

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUJERES
RESIDENTES DE LA CIUDAD DE CALI

ALEJANDRA ARBELÁEZ VÁSQUEZ



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2019

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUJERES RESIDENTES DE LA CIUDAD DE CALI

ALEJANDRA ARBELÁEZ VÁSQUEZ

Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Doctor en
Ciencias Biomédicas

DIRECTOR

ANDRÉS CASTILLO GIRALDO PhD

CO-DIRECTOR

MILTON FABIÁN SUÁREZ ORTEGÓN PhD



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

SANTIAGO DE CALI

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Santiago de Cali, _____

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mi esposo, por su amor incondicional, comprensión, soporte y colaboración durante estos años.

Mis más sinceros agradecimientos a la Doctora Mildrey Mosquera por haberme dado la oportunidad de hacer parte de su grupo de investigación; su colaboración y soporte académico han sido fundamentales para el desarrollo de este proceso.

Al Doctor Andrés Castillo por su tutoría, paciencia y apoyo continuo durante estos años.

Por la amistad, apoyo y ayuda quiero dar mi gratitud a mis compañeros del grupo de Nutrición y a todos aquellos que me acompañaron en este proceso, en especial a mi cotutor el Doctor Milton Suarez por inspirarme a seguir este camino.

Al Dr. Massimo Tomasino y Tarik Gheit, del Grupo Infecciones y Biología del Cáncer, adscrito a la Agencia de Investigación del Cáncer, IARC; quienes facilitaron la genotipificación de las muestras VPH positivas en su laboratorio; y al Dr. Ignacio Bravo del Laboratorio de Infecciones y Cáncer del Instituto Catalán de Oncología, ICO; quien me recibió en su grupo y laboratorio donde realicé la pasantía doctoral en Barcelona, España.

A las entidades financiadoras que hicieron posible el planteamiento y ejecución de este trabajo, el Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología (Colciencias) y la Universidad del Valle.

Finalmente, quiero agradecer a quienes participaron en estos estudios y dieron su consentimiento para continuar estos procesos investigativos.

TABLA DE CONTENIDO

NOTA DE ACEPTACION	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
RESUMEN.....	12
CAPÍTULO I.....	15
INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE CONCEPTOS	15
INTRODUCCIÓN: VISIÓN GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL.....	15
MARCO CONCEPTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
CONCEPTOS Y DEFINICIÓN DE VARIABLES RESULTADO	23
REVISIÓN Y RACIONALIZACIÓN DE LOS CAPÍTULOS DE LA TESIS.....	50
APROXIMACIÓN METODOLÓGICA.....	54
LINEAMIENTO DEL PLANTEAMIENTO DE CADA CAPÍTULO.....	58
CAPÍTULO II.....	60
TRANSMISIÓN INTRAUTERINA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	60
OBJETIVOS	60
MATERIALES Y MÉTODOS	60
RESULTADOS.....	63
DISCUSIÓN	66
LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO	69
CAPÍTULO III.....	70
DETECCIÓN DEL VPH EN CAVIDAD ORAL DE MUJERES ENTRE 18 A 31 AÑOS Y SUS HIJOS MENORES DE 2 AÑOS.....	70
OBJETIVOS	70
MATERIALES Y MÉTODOS	71
RESULTADOS.....	74
DISCUSIÓN	77
FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	83
CAPÍTULO IV	84

EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA EL VPH EN LA FRECUENCIA RELATIVA DE SU DETECCIÓN EN CAVIDAD ORAL DE NIÑAS Y ADOLESCENTES ENTRE 14 A 17 AÑOS DE LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA.	84
OBJETIVOS	84
MATERIALES Y MÉTODOS	85
RESULTADOS	87
DISCUSIÓN	89
FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	91
CAPÍTULO V	92
IMPLEMENTACIÓN DE LA NUEVA GUÍA PRÁCTICA CLÍNICA PARA LA DETECCIÓN Y MANEJO DE LESIONES PRECANCEROSAS DE CUELLO UTERINO EN MUJERES DE LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA.	92
OBJETIVOS	92
MATERIALES Y MÉTODOS	93
RESULTADOS	95
DISCUSIÓN	98
CONCLUSIONES GENERALES	101
Vías de transmisión no sexual del VPH	101
Detección de VPH en mucosa oral	102
Efecto de la vacunación profiláctica sobre la detección de VPH en mucosa oral	102
Evaluación del programa de diagnóstico temprano de lesiones precancerosas en cuello uterino	102
REFERENCIAS	105
ANEXOS	119
ANEXO 1	119
PRODUCTOS DE LA TESIS DOCTORAL	119
ANEXO 2	121
CUESTIONARIO APLICADO A LAS PARTICIPANTES DE PROYECTO “DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN MUCOSA ORAL DE NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS Y SUS MADRES” (CAPÍTULO III).	121
ANEXO 3	126
CUESTIONARIO APLICADO A LAS PARTICIPANTES DE PROYECTO “EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA EL VPH EN LA FRECUENCIA RELATIVA DE SU DETECCIÓN EN CAVIDAD ORAL DE NIÑAS Y ADOLESCENTES ENTRE 14 A 17 AÑOS DE LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA.” (CAPÍTULO IV).	126

LISTA DE ABREVIATURAS

ACOG	Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología
ACSM	Colegio Americano de Medicina del Deporte
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CC	Cáncer cervical
CCC	Carcinoma de cabeza y cuello
CCE	Carcinoma de células Escamosas
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical.
COF	Carcinoma orofaríngeo
COF-VPH	Carcinoma orofaríngeo positivo para VPH
CVT	Ensayo de vacunación contra el VPH, Costa Rica
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dsADN	Acido desoxirribonucleico de doble cadena
E	Genes de expresión temprana de VPH
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ENDS	Encuesta Nacional de Demografía y Salud
FA	Fracción atribuible.
FDA	Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos
FUTURE	Mujeres unidas para reducir unilateralmente la enfermedad Ecto/Endocervical
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
L	Genes de expresión tardía de VPH
LCR	Región larga de control
LEI	Lesión intraepitelial escamosa
LEI-AG	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
LEI-BG	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
mARN	Ácido ribonucleico mensajero

NHANES	Centro Nacional de Estadísticas de Salud de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE. UU.
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marcos de lectura abierta
PAI	Programa ampliado de inmunización
PATRICIA	Ensayo papiloma y cáncer cervical en adultos jóvenes
Pb	Pares de bases
PCR	Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa
pRb	Proteína del Retinoblastoma
PRRJ	Papilomatosis Respiratoria Recurrente Juvenil
VLPs	Partículas similares a virus
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo
VPH-BR	Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organización genómica del VPH 16.	17
Figura 2	Ciclo viral de VPH.	20
Figura 3	Potenciales rutas de transmisión vertical de VPH.	26
Figura 4	Efecto de la infección por VPH en células trofoblásticas.	30
Figura 5	Estructura del epitelio reticular y expresión de PDL-1 sobre el epitelio de las criptas amigdalinas.	32
Figura 6	VPH en cavidad oral de niños y adolescentes.	36
Figura 7	Pasos para tamizaje y diagnóstico de lesiones precancerosas de cuello uterino en mujeres de 30 años o más, según la nueva Guía Práctica del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia.	49
Figura 8	Esquema general de la tesis doctoral.	53
Figura 9	Representación esquemática de la técnica de PCR.	55
Figura 10	Región de reconocimiento de los cebadores MY09/11 y Gp5+/Gp6+.	56
Figura 11	Tecnología Luminex xMap	57
Figura 12	Características de comportamiento sexual de un grupo de mujeres aparentemente sanas entre los 18 a 31 años.	76
Figura 13	Porcentaje de detección del ADN del VPH-AR según los resultados de la citología y la colposcopia en mujeres de la ciudad de Cali, Colombia.	95
Figura 14	Resultados generales de la tesis doctoral.	104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Proteínas virales y su función.	18
Tabla 2	Resumen de ensayos clínicos de vacunas contra el VPH realizados en poblaciones de cáncer cérvico-uterino.	42
Tabla 3	Características sociodemográficas de las mujeres participantes.	64
Tabla 4	Resultados de la detección de VPH en muestras de origen materno y fetal.	65
Tabla 5	Características del parto de las mujeres participantes.	66
Tabla 6	Genotipos de VPH identificados presentes en la cavidad oral de madres e hijos participantes.	74
Tabla 7	Características sociodemográficas según la detección de VPH y los genotipos identificados en mucosa oral de 76 mujeres de la ciudad Cali, Colombia.	75
Tabla 8	Grupos de edad y detección de VPH en mucosa oral discriminando por uso y no uso de condón entre las mujeres sexualmente activas.	77
Tabla 9	Características sociodemográficas, comportamiento sexual y presencia del VPH en cavidad oral en un grupo de mujeres que recibieron la vacuna en contra del VPH versus un grupo de mujeres sin vacunar de la ciudad de Cali, Colombia.	88
Tabla 10	Razón de oportunidad de la presencia de VPH-16 en mucosa oral por dosis recibidas de la vacuna contra el VPH.	89
Tabla 11	Genotipos de los VPH de AR detectados en mujeres de la ciudad de Cali-Colombia, según el tipo de infección y el diagnóstico histopatológico, entre octubre de 2018 y febrero de 2019.	96
Tabla 12	Distribución de los genotipos de VPH-AR para los cuales las vacunas de Gardasil protegen, según los resultados de la prueba de citología.	97

