables $p=0.781$. (Tabla 5).

Tabla 5. Características ginecobstétricas y presencia de VPH en mucosa oral de madres participantes en esta investigación residentes en Cali-Colombia

Característica	n(76)	VPH-(%)	VPH+(%)	P
Menarquia				
9-11	13	12 (15.8)	1 (1.3)	0.541
12-14	47	45 (59.2)	2 (2.6)	
15-17	16	14 (18.4)	2 (2.6)	
Edad de la primera relación sexual				
13-16	39	37 (48.7)	2 (2.6)	0.356
17-20	34	32 (42.1)	2 (2.6)	
21-23	3	2 (2.6)	1 (1.3)	
No. Embarazos				
1	63	59 (77.6)	4 (5.3)	0.827
2	11	10 (13.2)	1 (1.3)	
3	2	2 (2.6)	0	
Tipos de partos				
Vaginal	59	57 (75)	2 (2.6)	0.059
Cesárea	17	14 (18.4)	3 (3.9)	
No. Abortos				
0	66	62 (81.6)	4 (5.3)	0.811
1	9	8 (10.5)	1 (1.3)	
2	1	1 (1.3)	0	
Actividad sexual				
Si	55	50 (65.8)	5 (6.6)	0.067
No	21	21 (27.6)	0	
Enfermedad de transmisión sexual				
Si	2	2 (2.6)	0	0.931
No	71	66 (86.8)	5 (6.6)	
No sabe/ No responde	3	3 (3.9)	0	
Presencia de Verrugas				
Si	21	19 (25)	2 (2.6)	0.781
No	54	51 (67.1)	3 (3.9)	
No sabe	1	1(1.3)	0	

Finalmente, con respecto a las características sociodemográficas de la población infantil participante y la presencia del VPH en mucosa oral se pudo evidenciar que el único niño positivo para el VPH fue de sexo femenino 1,3% (n=1), $p=0.237$; nació por parto natural 1,3% (n=1), $p=0.475$; asistía a la guardería 1,3% (n=1), $p=0.232$; y no manifestó verrugas en ninguna localización corporal. (Tabla 6).

Tabla 6. Características sociodemográficas y presencia de VPH en mucosa oral de niños menores de 2 años participantes en esta investigación residentes en Cali-Colombia

Características	n(76)	VPH-(%)	VPH+(%)	P
Sexo				
Femenino	38	37(48.7)	1(1.3)	0.237
Masculino	38	38(50.0)	0(0)	
Tipo de parto				
Natural	59	58(76.3)	1(1.3)	0.475
Cesaria	17	17(22.4)	0(0)	
Asistencia a la guardería				
Si	18	17(22.4)	1(1.3)	0.232
No	58	58(76.3)	0(0)	
Presencia de verrugas				
Si	0	0(0)	0(0)	
No	76	75(98.7)	1(1.3)	

6.2.4. Presencia del Virus del Papiloma Humano en cavidad oral de niños menores de dos años y las madres participantes

De las 76 madres encuestadas, solo el 6,6% (n=5) fueron positivas para el virus encontrándose los siguientes genotipos virales en la cavidad oral: dos (2) madres con VPH 11; dos (2) madres con VPH 43 y una madre (1) con VPH 72, mientras que de los 76 participantes menores de dos años sólo al 1,3% (n=1) se le detectó la presencia del VPH 6 en la cavidad oral. (Figura 1) (Tabla 7).

Figura 1. Presencia del Virus del Papiloma Humano en cavidad oral de niños menores de dos años y las madres participantes .

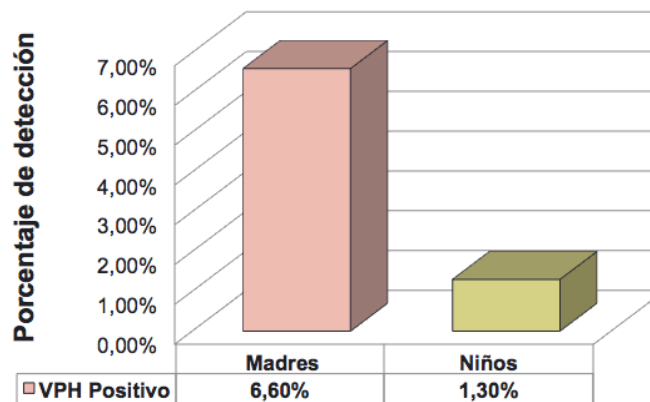


Tabla 7. Presencia del Virus del Papiloma Humano en cavidad oral de niños menores de dos años y las madres participantes	
Características	Frecuencia (n)
Genotipos detectados en mucosa oral de madres	
VPH 11	2
VPH 43	2
VPH 72	1
Genotipos detectados en mucosa oral de niños	
VPH 6	1

En este trabajo no se logró determinar asociación entre la presencia del VPH en cavidad oral de las madres con respecto a los hijos ya que los resultados no fueron pareados entre sí; los hijos de las cinco (5) madres a las cuales se les detectó VPH en cavidad oral fueron negativos para el virus en esta localización corporal, al igual que para el único participante positivo para el VPH en cavidad oral, provino de una madre negativa para el virus al momento del estudio.

7. DISCUSION.

En este estudio se evaluó la presencia del ADN del VPH en células de mucosa oral de un grupo de niños menores de dos años y sus respectivas madres, asociándolo con las características sociodemográficas de niños y con las características ginecobstétricas de las madres participantes, las cuales estuvieron ubicadas en un rango de edad entre 18 y 34 años, manifestaron ser sexualmente activas al momento de la encuesta, con características heterogéneas respecto a su estado civil, de ellas 64.5% (n=49) vivían en unión libre y manifestando diferentes patrones de comportamiento.

En este trabajo no se logró determinar asociación entre la presencia del VPH en cavidad oral de las madres con respecto a la presencia de VPH en cavidad oral de los hijos ya que los resultados no fueron pareados, pudiendo estar relacionado con el pequeño tamaño de muestra utilizada en este estudio piloto y discordando de estudios como el realizado en Finlandia por Rintala y col en el 2005 los cuales reportaron una asociación entre la presencia del VPH y los genotipos virales detectados tanto en cavidad oral de las madres como de sus hijos quienes no superaban los dos años de edad, en este estudio se obtuvieron muestras de 76 familias conformadas por madre, padre e hijo en una cohorte de dos años (23).

Los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos con respecto a la asociación entre los factores de riesgo tales como: el estrato social, estado civil, hábito del cigarrillo, ingesta de alcohol, consumo de sustancias psicoactivas, sexo, asistencia a la guardería, presencia de verrugas, características ginecobstétricas y la detección del ADN del VPH en cavidad oral, de acuerdo a los estudios previos, reportados desde 1989 hasta el 2011 (132-134).

En este trabajo no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el consumo de alcohol y la presencia de VPH, aunque el 3.9% (n=3) de las participantes, fueron positivas para el VPH y manifestaron consumir licor al momento del estudio, reportándose estudios epidemiológicos previos que relacionan la infección por VPH en las vías digestivas superiores con el consumo de alcohol (134), el 1.3% (n=1) de las participantes encuestadas que fueron positivas para el VPH en cavidad oral manifestaron no consumir

alcohol y el 6.6% (n=5) manifestaron no tener hábitos de consumo de tabaco, se ha establecido al consumo de tabaco (135,138) y alcohol (136-137) como factores de riesgo para la infección de las vías digestivas superiores sin embargo una pequeña proporción del 15-20% de los casos se desarrollan en individuos que manifiestan no tener relación alguna con dichos factores de riesgo (134-138).

Respecto a las características ginecobstétricas tales como: la menarquia, edad de la primera relación sexual, número de embarazos, tipos de partos, número de abortos, actividad sexual, enfermedad de transmisión sexual y presencia de verrugas, la significancia estadística fue mayor a $p=0.05$; todas las participantes que fueron positivas para el virus 6,6% (n=5) manifestaron ser sexualmente activas al momento de la encuesta, el 1,3% (n=1) manifestaron su menarquia entre los 9 y 11 años de edad, el 2,6% (n=2) tuvieron su primera relación sexual entre los 13 y 16 años de edad, 5,3% (n=4) solo presentaron un único parto y ningún aborto; todas las características mencionadas anteriormente se han reportado como factores de riesgo para el desarrollo no solo de cáncer cervical sino también para la infección por VPH en las vías aerodigestivas superiores, en estudios realizados en mujeres que no han iniciado su actividad sexual demuestran la presencia del VPH, a demás de corroborar el mecanismo de transmisión sexual, se plantean otros mecanismos de transmisión para este virus y su dependencia de las hormonas glucocorticoides liberadas en el embarazo. (139). Por otro lado en el embarazo el sistema inmunológico se suprime aumentando el riesgo del desarrollo de infecciones (140)

Al igual que en otras investigaciones, en este estudio piloto se encontró que la presencia del VPH es mayor en participantes pertenecientes a condiciones socio económicas media-baja, en quienes coinciden además otros factores de riesgo como el estado civil y el consumo de sustancias psicoactivas que fueron evaluados en esta población, todas las participantes que fueron positivas para el VPH en mucosa oral 6,6% (n=5) pertenecieron al estrato socioeconómico 1, 5,3% (n=4) manifestaron tener una relación de unión libre con su pareja y ninguna de las participantes positivas manifestaron el consumo de sustancias psicoactivas; aunque para este estudio, tampoco se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes positivos con VPH y los dichos factores de riesgo, se plantea la necesidad de realizar otros estudios en donde se evalúen grupos

poblacionales mayores con características y factores de riesgo variados que permitan plantear una asociación más amplia con respecto a las características evaluadas tal como se reportan en estudios realizados por Cason J y col y Martinelli M y col en 1995 y 2012 respectivamente (141) (142).