Tabla 13 Distribución de los genotipos de VPH-AR para los cuales las vacunas de Gardasil protegen, según los resultados de la prueba de colposcopia. 98

RESÚMEN

La presente tesis doctoral brinda un panorama nacional a cerca de la presencia de VPH en diferentes poblaciones femeninas, vacunadas y no vacunadas, con el fin de estimar las tasas de detección y los genotipos circulantes en los diferentes grupos poblacionales. Se exploran rutas de transmisión no sexual del VPH (vertical y horizontal) entre madres e hijos y se aborda de forma exploratoria la efectividad de las iniciativas gubernamentales en pro de la detección y diagnóstico temprano de lesiones pre-cancerosas en la población colombiana; mediante la formulación de diferentes proyectos de investigación, presentados en los capítulos II, III, IV y V del presente documento. El capítulo I, brinda una introducción conceptual de los capítulos subsiguientes y presenta la justificación del planteamiento de cada proyecto, en pro de la generación de nuevo conocimiento sobre el VPH en la era de la vacunación profiláctica.

El capítulo II tiene como objetivo establecer la frecuencia de transmisión intrauterina de VPH en mujeres aparentemente sanas primigestantes y sin antecedentes de lesión cervical de la ciudad de Cali, mediante el análisis molecular de muestras de origen materno-fetal ($n = 301$). En este estudio, se identificó una tasa de transmisión intrauterina del 0%, aunque diferentes genotipos fueron identificados en muestras de placenta y células endoteliales de cordón umbilical con porcentajes de detección del 1,1%, y 0,7% respectivamente, en las muestras de sangre materna y de cordón umbilical la detección fue del 0%. No se encontraron diferencias significativas respecto a variables sociodemográficas y características de parto entre los grupos positivos y negativos para la detección de VPH. Este capítulo aporta información sobre una de las vías de transmisión no sexuales en una población sin antecedentes de lesión cervical, poniendo en evidencia la presencia de VPH en estos tejidos muy probablemente, también a partir del establecimiento de infecciones latentes.

En el capítulo III se aborda la transmisión horizontal del VPH en un grupo de madres (no vacunadas contra el VPH) y sus hijos menores de dos años ($n = 152$), mediante el análisis de muestras de mucosa oral de ambos grupos poblacionales. En este proyecto se identificó una tasa de detección de VPH en jóvenes madres, entre los 18 a 31 años de edad, de 6,6% y en niños menores de dos años del 1,3%. No obstante, no encontró una concordancia entre las muestras positivas de madres y sus hijos,

para una tasa de transmisión horizontal del 0%. En el grupo de mujeres, no se encontraron diferencias significativas respecto a variables sociodemográficas o de comportamiento sexual entre los grupos positivos y negativos para la detección de VPH, a excepción del no uso del condón, el cual parece ser un factor determinante en la adquisición de la infección oral de VPH entre los 25 a 31 años de edad. Este estudio arroja evidencia sobre la presencia de este virus en mucosa oral desde edades tempranas, infección adquirida muy probablemente mediante contacto no sexual. Adicionalmente, mediante un abordaje exploratorio, se establecen tasas de detección de VPH en población femenina no vacunada entre los 18 a 31 años de edad.

El capítulo IV estudia las diferencias en la detección de VPH en mucosa oral, en mujeres escolarizadas vacunadas y no vacunadas de la ciudad de Cali ($n = 1.034$). En este estudio se logró evidenciar diferencias significativas en las tasas de detección de VPH entre los grupos vacunado y no vacunado con frecuencias relativas de 0,64% y 3,33% respectivamente, así como también se observa una diferencia estadísticamente significativa en la detección de VPH 16, genotipo oncogénico cubierto por la vacuna (Gardasil-4), entre ambos grupos. Adicionalmente, de acuerdo a los resultados, recibir al menos dos dosis de la vacuna contra el VPH, mostró reducir en un 92% el riesgo de presentar VPH 16 en mucosa oral. Datos pioneros en el abordaje preliminar del efecto de la vacunación frente a la infección oral por el VPH.

Por último en el capítulo V, se explora la efectividad de las iniciativas gubernamentales, frente a la prevención y diagnóstico temprano de lesiones pre-cancerosas de cuello uterino mediante el análisis estadístico de resultados de tamizaje citológico, diagnóstico colposcópico y genotipificación de VPH, en un grupo de mujeres atendidas en la ESE centro, de la ciudad de Cali, diagnosticadas de acuerdo a la Guía de Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino del Ministerio de Salud y Protección Social. La detección de anormalidades citológicas en mujeres VPH positivas se presentó en un 57% de los casos, y algún grado de lesión histopatológica cervical fue identificado mediante colposcopia en el 78% de las mujeres. Los genotipos identificados con mayor frecuencia fueron el VPH 16 y el grupo VPH 56, 59 y 66. Comparando los resultados de las pruebas citológicas y colposcópicas frente con los genotipos para los cuales brinda protección la vacuna contra el VPH Gardasil-4 y Gardasil-9, se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados, evidenciando una mayor prevalencias de genotipos cubiertos por la vacuna

tetravalente en citologías positivas y lesiones cervicales del alto grado, respecto a la vacuna nonavalente. Este estudio, es uno de los primeros en evaluar las estrategias de detección y diagnóstico temprano de lesiones cervicales precancerosas, en conjunto con la detección molecular de VPH, y además explorar la conveniencia de la implementación de la vacuna Gardasil-9 en los planes de vacunación nacional, de acuerdo a los genotipos circulantes a nivel local.

En conclusión, la ejecución de los estudios en mención permitió el abordaje de diferentes aspectos del VPH y brindó información adicional sobre las tasas de detección en diferentes tejidos, rutas de transmisión no sexual y el efecto de la vacunación profiláctica en ciertos escenarios. En síntesis, no se halló evidencia de transmisión intrauterina u horizontal de VPH de madres a hijos, aunque en definitiva este virus logra acceder a tejidos propios del proceso de gestación, y es detectado de forma consistente desde edades muy tempranas y a lo largo de diferentes etapas de la vida en la mucosa oral de población femenina aparentemente sana, no obstante, la vacunación contra el VPH parece mostrar un buen nivel de protección; así como la implementación de la detección y genotipificación molecular de VPH en los programas de diagnóstico y detección temprana de lesiones precancerosas de cuello uterino, brinda un panorama más amplio sobre la infección cervical en los diferentes grados de lesión y permite un acercamiento al efecto de la vacunación sobre los genotipos circulantes a nivel nacional.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE CONCEPTOS

INTRODUCCIÓN: VISIÓN GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL

El objetivo de esta tesis doctoral es contribuir al conocimiento de diferentes aspectos del Virus de Papiloma Humano (VPH), en especial aquellos relacionados con vías alternas de transmisión (transmisión vertical y por contacto directo de madre a hijo), su presencia en cavidad oral de población aparentemente sana, y el impacto de la vacunación profiláctica, así como el de los programas de detección y diagnóstico temprano de lesiones precancerosas de cuello uterino. Todos estos temas escasamente explorados en la investigación local y/o global.

Este trabajo comprende el planteamiento y ejecución de cuatro proyectos de investigación independientes que se plantearon tras el surgimiento de nuevos cuestionamientos, y el interés de aprovechar la experiencia y material previamente adquirido por el grupo de investigación. Cronológicamente, el primer estudio planteado tuvo como objetivo encontrar evidencia de la transmisión intrauterina del VPH, mediante el análisis molecular de muestras materno-fetales, almacenadas en el biobanco del Grupo de Nutrición. El segundo estudio, abordó la posibilidad de una transmisión del VPH de madre a hijo (a) por contacto directo, mediante el análisis de muestras de mucosa oral, de un grupo de mujeres a partir de las cuales fueron recolectadas las muestras biológicas procesadas en el primer estudio. En el tercero, gracias a un panorama más amplio sobre la detección de VPH en mucosa oral de población femenina, se propuso explorar la presencia del VPH en niñas y adolescentes vacunadas y no vacunadas contra el VPH; y finalmente, el cuarto estudio surge de la posibilidad de analizar la utilidad del algoritmo de detección y manejo de lesiones precancerosas según la última Guía de Práctica Clínica, mediante el análisis estadístico de resultados de pruebas diagnósticas y de tamizaje obtenidas en centros de salud de la ciudad de Cali.