En las muestras de mucosa oral de los participantes menores de dos años, la presencia del VPH en dicha localidad, no evidenció diferencias estadísticas significativas con respecto a las características evaluadas para este grupo de estudio, el único participante positivo 1,3% (n=1), fue de sexo femenino, nació de un parto vaginal, asistía a la guardería y no presentó verrugas en ningún área de su cuerpo; se han reportado en numerosos estudios que la infección puede adquirirse en diferentes etapas de la vida, demostrándose la presencia del VPH en población infantil, adolescentes y adulta, también se ha detectado el ADN del VPH en el líquido amniótico, las membranas fetales, la sangre del cordón umbilical y la placenta, lo que indica que los recién nacidos pueden estar expuestos a infección cervical por VPH proveniente de la madre intrauterinamente y/o en el momento del parto (21) (143). Los modos de transmisión viral en los niños son controvertidos, siendo el método más evidente el contacto directo y la transmisión prenatal o en el parto, aunque no está claro con qué frecuencia progresan las lesiones clínicas, ya sea genitales, de laringe o bucales (22). En otras investigaciones reportaron la transmisión vertical del VPH de la madre al niño, detectando ADN del VPH en los recién nacidos con madres VPH positivas, una transmisión de la infección que pudo ser durante el embarazo o el parto (144). En 1993 en un estudio analizaron las células epiteliales del cuello uterino de madres infectadas con el VPH después de seis semanas del parto y las células epiteliales de la mucosa bucal de sus bebés. La detección del VPH se realizó mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y en los resultados once madres tenían VPH genital y ocho hijos de estas madres tuvieron un idéntico genotipo de VPH en las muestras de la mucosa bucal. Concluyeron que se puede transmitir el VPH del cuello uterino de la madre a la mucosa bucal del niño y que esta transmisión puede ser en el parto o durante el periodo prenatal (145).

En este estudio piloto, los genotipos encontrados en la cavidad oral de las madres positivas

fueron: VPH11, VPH43 y VPH72, mientras que en el participante menor de dos años solo se detectó el VPH6, cada tipo de VPH encontrado en este estudio, se encuentra asociado con el desarrollo de lesiones específicas que se localizan en regiones anatómicas definidas del epitelio escamoso cutáneo y mucoso. De las patologías producidas por estos tipos de VPH, las manifestaciones bucales son el tipo de lesión epitelial más frecuente y puede presentarse a cualquier edad, el tamaño no supera el centímetro de diámetro y afecta con mayor frecuencia a mucosa labial, lengua, encía, úvula y paladar blando (146).

8. CONCLUSIONES.

Con respecto a los resultados hallados en este estudio piloto y respecto a los objetivos planteados se concluye lo siguiente:

- El 6.6% (n=5) de las mujeres participantes en esta investigación fueron positivas ante el hallazgo del VPH en mucosa oral, mientras que el 1,3% (n=1) de los niños menores de dos años participantes en este estudio fueron positivos para el VPH en cavidad oral.
- Los genotipos identificados en la mucosa oral de las madres e hijos fueron de bajo riesgo y reportados como causantes de infecciones y patologías en la cavidad oral y las vías aerodigestivas superiores; los genotipos identificados en la mucosa oral de las madres fueron: VPH11, VPH43 y VPH 73; y el genotipo identificado en la cavidad oral del niño menor de dos años participante en este estudio fue: VPH6.
- En este trabajo no se logró determinar asociación entre la presencia del VPH en cavidad oral de las madres con respecto a los hijos ya que los resultados no fueron pareados entre sí; los hijos de las cinco (5) madres a las cuales se les detectó VPH en cavidad oral fueron negativos para el virus en esta localización corporal, al igual que para el único participante positivo para el VPH en cavidad oral, provino de una madre negativa para el virus al momento del estudio.

9. RECOMENDACIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos, nos permitimos considerar la realización de futuras investigaciones ~~con un mayor número de muestra~~ que permita en primera instancia evaluar estadísticamente a toda la población de Cali, a demás con ello poder establecer la posible asociación ente las características de riesgo evaluadas y la presencia del VPH en la mucosa oral de los participantes, que puedan mostrar resultados con un grado de significancia estadística mayor y con ellos proponer la realización de campañas de divulgación masiva sobre los factores epidemiológicos asociados al desarrollo de la infección por el virus del papiloma humano en cavidad oral y otras vías aerodigestivas superiores con el fin de implementar a futuro acciones de promoción y prevención de las enfermedades asociadas al Virus del Papiloma Humano en cavidad oral.

10. REFERENCIAS.

1. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003; 348(6):518-27.
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999; 189(1):12-9.
3. Steben M, Duarte-Franco E, Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*, 2007; 107 (2 Suppl 1): S2-S5.
4. Ferlay J, Bray F, Pisan P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidente, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No5, version 2.0. Lyon: IARCPress; 2004.
5. Yang BH, Bray Fi, Parkin DM, Sellors JW, Zhang ZF. Cervical cancer as a priority for prevention in different World regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer*, 2004; 109:418-24.
6. Safaeian M, Porras C, Schiffman M, Rodriguez AC, Wacholder S, Gonzalez P, et al. Epidemiological study of anti-HPV16/18 seropositivity and subsequent risk of HPV16 and -18 infections. *J Natl Cancer Inst*, 3-11-2010; 102(21):1653-1662.
7. Bosch FX, Rohan T, Schneider A. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 International Papillomavirus Conference. *J Clin Pathol*, 2001; 54:163-75.
8. Ho GY, Studentsov Y, Hall CB. Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus like particles. *J Infect Dis*, 2002; 186:737-42.

9. De Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a metaanalysis. *Lancet Infect Dis*, 2007; 7 (7):453-459.

10. Marais DJ, Constant D, Allan B, Carrara H, Hoffman M, Shapiro S, et al. Cervical human papillomavirus (HPV) infection and HPV type 16 antibodies in South African women. *J Clin Microbiol*, 2008; 46(2):732-739.

11. Munoz N, Mendez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*, 15-12-2004; 190(12):2077-2087.

12. Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*, 29-7-2002; 87(3):324-333.

13. Syrjanen K, Kulmala SM, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, et al. Epidemiological, clinical and viral determinants of the increased prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in elderly women. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2008; 29(2):114-122.

14. Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 20-6-2004; 324(1):17-27.

15. Zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin.Cancer Biol*, 1999; 9(6):405-411.

16. Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Anwar M, Bukhari MH, Carrascal E, et al. Human papillomavirus in upper digestive tract tumors from three countries. *World J Gastroenterol*, 28-12-2011; 17(48):5295-304.

17. Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Torres M, Carrascal E, Corvalan A, et al. Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in Colombia and Chile. *World J Gastroenterol*, 14-10-2006; 12(38):6188-92.

18. Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Shuyama K, Akiba S, Herrera-Goepfert R, et al. Human papillomavirus in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncol Rep*, 2006; 15(4):883-8.
19. Castillo A. HPV infection and carcinogenesis in the upper aero-digestive tract. *Colombia Medica*, 2011; v.42 (fasc.2): 233-242.
20. Avillon N, Vervaet H, Derniaux E, Terrosi P, Graesslin O, Quereux C. How did I contract human Papillomavirus (HPV)?. *Gynecol Obstet Fertil*, 2010; 38(3):199-204.
21. Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS*, 2010; 118(6-7):494-509.
22. Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, Gonce A, Ros R, Pérez JM, et al. Virus del Papiloma Humano (VPH) en mujeres embarazadas y la transmisión de madre a hijo del genotipo del VPH genital: un estudio prospectivo en España. *BMC Infect Dis*, 2009; 9:74.
23. Rintala M, Grénman S, Puranen M, Isolauri E, Ekblad U. Riesgo de transmisión de virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo entre los padres y los bebés: un estudio prospectivo de VPH en las familias en Finlandia. *J Clin Microbiol*, 2005; 43:1376-1381.
24. World Health Organization. Human papillomavirus infection and cervicouterine cancer. [Internet]. 2015; disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/.
25. World Health Organization. Sexually transmitted disease. Three hundred and thirty three million new curable cases in 1995. Ginebra, 1995.
26. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 90. Human Papillomaviruses. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2007.

27. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vacarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, 2005; 366(9490): 991-8.

28. Cortés J, Martínón-Torres, Ramón y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M et al. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol* 2010;53(Suppl1):1-19.

29. Bar-Am A, Gamzu R, Levin I, Fainaru O, Niv J, Almog B. Follow-up by combined cytology and human papillomavirus testing for patients post-cone biopsy: results of a long-term follow-up. *Ginecol Oncol*, 2003; 91:149-53.

30. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAM 2008. *Int J Cancer*, 2010; 127:2893-917.

31. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. VII*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1997.

32. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*, 20-9-1995; 87(18):1365-1371.

33. Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *Journal of Adolescent Health*, 2005; 37:S3-S9.

34. Wiatrak BJ, wiatrak DW, Broker TR, Lewis L. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope*, 2004; 114(Suppl 104):1-23.

35. Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H. Clinical course of recurrent respiratory papillomatosis in Danish children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004; 130: 711-6.

36. Patel N, Rowe M, Tunkel D. Treatment of recurrent respiratory papillomatosis in children with the microdebrider. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2003; 112:7-10.
37. Luciano-Muscio R, Oviedo JM. Virus del papiloma humano y cáncer bucal. *Act Odontol Ven*, 2013; 51.
38. Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999; 111:581-7.
39. Jimenez C, Perez C, Estudio Clinico retrospectivo de papiloma de la mucosa bucal en una población venezolana. *Acta Odontol. Venez.* 2002; 40(1):11.)(Chang F, Role of Papillomaviruses. *J. clin Pathol* 1990; 43:269-76.
40. Zur, Hausen H. Papillomaviruses and Cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:342-50.
41. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 1985; Vols 7-13, 314 (6006): 111-4.
42. McGinley K, Hey W, Sussman D, Brown G. Human papillomavirus testing in men. *J Am Osteopath Assoc*, 2011; 111:S26-8.
43. Perrone M, Premoli G, Papiloma virus Humanos. Asociacion con ciertas lesiones de la cavidad bucal. *Acta Odontol Venez.* 1992;30: 59-62.
44. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papilomavirus DNA. *Virol J* 2009; 6: 83.
45. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zurHausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80:560-563.
46. Medeiros LR, Ethur AB, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review.

Cad Saude Publica, 2005; 21:1006-1015.