El presente capítulo abarca el marco conceptual de la tesis e incluye un contexto biológico y epidemiológico sobre el VPH, tomando como base su papel como agente etiológico de cáncer cervical, mecanismos de infección, tasas de detección en población aparentemente sana y conceptos de la vacunación profiláctica contra el VPH. Se identifican los vacíos en el conocimiento

actual que se han intentado cubrir con el presente trabajo de investigación, y se brinda una breve introducción de los capítulos dos, tres, cuatro y cinco, que detallan el abordaje de los métodos, resultados y análisis de los mismos.

MARCO CONCEPTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

Virus del Papiloma Humano (VPH)

Hasta la fecha han sido identificados más de 200 tipos del VPH, los cuales han sido divididos en cinco géneros, con base en el análisis de secuencia de su ADN. La gran mayoría ubicados en el género beta (β) y gamma (γ), causan comúnmente infecciones asintomáticas o lesiones proliferativas benignas auto limitadas en individuos inmunocompetentes. El género alfa (α) por su parte incluye una variedad de tipos virales, algunos de los cuales han sido asociados con el desarrollo de una variedad de lesiones neoplásicas y cáncer¹.

Organización Genómica

El VPH, es un virus pequeño (50-60 nm de diámetro) no envuelto cuyo material genético se compone de una molécula de ADN circular de doble cadena, con una longitud aproximada de 8000 pares de base (pb), que se divide en tres regiones funcionales: una región de expresión temprana (E, early) que codifica las proteínas E1-E7; una región tardía (L, late) que codifica las proteínas L1 y L2; y una región larga de control (LCR). Las proteínas E1-E7 están implicadas múltiples funciones incluyendo la replicación y transcripción del genoma viral, mientras que las proteínas L1 y L2 conforman la cápside viral icosaédrica. La LCR es una región no codificante que alberga sitios de unión para factores de transcripción que controlan la expresión génica². Dado el tamaño limitado del genoma, el uso de múltiples promotores y complejos patrones de maduración del mRNA, permite la expresión de una variedad de productos génicos en diferentes estadios del ciclo de infección³.

La figura 1, ilustra la organización del genoma del VPH 16. En ella se observan los seis fragmentos abiertos de lectura (ORFs): E1, E2, E4 y E5 (en verde) y E6 y E7 (en rojo), que se expresan gracias al promotor P97 en diferentes estadios del proceso de diferenciación de la célula epitelial; y los ORFs

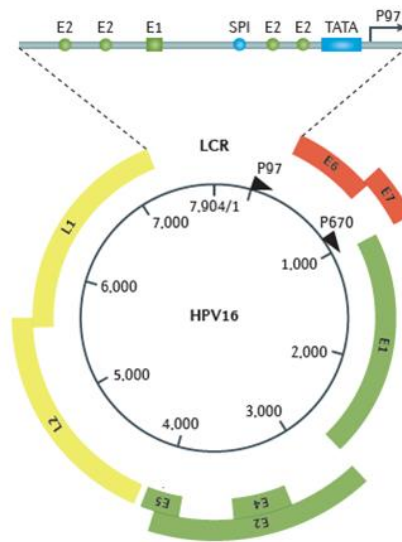
tardíos (L1 y L2), expresados a partir del promotor P670 en las capas superiores del epitelio. Con una flecha se indica la ubicación de los promotores temprano (P97) y tardío (P670).

La LCR contiene los orígenes de replicación así como secuencias de control postranscripcional y sitios de unión para los productos de los genes E1 y E2 como del factor de transcripción SP1⁴.

Figura 1. Organización genómica del VPH 16.

Tomada de: Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.

Clin Sci. 2006;110(5):525-541.



Los genes implicados en los procesos de replicación y empaquetamiento del genoma viral (E1, E2, L1 y L2) son denominados genes centrales y su secuencia se encuentra altamente conservadas entre los diferentes tipos de VPH. Los genes encargados de la transformación del ambiente celular (E4, E5, E6 y E7), se denominan genes accesorios y en cambio muestran una amplia variabilidad, cumpliendo en muchos casos funciones similares pero no idénticas durante el ciclo de diferentes papiloma virus⁵.

Función de los Productos Génicos Virales

Como se ha mencionado el genoma de los VPH poseen 8 ORFs que codifican 8 proteínas virales, las cuales cumplen funciones específicas durante el ciclo viral. La tabla 1, resume algunas de las funciones más representativas de estas proteínas.

<i>PROTEÍNA</i>	<i>FUNCIÓN</i>
E1	Posee actividad de helicasa dependiente de ATP. Se une al origen de replicación del genoma viral y recluta la maquinaria de síntesis de ADN.
E2	Se une a sitios específicos en el LCR y funciona como inhibidor o activador de la replicación de genes virales. Promueve la replicación del genoma viral reclutando a la proteína E1 al origen de replicación. Interactúa con la cromatina mediando la segregación del genoma viral, permitiendo su transferencia a las células hijas durante la división celular.
E4	Se une a proteínas del citoesqueleto alterando su estructura, facilitando la liberación del virión.
E5	Induce proliferación celular al interactuar con el EGFR. Regula a la baja la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).
E6	Promueve la inmortalización celular por degradación de p53. Modifica la adhesión y diferenciación celular por degradación de p63 y p73.
E7	Promueve la degradación de pRb, permitiendo la progresión del ciclo celular a la fase S. Induce inestabilidad cromosómica
L1	Proteína mayor de la cápside Interactúa con el heparán sulfato permitiendo la unión de las partículas virales a la capa basal del epitelio.
L2	Proteína menor de la cápside Se cree que interactúa con receptores de superficie celular facilitando el ingreso del virión a la célula huésped. Recluta proteínas L1 para el ensamblaje de la cápside.

Tabla 1. Proteínas virales y su función⁶.

Ciclo Viral

El ciclo viral más estudiado es el de los alfa-papiloma virus, figura 2. Sin embargo, es probable que sus principios generales sean compartidos entre los diferentes tipos de virus del papiloma².

Modelos experimentales sugieren que la infección por el VPH requiere del acceso de las partículas virales a las células basales del epitelio cutáneo o mucoso. Micro lesiones en estos tejidos, interacciones con el proteoglicano heparán sulfato, y receptores de integrinas presentes en las células basales permiten el ingreso del virión a la célula huésped. Una vez en el núcleo, el genoma viral permanece de forma episomal manteniendo un bajo número de copias (~200 copias/célula). En esta fase inicial, las proteínas E1 y E2 son esenciales en el mantenimiento del estado episomal, el control estricto de la replicación y la expresión proteica viral^{7,2,4}.

En las capas superiores del epitelio se presentan una amplificación del genoma viral dependiente del programa de diferenciación de la célula huésped, que involucra cambios en la actividad de promotores y en los patrones de maduración del mRNA que facilitan la producción de diferentes productos génicos virales^{8,9}.

A medida que la célula infectada migra hacia la región supra basal del epitelio, como parte de su proceso de diferenciación, disminuye su actividad mitótica. En este punto, las proteínas E6 y E7 estimulan la progresión del ciclo celular al inducir la degradación de dos proteínas celulares responsables de su control, las proteínas del Retinoblastoma (pRb) y p53. La proteína viral E7 se une a pRb llevando a su degradación, como consecuencia el factor de transcripción E2F es liberado, promoviendo el ingreso de la célula en la fase S del ciclo celular al inducir la expresión de proteínas involucradas en la replicación del ADN y división celular. Por su parte, la proteína E6 se asocia con p53 mediando su ubiquitinación y posterior degradación, lo que previene la detención del ciclo celular y el inicio de apoptosis a consecuencia de daños en el ADN o en respuesta a las acciones provocadas por E7. La proteína E6 adicionalmente puede activar la proteína telomerasa de la célula huésped, manteniendo la integridad de los telómeros durante ciclos mitóticos repetidos, permitiendo la inmortalización de las células infectadas. En este punto se cree que la proteína viral E5 también contribuye directamente con la amplificación del genoma modificando el ambiente celular a través de la activación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), cuya vía

de señalización activa una serie de proteínas implicadas en la replicación del ADN y división celular^{2,7}.

El ciclo viral se completa tras la expresión y ensamblaje de las proteínas L1 y L2, que conforman la cápside viral. En las capas superficiales del epitelio ocurre la liberación de las partículas virales ensambladas mediante el proceso normal de descamación, sin embargo, se cree que la proteína E4 podría facilitar, mediando la formación de fibras amiloides que rompen la queratina alterando la estructura de la capa cornea del epitelio^{2,5-7,10}.