47. Gutman LT, Herman-Giddens ME, Phelps WC. Transmission of human genital papillomavirus disease: comparison of data from adults and children. *Pediatrics*, 1993; 91:31-38.
48. Cason J, Rice P, Best JM. Transmission of cervical cancer-associated human papilloma viruses from mother to child. *Inter virology*, 1998; 41:213-218.
49. Syrjänen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000; 11:259-274.
50. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*, 2007; 297:813-819.
51. Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H, Grant LA, Shah KV. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol*, 2003; 101:645-652.
52. Smith EM, Johnson SR, Cripe T, Perlman S, McGuinness G, Jiang D, et al. Perinatal transmission and maternal risks of human papillomavirus infection. *Cancer Detect Prev*, 1995; 19:196-205.
53. Kaye JN, Cason J, Pakarian FB, Jewers RJ, Kell B, Bible J, et al. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol*, 1994; 44:415-421.
54. Watts DH, Koutsky LA, Holmes KK, Goldman D, Kuypers J, Kiviat NB, et al. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*, 1998; 178:365-373.
55. Puranen MH, Yliskoski MH, Saarikoski SV, Syrjanen KJ, Syrjanen SM. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *Am J Obstet Gynecol*, 1997; 176:1039-1045.
56. Durzyńska J, Pacholska-Bogalska J, Kaczmarek M, Hanć T, Durda M, Skrzypczak

M, et al. HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr*, 2011; 170(6):757-61.

57. Koskimaa HM, Waterboer T, Pawlita M, Grénman S, Syrjänen K, Syrjänen S. Human Papillomavirus Genotypes Present in the Oral Mucosa of Newborns and their Concordance with Maternal Cervical Human Papillomavirus Genotypes. *J Pediatr*, 2012; 160(5):837-43.
58. Rintala MA, Grénman SE, Puranen MH, Isolauri E, Ekblad U, Kero PO, et al. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol*, 2005; 43(1):376-81.
59. Rintala MA, Grénman SE, Järvenkylä ME, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. *Clin Infect Dis*, 2005; 41(12):1728-33.
60. Smith EM, Parker MA, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2010; 2010:326-369.
61. Ricardo JH, Rebolledo-Cobosb M, Fortich-Mesac N. Papiloma bucal en pacientes pediátricos: potencial trasmisión materna. *Rev Clin Med Fam*, 2012; 5(1):46-50.
62. Cason J. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. *J Clin Virol*, 32S: S52–S58.
63. Porterfield SP. Vertical Transmission of Human Papillomavirus From Mother to Fetus: Literature Review. *J Nur Pract*, 2011; 7(8):665-670.
64. LaCour DE. Human Papillomavirus in Infants: Transmission, Prevalence, and Persistence. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2012; 24:66-70.
65. Kojima A, Maeda H, Kurahashi N, Sakagami G, Kubo K, Yoshimoto H. Human papillomaviruses in the normal oral cavity of children in Japan. *Oral Oncol*, 2003; 39:821–828.

66. Summersgill K, Smith EM, Levy TB, Allen JM, Haugen TH. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Pathol*, 2001; 91:62-9

67. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis*, 2005; 191(5):731-8.

68. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in Human Papillomavirus carcinogenesis. *Virus Res*, 2002; 89(2):191-199.

69. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O Reilly S. Condon use and the risk of genital HPV infection in young women. *J Med*, 2006; 354:2645-54.

70. Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *J Med*, 2002; 346: 1105-1112

71. Puig-Tintoré LM, Alba A, Bosch FX, Castellsagué X, Coll C, Cortés X, et al. La infección por papilomavirus. Documento de consenso de la SEGO, SEC y AEPCC. Documentos de Consenso SEGO 2002. Madrid. Meditex-Sanex, 2003; 41-104.

72. Lazcano E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*, 2001; 91:412-20

73. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J. The natural history of The human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*, 1998; 132:277-84

74. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol*, 2000; 151:1158-71

75. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 2006; 24 (supl 1):S1-15

76. Olalla MA, Moyano M, Jurado I, Olalla MªM, Rodríguez-Pastor JL. Prevalencia de VPH en mujeres con citologías y colposcopias normales, en la unidad del T.G.I. de Málaga. Mallorca: Poster N°19. IX Congreso AEEM, Oct. 2008.
77. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. [Internet]. 2010: Disponible en: www.who.int/hpvcenter, WHO/ICOInformationCenteronHPVandCervicalCancer.
78. Castellsagué X. Epidemiología e historia natural del VPH y enfermedad asociada. Prevención del cáncer cervical: vacunación y colposcopi. 2011, 35.
79. Schiffman M, Castle P. Human Papillomavirus. Epidemiology and Public Health. Arch Pathol Lab Med, 2003; 127:930-4.
80. Sonnex C, Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. J Clin Pathol, 1998; 51:643-8.
81. Goodman A. Role of routine Human Papillomavirus subtyping in cervical screening. Curr Op Obst Gyn, 2000; 12:11-4
82. Sanclemente G. lo que los clínicos deben saber acerca de las vacunas contra el virus de papiloma humano. Gac Med Mex, 2003; 139:173-83.
83. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human Papillomavirus and oral cáncer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. JNCI. 2003; 95:1772- 83
84. Murger K, Howley PM. Human Papillomavirus immortalization and transformations. Virus Res, 2002; 89:213-26
85. Stoler MH. Human Papillomavirus biology and cervical neoplasia. Arch Pathol Lab Med, 2003; 127:935-9.
86. Kaufman RH, Adam E, Vonka V. Human Papillomavirus infection and cervical carcinoma. Clin Obstet Gynecol, 2000; 43:363- 80.

87. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci, 2006; 110:525-41
88. Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, Kamps MA, Herrington CS, Morrison LE, et al. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. J Pathol, 2006; 210:412-9
89. Gallegos-Hernandez JM, Paredes-Hernandez E, Flores-Diaz R, Minauro-Muños G, Apresa-Garcia T, Hernandez-Hernandez DM. Human Papillomavirus (HPV) associated with head and neck cancer. Cir Ciruj, 2007; 75:147-51
90. Premoli G, Gonzales A, Villareal J, Percoco T, Pietrocinio P, Aguilera L. Virus del papiloma humano; vision actual en biomedicina. Rev Asoc Den Mex, 2005; 62(6): 213- 24
91. El-Mofty SK, Lu Dw. Prevalence of human Papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. Am J Surg Pathol, 2003; 27:1463-70
92. Abramson AL, Nouri M, Mullouly V, Fisch G, Steinberg BR. Latent human Papillomavirus infection is comparable in the larynx and trachea. J Med Virol, 2004; 72:473-7
93. Klussman JP, Dinh S, Guntinas-Lichius O, Wittekindt C, Weissenborn S, Wieland U. et al. HPV associated tonsillar cancer. An update HNO, 2004; 52:208-18
94. Aguayo F, Meneses M, Corvalan A, Muños ML, Koriama CH, Eizuru Y, et al. Identificación de virus papiloma humano 16 (VPH -16), en carcinoma queratinizante de pulmón. Rev Chil Enferm Respir, 2002; 18:83-9
95. Bosch FX, Muños M. The viral etiology of cervical cancer. Virus Res, 2002; 89: 183-90

96. Flores Y, Bishai D, Lazcano E, Shah K, Lorincsz A, Hernandez M, et al. Improving cervical cancer screening in Mexico: Results from the Morelos HPV study. *Salud Publica Mex*, 2003; 45:S388-98
97. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, et al. Baseline cytology, Human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10 year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95:46-52
98. Premoli G, Ramirez JL. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. *J Oral Pathol Med*, 2001; 30:355-61
99. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence For an association of human papillomavirus and breast carcinomas: *Breast Cancer Res Treat*, 2004; 84:131-7
100. Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, et al. Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat*, 1996; 39:197-202
101. De Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X, et al. No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 2008; 109:55-8
102. Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, et al. Human Papillomavirus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 1998; 18:4765-8
103. Rodríguez Pichardo A. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en ETS. [Internet]. 2004 [9 de julio de 2015]; Disponible en: www.ederma.org/descargas/PROTOCOLOETS.pdf.
104. Bouza E, Hellín T, Rodríguez Pichardo A, Ribera E. Protocolos clínicos SEIMC. VIII. Enfermedades de transmisión sexual. [Internet]. 2009 [Fecha de acceso: 9 de julio de 2015]; Disponible en: www.seimc.org/documentos/protocolos/clinicos/proto8.htm.

105. Bleeker MC, Hogewoning CJ, Voorhorst FJ, Van den Brule AJ, Berkhof J, Hesselink AT, et al. HPV-associated flat penile lesions in men of a non STD hospital population: less frequent and smaller in size than in male sexual partners of women with CIN. *Int J Cancer*, 2005; 113:36-41
106. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010; Vol. 59.
107. Beutner KR, Reitano MV, Richwald GA, Wiley DJ. External genital warts: report of the American Medical Association Consensus Conference. AMA Expert Panel on External Genital Warts. *Clin Infect Dis*, 1998; 27:796-806
108. Giménez F, Costa e Silva I, Daumas A, Araújo J, Medeiros S, Ferreira L. The value of high resolution anoscopy in the diagnosis of anal cancer precursor lesions in HIV positive patients. *Arq Gastroenterol*, 2011; 48:136-45
109. Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, Bastert G. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytol*, 2003; 47:124-8
110. Fiedler M, Muller-Holzner E, Viertler HP, Widschwendter A, Laich A, Pfister G, et al. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb levels in cervical biopsies. *FASEB J*, 2004; 18:1120-2
111. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res*, 1994; 54:6078-82
112. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves inter observer agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 2002; 26:1389-99
113. Jacobs MV, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Johansson B, et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol*, 1999; 52:498-503
114. Vives SA, Sarquella GJ. Infecciones de transmisión sexual. *Medicine*, 2010; 10(61):