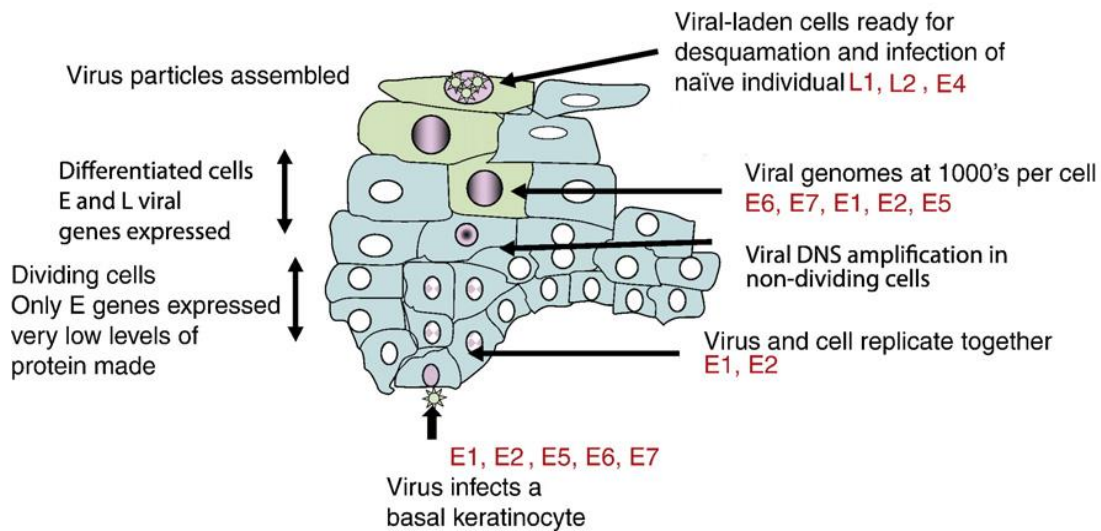


Figura 2. Ciclo viral de VPH.

Tomada de: Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010; 117(2 SUPPL.):S5.

Células Madre Epiteliales y su Papel en la Infección por VPH

Algunos estudios han sugerido que el desarrollo de enfermedades asociadas al VPH requiere no solo de la infección de células basales del epitelio, sino más específicamente de células madre presentes en la capa basal del tejido cutáneo y mucoso¹¹.

Estas células madre serían las encargadas de mantener la homeostasis epitelial al dividirse y generar células con potencial de proliferación controlado, comprometidas a sufrir una diferenciación terminal en las capas superiores del epitelio¹².

En gran medida, el desarrollo de neoplasias asociadas a VPHs de alto riesgo (VPH-AR) resulta de la actividad de proteínas virales sobre proteínas supresoras de tumores que les confiere a estas células una ventaja competitiva sobre la población no infectada, permitiendo su expansión clonal.

Este hecho le permitiría al virus establecer infecciones persistentes por largos periodos de tiempo, gracias a la amplia capacidad de proliferación de estas células.

Tipos de VPH-AR y VPH-BR y su asociación con Cáncer

De los cerca de 200 tipos de VPH identificados hasta el momento, 40 de ellos han sido clasificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de alto o bajo riesgo, según su asociación con el cáncer cervical⁶.

Los tipos virales de VPH-AR que incluyen a los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, que son detectados principalmente en cáncer cervical y otros tipos de cáncer como el de orofaringe y región anogenital. Los tipos de VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 73 y 81, considerados de bajo riesgo, se encuentran asociados a verrugas genitales y lesiones no malignas⁶.

Ambos tipos virales pueden llevar a cabo el ciclo viral descrito anteriormente, sin embargo, los VPH-AR tienen la habilidad de inducir la proliferación de células basales. En las neoplasias relacionadas con la infección por este tipo de VPHs se suele presentar una alteración del ciclo viral productivo, ya descrito, caracterizada por un incremento en los patrones de expresión de las proteínas E6 y E7, lo que conduce a una acumulación de mutaciones e inestabilidad cromosómica en el genoma celular, que eventualmente llevan al desarrollo del cáncer. La integración del ADN viral en el genoma del huésped es una característica en la carcinogénesis cervical y se correlaciona con la progresión de lesiones precancerosas (Neoplasia epitelial cervical, CIN) a cáncer invasivo. La pérdida del gen viral E2 es una consecuencia común de este proceso de integración, y conduce a un incremento en la expresión de las proteínas virales E6 y E7, debido a que E2 es un represor transcripcional para ambas proteínas^{4,7,12-14}.

A nivel molecular, las consecuencias de estos eventos son un incremento en la división celular y una inhibición del programa de diferenciación de las células infectadas. Sin embargo, esto no es suficiente para la progresión de las lesiones neoplásicas a cáncer invasivo, por lo que se requiere

adicionalmente la acumulación de errores genéticos y epigenéticos, lo cual es facilitado por la sobreexpresión persistente de los productos de los genes E6 y E7. Los efectos en la célula huésped incluyen ruptura del ciclo de duplicación del centrosoma, inducción de inestabilidad cromosómica, y cambios en la expresión de genes celulares^{4,6,12,13}.

Con respecto a los tipos virales de bajo riesgo (VPH-BR), se requiere de investigaciones adicionales que permitan establecer diferencias sustanciales en el ciclo viral descrito, respecto a los tipos de VPH-AR. En conjunto dado que tanto los VPH-BR como los VPH-AR establecen infecciones persistentes, es probable que ambos tipos induzcan una serie de cambios en la célula infectada, empleando vías comunes o convergentes a las mediadas por las proteínas p53 y pRB, sin implicar la adquisición de una ventaja de crecimiento o desregulación en la expresión de genes virales en células infectadas por VPH-BR, eventos propios del proceso oncogénico mediado por VPH-AR¹⁵.

Epidemiología de la Infección por VPH

El VPH es el agente causal necesario, pero no suficiente de más del 90% de los casos de cáncer cervical y de una fracción importante de otros tipos de cáncer anogenitales y orofaríngeos.

A nivel mundial, alrededor del 4,5% de todos los casos de cáncer son causados por el VPH (630.000 nuevos casos por año), 8,6% en mujeres y 0,8% en hombres. El cáncer cervical es el tipo de cáncer más común (83%), dos tercios de los cuales se presentan en países en desarrollo. En América Latina el 13% de los casos de cáncer en mujeres, son atribuibles al VPH.

Entre otros cánceres asociados a este virus se encuentra en cáncer de vulva (8.500 casos/año), vagina (12.000 casos/año), pene (13.000 casos/año), ano (35.000 casos/año) y orofaríngeo (21.000 casos/año). VPH 16 y 18 son responsables del 72,4% de los casos¹⁶.

En población aparentemente sana, datos obtenidos de 194 estudios que incluían la detección molecular del VPH, indican una prevalencia global de infección cervical de aproximadamente el 12%. Sin embargo, son evidentes variaciones geográficas. América Latina, por ejemplo, presenta una de las mayores prevalencias, con una tasa de infección cervical del 16%. Información sobre otras regiones anatómicas es escasa. En el género masculino, por otro lado, la prevalencia de infección genital es mucho menor frente a la prevalencia en el sexo femenino.

La infección es relativamente frecuente en la región perianal y canal anal de ambos sexos, pero tiende a encontrarse mayor positividad en pacientes VIH+ y hombres homosexuales.

La detección de infección oral por VPH varía sustancialmente según el estudio, dependiendo de la técnica de muestreo y detección empleada. En un meta-análisis que incluyó un total de 18 estudios con 4.582 individuos sanos, reportó una prevalencia del 4,5% (95% IC: 3,9–5,1%). Un estudio adicional realizado en los Estados Unidos, en un total de 5.501 individuos entre los 14 – 69 años, reportó una prevalencia del 6,9% (95% IC: 5,7–8,3%) siendo tres veces mayor en hombres que en mujeres.

Datos de prevalencia de VPH en orofaringe son limitados debido a la dificultad de acceso a muestras de estos sitios anatómicos en población sana¹⁷.

CONCEPTOS Y DEFINICIÓN DE VARIABLES RESULTADO

Esta tesis incluye el abordaje de diferentes aspectos del VPH mediante el planteamiento de cuatro capítulos que exploran la detección del material genético del VPH en la población femenina.

El segundo capítulo busca evidencia de una vía de transmisión intrauterina del VPH mediante el análisis molecular de muestras de ADN materno-fetales, donde las variables resultado serán la presencia/ausencia del material genético de VPH en muestras de placenta, células endoteliales de cordón umbilical y sangre materna y de cordón umbilical; evaluando, adicionalmente, la concordancia entre los tipos de VPH detectados en las muestras de origen materno y fetal.

En el tercer capítulo se evalúa la transmisión horizontal de madre a hijo en un subgrupo de la población analizada en el primer capítulo. La variable resultado fue la presencia/ausencia de ADN de VPH en muestras de mucosa oral de la madre y su hijo. Adicionalmente, se evalúa de forma exploratoria la frecuencia relativa de detección de VPH en la mucosa oral en ambas poblaciones.

El cuarto capítulo explora la frecuencia relativa de detección del VPH en mucosa oral de jóvenes de sexo femenino entre los 14 a 17 años de edad y su relación con el estado de vacunación. Las variables resultado serán la presencia/ausencia de ADN de VPH respecto al estado de vacunación y número de dosis recibidas.

Finalmente, el capítulo cinco, aborda de forma exploratoria la relación entre lesiones cervicales precancerosas y genotipos de VPH identificados en un grupo de mujeres diagnosticadas de acuerdo a la Guía de Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia del 2.014.

A continuación, se presentan los conceptos y definiciones que sustentan cada capítulo.

CAPITULO II

Transmisión Vertical del VPH

El VPH es un virus oncogénico asociado con el desarrollo de una serie de cánceres en la región cervical, ano-genital y orofaringe¹⁸. Es el virus más común transmitido por vía sexual y se estima que más del 80% de las mujeres jóvenes contraerán la infección a lo largo de su vida, siendo la mayoría de ellas asintomáticas y tiene la tendencia a resolverse de forma espontánea. Anualmente, aproximadamente 530.000 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervical y actualmente la carga total de cánceres relacionados con el VPH en mujeres asciende a aproximadamente el 6% de todos los casos de cáncer¹⁶.

Si bien la investigación se ha centrado en los efectos y la prevención de esta infección viral en la población adolescente y adulta, la infección por VPH también ha sido reportada en población infantil desde muy temprana edad (menores de 1 año). Entre las vías de transmisión propuestas, se ha planteado que el VPH podría ser contagiado de madre a hijo (a) por vía intrauterina¹⁹.

El primer estudio que documentó la presencia de infecciones por VPH en población infantil, fue publicado en 1.978 por Pfister y zur Hausen quienes identificaron material genético de VPH 1, VPH 2 y VPH 3 en verrugas cutáneas de niños entre los 5 a 15 años de edad²⁰. Más tarde en los años 80s, se identificó al VPH como agente causal de la Papilomatosis Respiratoria Recurrente (PRR), enfermedad que se caracteriza por la proliferación de papilomas en la vía aérea superior de niños y adolescentes²¹⁻²³. La presencia de ADN de VPH en neonatos asintomáticos fue reportada

inicialmente 1.986 por Roman & Fife²⁴, y posteriormente a partir del trabajo de Steinberg en 1988, en niños con PRR²⁵. Así, varios investigadores han abordado el tema a partir del análisis molecular de muestras de piel y mucosas de neonatos sanos, así como líquido amniótico, placenta y sangre, entre otras; encontrando material genético viral en todos los casos.

Se ha propuesto que el VPH puede acceder al bebe en desarrollo durante la gestación, el parto o inmediatamente después de éste²⁶. La detección de ADN de VPH en líquido amniótico, sangre materna y de cordón umbilical, así como en mucosa oral y epidermis de neonatos nacidos por cesárea, sustentan estos planteamientos²⁷.

A nivel intrauterino se ha planteado que el VPH podría entrar en contacto con el feto a través de micro lesiones en las membranas fetales o mediante el ascenso de partículas virales del tracto genital infectado de la madre por vía transplacentaria. A nivel perinatal, el estudio realizado por Frederick y col., estableció la contaminación de neonatos durante el parto vaginal como la principal fuente de infección tras su paso por el canal vaginal infectado de la madre²⁸.

La infección peri-concepcional a través de espermatozoides u óvulos contaminados o durante la infancia, a través de la leche materna han sido considerados debido a la detección del VPH en este tipo de muestras biológicas, sin embargo los resultados de una variedad de estudios realizados al respecto, son inconsistentes²⁹. Las potenciales rutas de transmisión viral al feto, se resumen en la figura 3.

Factores de riesgo para la transmisión vertical o perinatal del VPH no han sido bien caracterizados, no obstante, la carga viral, presencia de lesiones VPH positivas en el tracto genital materno y el parto vaginal han sido asociados con altas tasas de infección neonatal, e incluso se ha reportado una relación directa entre el riesgo de detección de VPH en neonatos y variables de infecciones genital materna^{31,27}.

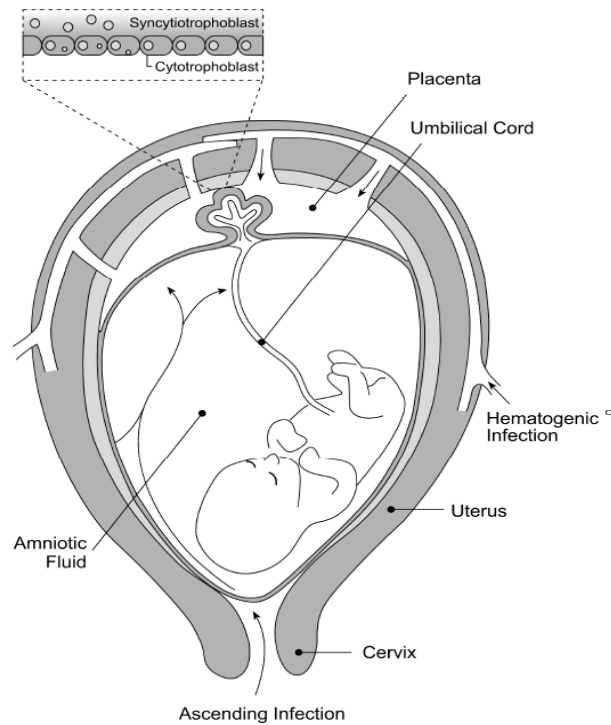


Figura 3. Potenciales rutas de transmisión vertical de VPH.

Tomado de: Sarkola M. Human Papillomavirus (HPV) In Mothers Before and After Delivery. 2009³⁰.

Transmisión Intrauterina del VPH

La transmisión intrauterina del VPH fue considerada en un principio tras la observación de lesiones asociadas a este agente viral en bebés recién nacidos, como la papilomatosis laríngea y anogenital^{23,32,33}; posteriormente, la detección molecular de material genético del VPH en líquido amniótico³⁴, placenta^{35,36}, sangre de cordón umbilical³⁷ y membranas fetales, dieron soporte a esta hipótesis. La concordancia genotipo-específica entre las muestras ya mencionadas y material biológico de origen neonatal, es considerada una prueba de transmisión vertical a nivel intrauterino²⁷.

Datos que soportan esta ruta de transmisión son adicionalmente la detección de material genético de VPH en neonatos nacidos por cesárea³⁸, la presencia de anomalías histológicas en placentas VPH positivas³⁹, y una serie de estudios *in vitro* que demuestran la viabilidad, capacidad de invasión, replicación y actividad transcripcional de los genotipos VPH 11, 16, 18 y 31 en líneas celulares de placenta^{40,41}.

Se ha planteado que el VPH podría acceder a este tipo de tejidos por vía sanguínea o de forma transplacentaria. Esta última, podría presentarse mediante el ascenso de partículas virales desde el tracto genital materno⁴².

Se ha propuesto que la frecuencia de transmisión viral de este tipo es muy baja, aunque han sido reportadas frecuencias relativas de entre el 0 a 47%⁴³. Al respecto, algunos autores afirman que infecciones cervicales con altas cargas virales e historial previo de lesiones cervicales maternas se han relacionado con alto riesgo de transmisión³¹, aunque también se ha reportado la detección de VPH en muestras materno-fetales de madres previamente negativas en cervix⁴². Como posible explicación a estos hallazgos se ha planteado la latencia viral, la cual se caracteriza por una disminución significativa de la carga viral (hasta niveles no detectables) e infección limitada a la capa basal de epitelio, gracias a los mecanismos control inmunológico. Condiciones que alteren los mecanismos de defensa inmune, permitirían la reactivación de la infección e un incremento paulatino de la carga viral del VPH, lo que aumentaría la posibilidad de transmisión intrauterina en mujeres previamente negativas para la detección de VPH⁴⁴.

Detección del VPH en muestras de origen materno-fetal

Una serie de estudios se han propuesto la detección de ADN del VPH en diferentes tipos de muestras de origen materno-fetal, con el fin de identificar la frecuencia de transmisión vertical de este agente viral, sin embargo, los reportes han sido inconsistentes y las tasas de detección muestran una amplia variación, posiblemente a causa del diseño del estudio, la metodología empleada para la recolección de muestras, la sensibilidad de la prueba de detección del VPH y la población estudiada.