115. Cutts F, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. Bull World Health Organ, 2007; 85:719-726
116. Cason J, Kaye JN, Best JM. Non-sexual acquisition of humangenital papillomavirus. Papillomavirus Rep, 1995; 6:1-7
117. Wen LM, Estcourt CS, Simpson JM, Mindel A. Risk factors for the acquisition of genital warts: are condoms protective? Sex Transm infect, 1999; 75(5):312-316.
118. Tirado-Gómez L, Mohar-Betancourt A, López-Cervantes M, García-Carrancá A, Franco-Marina F, Borges G. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. Salud Publica Mex, 2005; 47:342-350
119. Consuegra MC, Molina CD, Egea BE. El virus del papiloma Humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. Uninorte, 19-12-2004.
120. Rubin E. Farber J, Patología Fundamentos, México, Editorial Panamericana, 1992.
121. Bennett RS, Powell KR. Human papillomaviruses: associations between laryngeal papillomas and genital warts. Pediat Infect Dis J, 1987; 6:229-32.
122. Mounts P, Shah KV, Kashima H. Viral etiology of juvenile and adult onset squamous papilloma of the larynx. Proc Natl Acad Sci USA, 1982; 79:5425-9.
123. Morgan AH, Zitch RP. Recurrent respiratory papillomatosis in children: a retrospective study of management and complications. Ear Nose Throat J, 1986; 65: 19-28
124. Hobbs CG, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2004; 12:88-92

125. Leung R, Hawkes M, Campisi P. Severity of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis is not associated with socioeconomic status in a setting of universal healthcare. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2007; 71:965-72.
126. Armstrong LR, Derkay CS, Reeves WC. Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1999; 125:743-8
127. Wiatrak BJ. Overview of recurrent respiratory papillomatosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003; 11:433-41.
128. Derkay CS, Darrow D. Recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2006; 115:1-11.
129. Shykhon M, Kuo M, Pearman K. Recurrent respiratory papillomatosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2002; 27:237-43.
130. Palacios S. *Salud y medicina de la mujer*, Madrid España, Editorial Harcourt, 2001.
131. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol*, 2008; 46(3):1050-9
132. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 1989; 7:209-214.
133. Peixoto AP, Campos GS, Queiroz LB, Sardi SI. Asymptomatic oral human papillomavirus (HPV) infection in women with a histopathologic diagnosis of genital HPV. *Journal of Oral Science*, 2011; 53(4):451-459.
134. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92(9):709-720.
135. Campisi G. Controversies surrounding human papillomavirus infection head and

Neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol*, 2009; 1(8): 1186/1758-3284-8.

136. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*, 2003; 104(3):336-344
137. Nieto A, Ramos M. Rising trends in Oral cancer mortality in Spain, 1975- 94. *J Oral pathol Med*, 2002; 31: 147-52
138. Borrás J, Borrás J, Viladiu, P. *Epidemiología y prevención Del cáncer em Catalunya*. Editorial Barcelona, 1997.
139. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 2002; 55:244-265.
140. D'Souza G, Fakhry C, Sugar EA, Seaberg EC, Weber K, Minkoff HL. Six month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer*, 2007; 121:143-150.
141. Martinelli M, Zappa A, Bianchi S, Frati E, Colzani D, Amendola A, et al. Human papillomavirus (HPV) infection and genotype frequency in the oral mucosa of newborns in Milan, Italy. *Clin Microbiol Infect*, 2012; 18(6):E197-199
142. Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, et al. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol*, 1995;47:209-18.
143. Gavillon N, Vervaet H, Derniaux E, Terrosi P, Graesslin O, Quereux C. How did I contract human Papillomavirus (HPV)? *Gynecol Obstet Fertil*, 2010; 38(3):199-204.
144. Smith E, Parker M, Rubenstein L, Haugen T, Hamsikova E, Turek L. Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2010; 326-369.
145. Fredericks BD, Balkin A, Daniel HW, Schonrock J, Ward B, Frazer IH.

Transmission of human papillomaviruses from mother to child. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 1993; 33(1):30-2.

146. Medina M, Medina M, Merino L. Current considerations about the presence of the human papilomavirus in the oral cavity. Av Odontoestomatol, 2010; 26(2):71-80.

ANEXOS 1. Tablas de Resultados.

Tabla 1. Características sociodemográficos en mucosa de madres participantes en esta investigación residentes en Cali-Colombia

Características	Mujeres	
	n(76)	%
Estrato Social		
1	47	61.8
2	26	34.2
3	2	2.6
4	1	1.3
Estado Civil		
Soltera	17	22.3
Unión Libre	53	69.7
Casada	3	3.9
Separada	3	3.9
Hábito de Cigarrillo		
Nunca ha fumado	52	68.4
Fuma actualmente	22	28.9
Exfumador	2	2.6
Ingesta de Alcohol		
Si	28	36.8
No	45	59.2
Otros	1	1.3
No Sabe/No Responde	2	2.6
Consumo de Sustancias Psicoactivas		
Si	10	19.7
No	66	86.8

Tabla 2. Características de comportamiento sexual en madres residentes en Cali-Colombia

Características	Mujeres	
	n(76)	%
Número de Embarazos		
1	63	82.9
2	11	13.2
3	2	2.6
Tipos de Partos		

Vaginal	59	77.6
Cesárea	17	22.4
Número de Abortos		
0	66	86.8
1	9	11.8
2	1	1.3
Actividad Sexual		
Si	55	72.4
No	21	27.6
Enfermedad de Transmisión Sexual		
Si	2	2.6
No	71	93.4
No Sabe/No Responde	3	4.0
Presencia de Verrugas		
Si	21	27.6
No	54	71.1
No Sabe	2	2.6