En el último año, una revisión sistemática de la literatura realizada por A Zouridis y col., que incluyó un total de 9 publicaciones donde fueron analizadas 421 madres y sus hijos, reportó una frecuencia general de transmisión vertical de VPH a partir de madres infectadas entre un 2,8 a 39,7%⁴³. Otros estudios han reportado tasas semejantes, entre el 5 al 72%, en mujeres también con antecedentes clínicos de infección cervical por VPH previo al parto y entre el 1 al 18% en mujeres sin antecedentes de infección previa por VPH⁴⁵.

En el estudio realizado por SM. Syrjänen y col., Finnish Family HPV Study, con el fin de identificar la dinámica de transmisión del VPH de madres a hijos, reportó en 2010 una tasa de infección placentaria del 4,2%, 3,5% en sangre de cordón umbilical y 0% en sangre periférica materna⁴⁶. Estudios adicionales han reportado tasas de infección del 9,9% (8/81) en placentas procedentes de abortos espontáneos e inducidos, identificando a los genotipos de VPH 6, 11, 58, 66 y 82⁴⁷. Análisis posteriores en mujeres embarazadas aparentemente sanas⁴⁸ han reportado una detección de VPH en placenta entre 0% a 42%. En muestras de sangre de cordón umbilical han sido reportadas adicionalmente tasas de detección entre 0 a 13%¹⁹, mientras que en sangre periférica, se han reportados tasas entre 0 a 52%^{49,50}.

La transmisión vertical, identificada tras la concordancia tipo-específica entre muestras cervicales maternas y muestras de origen neonatal, se presenta entre 20 a 30% según Chatzistamatiou y col (2016)., y se estima que la principal fuente de infección se da durante el parto⁵¹. No obstante, la cesárea aun no es recomendada como parto de elección en mujeres embarazadas con antecedentes de infección genital por VPH, pese a que ésta ha sido asociada con tasa de transmisión vertical de VPH significativamente más bajas en comparación con el parto vaginal (14,9% vs. 28,2%, RR: 0,515, 95%. IC: 0,34 -0,78)³⁸.

No obstante, si bien el VPH ha sido ampliamente detectado en este tipo de muestras, persiste el interrogante si el feto o el neonato han sido realmente infectados por el virus o se trata de una contaminación transitoria, ocasionada por el contacto directo con el tracto genital infectado de la madre durante el parto. Estudios sobre la persistencia de la infección de bebés positivos para VPH al momento del parto han sido conducidos al respecto, sin embargo los resultados han sido contradictorios con tiempos de resolución de entre 6 meses a 2 años post-parto⁴⁵.

Implicaciones de la transmisión vertical: Infección por VPH y complicaciones del embarazo

Se estima que aproximadamente el 90% de las mujeres sexualmente activas en algún momento de su vida, han sido infectadas por algún genotipo de VPH, no obstante, la gran mayoría de estas infecciones son transitorias y erradicadas por el sistema inmunológico en un periodo aproximado de 6 a 12 meses⁵². Durante el embarazo, se ha reportado la persistencia y adquisición de infecciones genitales asociadas al VPH, y se ha postulado que su resolución durante esta etapa podría ser menos

eficiente^{53,54}. Lo anterior, aunado a los cambios hormonales y la inmunosupresión local, propia de esta etapa, podrían promover la reactivación de infecciones subclínicas o latente e incrementar el riesgo de infección fetal^{55,56}.

Complicaciones durante el embarazo como el parto pretérmino, abortos espontáneos y la preeclampsia han sido asociadas con esta infección viral, aunque los mecanismos exactos hasta la fecha no han sido dilucidados^{57,58}.

La preeclampsia, es una entidad patológica caracterizada por la presencia conjunta de hipertensión arterial y proteinuria durante el embarazo. Si bien los mecanismos etiológicos aun no son claros, datos clínicos y epidemiológicos han asociado cambios ateroscleróticos en la vasculatura útero-placentaria y una mala placentación, como principales factores de riesgo⁵⁹. Se ha planteado, que las infecciones virales a raíz de la liberación de altos niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12, IFN- γ , etc.), el incremento del estrés oxidativo y la disfunción de las células endoteliales podrían conducir al desarrollo de esta enfermedad, afectando la función y viabilidad de las células trofoblásticas, encargadas del proceso de placentación⁶⁰⁻⁶², es decir, la unión de la placenta al útero materno, mediante la invasión de la pared uterina materna y el establecimiento de la circulación útero-placentaria que permite el intercambio de gases, nutrientes, y desechos entre el feto y la madre⁶³.

Los partos pretérmino (antes de las 37 semanas de gestación), y abortos espontáneos también asociados a infecciones virales, se cree que podrían estar asociados con alteraciones en el proceso de placentación, así como con respuestas inflamatorias exageradas a infecciones bacterianas a causa de una modificación en la tolerancia inmunológica al lipopolisacárido bacteriano de las gestantes^{64,65}.

Respecto al VPH, varios estudios han demostrado que diversos VPH-AR son capaces de infectar placenta humana, siendo el sincitiotrofoblasto el blanco predominante de infección, donde han llegado incluso a replicarse⁶⁶. Se ha reportado que células trofoblásticas transfectadas con VPH 16, expresan oncoproteínas virales y muestra deterioro en su viabilidad y capacidad de adhesión celular, así como un incremento de la apoptosis^{36,41,67}. Lo que sugieren que la infección por VPH podría llevar una invasión trofoblástica inadecuada de la pared uterina de la madre y complicaciones obstétricas relacionadas con la disfunción placentaria, mediante la inducción de cambios en la fisiología del

trofoblasto⁶⁸. Esto a su vez podría afectar la capacidad de la placenta de modular el sistema inmune materno, y su capacidad de proteger al feto de infecciones adicionales, promoviendo una respuesta inflamatoria exagerada, que podría conducir al desarrollo de preeclampsia y parto pretérmino, como lo muestra la Figura 4⁶⁹.

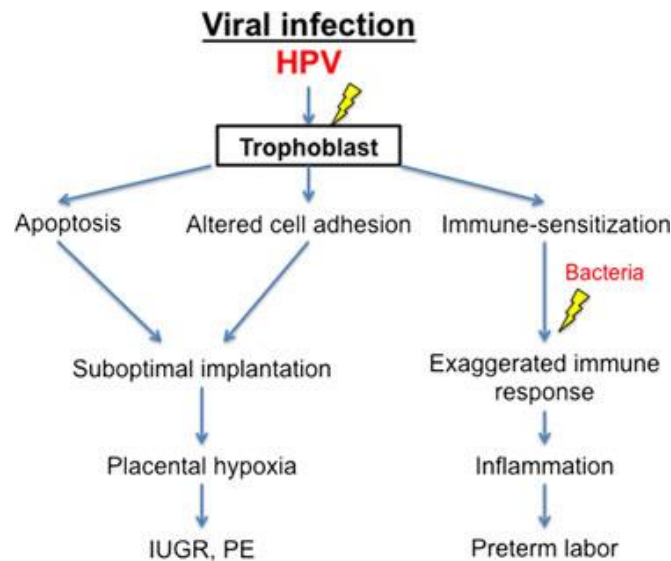


Figura 4. Efectos de la infección del VPH en células trofoblásticas.

Tomado de: Kwon JY, Romero R, Mor G. New insights into the relationship between viral infection and pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71(5):387-390.

Otros investigadores por el contrario, han propuesto que el VPH más que un agente causal podría ser solo un factor contribuyente en el desarrollo de complicaciones del embarazo, e incluso no han encontrado asociación alguna entre la infección por VPH en cérvix, placenta u otros tejidos con estas complicaciones^{35,70,71}.

CAPITULO III

Infección Oral por el Virus del Papiloma Humano

La infección por el VPH es ahora reconocida como un factor de riesgo en la patogénesis de un subgrupo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Detectándose en aproximadamente en el 90% de los casos VPH 16⁷².

Poco se conoce a cerca del modelo carcinogénico del VPH en cavidad oral, sin embargo, si el modelo multietapa ampliamente aceptado en la patogénesis del cáncer cervical, es aplicable a esta localización anatómica, la infección de la mucosa oral sana sería el paso inicial en la carcinogénesis oral mediada por VPH.

Numerosos estudios han documentado la predilección de este virus por la orofaringe, especialmente las amígdalas linguales y palatinas. Éste es un órgano linfoide secundario, revestido por un epitelio escamoso estratificado con numerosas invaginaciones, denominadas criptas amigdalinas, que proporcionan una amplia superficie de contacto para la captura de antígenos y vigilancia inmunológica. Estas criptas amigdalinas están revestidas de un epitelio reticular especializado con una membrana basal discontinua que facilita el tráfico de antígenos, linfocitos y células presentadoras de antígeno. La teoría actual sobre el mecanismo de infección de VPH de este tejido, dictamina que la membrana basal discontinua facilitaría el acceso de las partículas virales a las células basales sin requerir de un trauma previo, como en el modelo de cáncer cervical^{73,74}.

Por otro lado, la infección y persistencia del VPH en un tejido con una alta afluencia de linfocitos y células presentadoras de antígeno implica el empleo de un mecanismo de evasión inmunológica por parte del virus, figura 5. Se ha propuesto que la expresión de la proteína PD-L1 en las células de las criptas amigdalinas, y su unión al receptor PD-1 presente en los linfocitos T ocasiona una disminución de la respuesta citotóxica a antígenos viral limitando el daño tisular debido a la estimulación antigénica crónica propia del tejido, facilitando el establecimiento de infecciones persistentes por parte del VPH al evadir la respuesta inmunológica local, gracias a la tolerancia inducida de forma natural en los linfocitos T ^{74,75}.

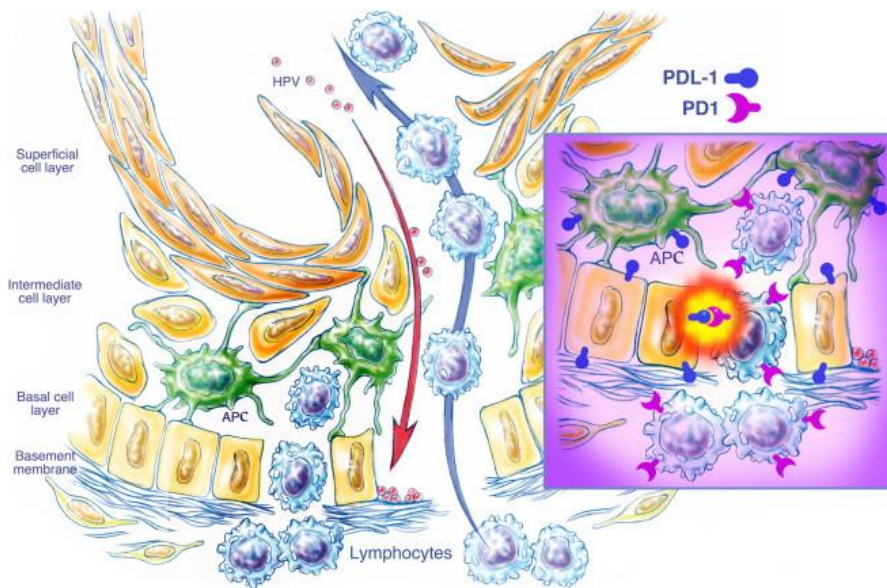


Figura 5. Estructura del epitelio reticular y expresión de PDL-1 sobre el epitelio de las criptas amigdalinas.

Tomado de: Westra W. The pathology of HPV-related head and neck Cancer: Implications for the diagnostic pathologist. *Semin Diagnostic Pathol.* 2015;32(1):42-53.

Carcinomas asociados a VPH en otras localizaciones de la cavidad oral, se ha postulado, podrían estar relacionados con la presencia de tejido amigdalino ectópico⁷⁶ que le brindan al VPH las ventajas anteriormente descritas⁷⁷.

Poco se conoce realmente a cerca de la infección de VPH en cavidad oral, siendo la comprensión del mecanismo exacto de infección y persistencia viral en estos tejidos aún desconocida.

Transmisión Oral de VPH

Especies de VPH del género alfa, beta y gama, han sido detectadas en cavidad oral de individuos aparentemente sanos, incluso desde el momento del nacimiento.

Estudios transversales sugieren que la infección oral por el VPH es transmitida por contacto directo, especialmente a través de las relaciones sexuales oro-genitales y besos profundos^{78,79}. Sin embargo, la auto inoculación, la transmisión vertical de madre a hijo durante el parto, a través del paso por canal vaginal infectado, u horizontal durante la infancia, mediante el contacto y la convivencia con

familiares infectados, son consideradas vías alternas de transmisión, esto debido a una variedad de estudios que han evidenciado la falta de asociación entre la actividad sexual y la infección oral por VPH^{80,81,82}, así como la detección de material genético viral en mucosa oral de niños y recién nacidos^{83,84,85}.

Trasmisión Horizontal

La transmisión horizontal se presenta por contacto no sexual con individuos infectados, de esta forma, el VPH puede ser transmitido a adultos y niños, no expuestos a actividad sexual, por hetero inoculación o a través de fómites.

La hetero inoculación se presenta por contacto genito-digital (toque o rascado de genitales) o besos a partir de individuos previamente infectados. Niños pequeños podrían adquirir la infección mediante el contacto cercano con familiares y cuidadores durante la limpieza, alimentación y cambio de pañal²⁸.

La transmisión a través de fómites fue considerada desde 1.989 por Ferenczy y col., quienes reportaron la detección de material genético del VPH en diferentes materiales médicos como guantes e instrumentos quirúrgicos. Los niños podrían ser infectados por medio de las tasas de baño, toallas infectadas u otros objetos. No obstante, el papel de los fómites en el desarrollo de infecciones activas no ha sido identificado^{28,86}.

Historia Natural de la Infección Oral por VPH

La historia natural de la infección oral de VPH, así como su duración y progresión a carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés) no está aún caracterizada. Estudios realizados al respecto sugieren que la infección de mucosa oral de individuos aparentemente sanos es poco prevalente y muestra una tasa de resolución de aproximadamente el 90% en un periodo de 12 a 24 meses, siendo evidente una alta variación por género y entre regiones geográficas^{78,87,88,89}.

Un estudio publicado recientemente estimó la incidencia y aclaración de la infección oral por VPH a través de la revisión de nueve publicaciones que incluían en total 3.672 participantes adultos

aparentemente sanos. La prevalencia de infección oral fue del 7,5%, la incidencia en un periodo de 12 meses fue de aproximadamente el 5% y la resolución de la infección varió entre un 0 a un 80% en un periodo de 6 a 18 meses. El genotipo más común fue VPH 16, con una prevalencia media de 1,6% y una resolución entre 40 a 80% de las infecciones en un periodo de 7 a 20 meses.⁹⁰

Estudios en población infantil han reportado tasas de infección general desde los 3 meses a 12 años de edad entre 0 y 47%, y tasas específicas por edad con un patrón de distribución bimodal con mayores frecuencias de infección en las etapas más tempranas (< 1 año) y tardías de la niñez (>13 años)^{19,91}. La persistencia de la infección oral ha sido abordada por estudios de seguimiento, como el Finish Family HPV Study donde encontraron tasas de infección neonatal del 14%, 21% a los 6 meses postparto, y 12% a los 36 meses. Tras un periodo de 3 años, el 42% de los infantes adquirieron una nueva infección, mientras que el 11% la resolvieron, y el 10% tuvo una infección persistente^{83,84}.

Prevalencia de la Infección Oral por VPH

En general la prevalencia de infección oral por VPH es mucho menor que la infección genital. Estudios epidemiológicos indican que la prevalencia global de infección por VPH en mujeres con citología normal es del 11 al 12% y en Latinoamérica de aproximadamente el 16%^{16,17}. La infección oral por su parte muestra una amplia variación entre los estudios realizados entre 0,9 a 7,5%⁷². Estas diferencias observadas en ambas regiones anatómicas, podrían ser explicadas por las siguientes hipótesis: 1) una detección reducida, debido a menores cargas virales en cavidad oral; 2) una transmisión ineficiente de la infección, debido a características propias del tejido como la inmunidad local, la carencia de una zona de transformación o el flujo de saliva; y 3) una resolución más rápida de la infección. Estudios adicionales que confirmen tales hipótesis son necesarios⁹².

Una serie de investigaciones muestran un patrón bimodal de la infección oral por VPH en adultos dependiente de la edad, con un primer pico de prevalencia entre los 30 a los 34 años y un segundo pico entre los 60 a 64 años, con una prevalencia absoluta mayor en el sexo masculino comparado con el femenino^{90,93}. En la mayoría de estudios, conducidos sobre individuos saludables, la prevalencia de VPH 16 fue baja, típicamente entre 0,5 a 2%.