Tabla 3. Características sociodemográficas en niños menores de 2 años residentes en Cali-Colombia

Características	Niños	
	n(76)	%
Sexo		
Femenino	38	50.0
Masculino	38	50.0
Tipo de Parto		
Natural	59	77.6
Cesaréa	17	22.4
Asistencia a Guardería		
Si	18	23.7
No	57	76.3
Presencia de Verrugas		
Si	0	0.0
No	76	100.0

Tabla 4. Características sociodemográficos e infección por VPH en mucosa oral de madres residentes en Cali-Colombia

Características	n(76)	VPH- (%)	VPH+ (%)	P
Estrato Social				
1	47	42 (55.2)	5 (6.6)	0.347
2	26	26 (34.2)	0	
3	2	2 (2.6)	0	
4	1	1 (1.3)	0	

Estado Civil				
Soltera	17	16 (21.1)	1 (1.3)	0.915
Unión Libre	53	49 (64.4)	4 (5.3)	
Casada	3	3 (3.9)	0	
Separada	3	3 (3.9)	0	
Hábito de Cigarrillo				
Nunca ha Fumado	52	47 (61.8)	5 (6.6)	0.291
Exfumador	22	22 (29)	0	
Fuma Actualmente	2	2 (2.6)	0	
Ingesta de Alcohol				
Si	28	25 (64.4)	3 (4.0)	0.039
No	45	44 (57.9)	1 (1.3)	
Otros	1	1 (1.3)	0	
No Sabe/No Responde	2	1 (1.3)	1 (1.3)	
Consumo de sustancias Psicoactivas				
Si	10	10 (19.7)	0	0.368
No	66	61 (73.7)	5 (6.6)	

Tabla 5. Características de comportamiento sexual e infección por VPH en mucosa oral de madres residentes en Cali-Colombia

Características	n(76)	VPH- (%)	VPH+ (%)	P
Número de Embarazos				
1	63	59 (77.6)	4 (5.3)	0.878
2	11	10 (13.2)	1 (1.3)	
2	2	2 (2.6)	0	
Tipos de Partos				
Vaginal	59	57 (75)	2 (2.6)	0.112
Cesárea	17	14 (18.4)	3 (4.0)	
Número de Abortos				
0	66	62 (81.5)	4 (5.3)	0.819
1	9	8 (10.5)	1 (1.3)	
2	1	1 (1)	0	
Actividad Sexual				
Si	55	50 (66.8)	5 (6.6)	0.156
No	21	21 (27.6)	0	
Enfermedad de Transmisión Sexual				
Si	2	2 (2.6)	0	
No	71	66 (86.9)	5 (6.6)	
No Sabe/No Responde	3	3 (10.5)	0	
Presencia de Verrugas				
Si	21	19 (25.0)	2 (2.6)	0.795
No	54	51 (67.1)	3 (4.0)	
No Sabe	2	2 (2.6)	0	

Tabla 6. Identificación de la presencia de VPH en muestras de mucosa oral en niños menores de 2 años

Características	n(76)	VPH- (%)	VPH+ (%)	<i>P</i>
Sexo				
Femenino	38	37 (48.7)	1 (1.3)	0.314
Masculino	38	38 (50.0)	0	
Tipo de Parto				
Natural	59	58 (76.3)	1 (1.3)	0.589
Cesárea	17	17 (22.4)	0	
Asistencia a Guardería				
Si	18	17 (23.7)	1 (1.3)	0.195
No	57	57 (75.0)	0	
Presencia de Verrugas				
Si	0	0	0	
No	76	75 (98.7)	1 (1.3)	

ANEXO 2. Consideraciones Éticas

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 05-013

Proyecto: **DETECCION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS EN MUCOSA ORAL DE LA CIUDAD DE CALI - COLOMBIA**

Sometido por: **ENRIQUE HERRERA/ANDRES CASTILLO/DIANA CAROLINA ZAMBRANO/WILMAR SALDARRIAGA/JOSE MARIA SATIZABAL**

Código Interno: **032-013** Fecha en que fue sometido: **01** **03** **2013**

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité **certifica que:**

1. Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:

- | | |
|---|---|
| ☒ Resumen del proyecto | ☒ Protocolo de investigación |
| ☒ Formato de consentimiento informado | ☒ Instrumento de recolección de datos |
| ☐ Folleto del investigador (si aplica) | ☒ Cartas de las instituciones participantes |
| ☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo:**

☐ SIN RIESGO ☒ RIESGO MÍNIMO ☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

5. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.

6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.

7. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:

- Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

8. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:

- Lesiones a sujetos humanos.

Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.

- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de **1 año** a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
 - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo 1).
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - e. cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - g. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:



Fecha:

26

04

2013

Nombre:

LAURA E. PIEDRAHITA S.

Capacidad representativa:

PRESIDENTA

Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma:



HERNAN J. PIMIENTO J.

Fecha:

26

04

2013

Nombre:

VICEDECANO DE LA FACULTAD DE
SALUD

Capacidad
representativa:

Teléfono: 5185680