Las razones de la baja tasa de detección de VPH en mucosa oral y la mayor prevalencia en el sexo masculino son desconocidas, aunque se han planteado las siguientes hipótesis: 1) los hombres tienen

mayor número de compañeros sexuales, y así mayor oportunidad de exposición; 2) la transmisión de la infección es más eficiente cuando se realiza sexo oral sobre la superficie mucosa de genitales femeninos infectados, que cuando se realiza sobre el epitelio queratinizado del pene y 3) las mujeres con algún nivel de inmunidad sistémica por infección cervical de VPH, podrían ser protegidas contra la infección oral, lo que no ocurriría en los hombres⁸⁷. Con respecto al patrón bimodal que evidencia la infección oral por VPH por grupos de edad, se ha planteado que podría estar causado por un cambio en las prácticas sexuales orales en la población entre 30 a 49 años comparado con generaciones mayores o una combinación del incremento en la duración de las infecciones, reactivación de infecciones latentes e incremento de la incidencia⁹⁴.

Un estudio realizado entre 2.011 y 2.014 por el Centro Nacional de Estadísticas de Salud de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE. UU. (NHANES) incluyó un total de 4.493 hombres y 4.641 mujeres entre los 18 a 59 años de edad aparentemente sanos. La prevalencia general de infección oral por VPH en hombres y mujeres reportada fue del 11,7% (95% IC: 9,8 - 13,1) y 3,2 (IC: 2,7 - 3,8), respectivamente. La prevalencia de infección por VPH-AR fue del 7,3 [IC: 6,0 - 8,6] en hombres y del 1,4 [IC: 1,0-1,8] en mujeres. El VPH16 fue el genotipo más común, particularmente en hombres (1,8 vs. 0,3)⁹⁵.

En países latinoamericanos una serie de estudios realizados en Perú, México y Brasil, reportaron prevalencias de infección oral por VPH entre el 5,3% y el 7,3%, en ambos sexos. La prevalencia de infección en mujeres estuvo entre el 5,3 y 11,9%. Solo uno de los estudios reportó una prevalencia específica del VPH-16 del 1,3%. En todos los casos los genotipos más prevalentes fueron VPH-BR^{96,97,98}.

Particularmente en Colombia son escasas las investigaciones al respecto. Hasta la fecha solo se cuentan con dos publicaciones. La primera de ellas realizada en una población de 66 hombres entre los 18 a 58 años, reportó la presencia de material genético de VPH en el 4,5% de los casos. Los genotipos detectados fueron VPH 11 (1,5%) y 16 (1,5%)⁹⁹. Un segundo reporte mostro una prevalencia de VPH 16 del 43,8% en 48 individuos aparentemente sanos, 16 hombres y 32 mujeres, entre los 18 a 40 años en la ciudad de Cali¹⁰⁰.

En población infantil una variedad de genotipos han sido reportados incluso desde el periodo neonatal. Smith y col., analizaron un total de 1.235 muestras de mucosa oral de niños entre las 2

semanas hasta los 20 años de edad, encontrando una prevalencia general de 1,9%. Las mayores tasas de detección se ubicaron en los niños menores de un año (2,5%) y adolescentes entre los 16 a 20 años (3,3%), evidenciándose un patrón bimodal. Las menores tasas de detección se encontraron entre los uno a cuatro años (0,8%) con un incremento gradual por edad. Genotipos de alto riesgo fueron detectados en el 0,8% de los casos, siendo el VPH 16 fue el más prevalente (60%). VPH-BR fueron detectados en el 1,1% de los casos. Según los autores, la transmisión vertical podría explicar la alta prevalencia de infección oral en niños menores de un año, sin embargo, a medida que crecen la infección es resuelta o se vuelve latente e indetectable. Más adelante el inicio de las relaciones sexuales, dispararía la prevalencia en el grupo de 16 a 20 años. La frecuencia relativa de infección oral por edades en niños y adolescentes entre las dos semanas y 20 años, reportada por Smith y col., se observa en la figura 6.

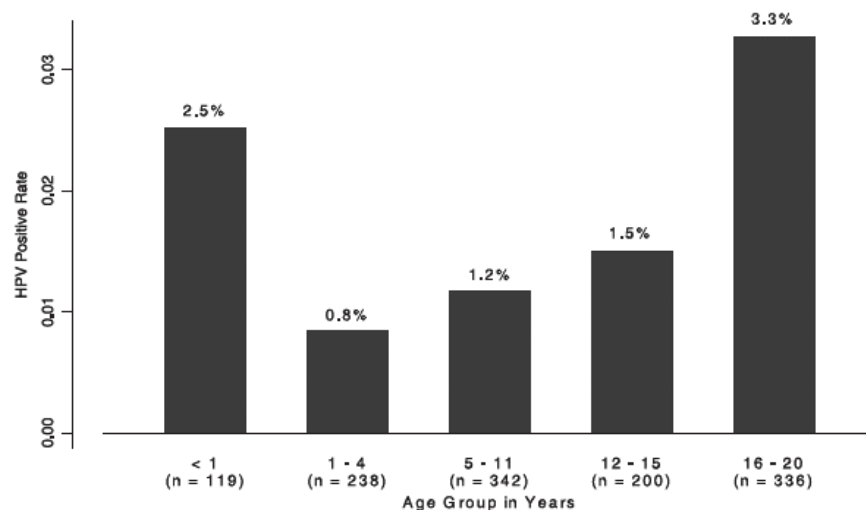


Figura 6. VPH en mucosa oral de niños y adolescentes.

Tomado de: Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(9):836-840.

Posteriormente, una revisión de la literatura realizadas por dos Santos y col., reporto una prevalencia de VPH en mucosa oral de niños entre un 12,3% y 48,1%¹⁰¹, mientras que Syrjanen y col., reportaron prevalencias entre el 0 y el 47% en niños asintomáticos entre los 0,3 a 11,6 años de edad¹⁹. Si bien estudios de seguimiento han establecido un tiempo de resolución de infección oral

por VPH en niños de 6 meses aproximadamente, han sido reportadas altas prevalencias en todos los rangos de edad, aunque se evidencia una alta variabilidad, probablemente a causa de la técnica utilizada para la recolección de la muestra y detección molecular de VPH¹⁹.

Factores de Riesgo de la Infección Oral de VPH

Numerosos estudios transversales han explorado una variedad de factores de riesgo de la infección oral de VPH, siendo los más consistentes el género masculino, el incremento de la edad, el comportamiento sexual y el consumo de tabaco.

Estudios poblacionales que han evaluado el nivel de riesgo, han señalado que el sexo masculino, el consumo de marihuana y tabaco (>20 cigarrillos al día) y el número de compañeros sexuales orales y vaginales (>16), incrementan el riesgo de adquirir una infección oral por VPH entre 4 a 16 veces. El mayor factor de riesgo fue el número de compañeros sexuales.^{102,95}.

En pacientes VIH positivos se ha asociado de forma significativa el grado de inmunosupresión con una mayor prevalencia de infección oral por VPH⁷⁸.

Asociaciones significativas entre la infección oral por VPH y los besos profundos, ha sido identificada en algunos estudios, sugiriendo que estos podrían constituir una vía de adquisición adicional de VPH¹⁰³.

Resultados incongruentes también han sido observados en diferentes investigaciones, por ejemplo, D'Souza y col., no encontraron una asociación significativa entre la infección oral por VPH y el número de compañeros sexuales a lo largo de la vida, pero si encontraron una asociación significativa con el número de compañeros sexuales recientes, en este estudio, tampoco se encontraron asociaciones significativas con el consumo de marihuana, tabaco y besos en la boca¹⁰⁴. Un estudio adicional llevado a cabo por Kreimer y col., que incluyó más de 4.000 hombres entre 18 a 70 años, no logro encontrar una asociación significativa entre la conducta sexual y la presencia de VPH en cavidad oral, aunque si encontraron una mayor prevalencia en hombres solteros y fumadores. Otras asociaciones con el nivel socioeconómico y el consumo de alcohol han sido igualmente incongruentes entre los diferentes estudios¹⁰⁵

En población infantil sin evidencia de contacto sexual previo, los factores de riesgo varían según el grupo de edad. Rintala y col., tras el análisis de 76 familias identificaron como factores de riesgo de infección oral en niños entre los 0 a 24 meses, antecedentes maternos de infección cervical persistente por VPH⁸⁴. La detección de VPH en la etapa neonatal algunos autores la han asociado con parto por canal vaginal contaminado de la madre, y alta carga viral¹⁰⁶. La persistencia de la infección oral por VPH, ha sido asociada con la presencia del virus en la cavidad oral de los padres, verrugas cutáneas en las manos de la madre, e inicio temprano de actividad sexual también por parte de la madre⁸³.

Consecuencias de la infección de VPH en población infantil

EL VPH ha sido asociado a una variedad de patologías en población infantil, generalmente de crecimiento limitado y regresión espontánea. Verrugas cutáneas y genitales, liquen escleroso, papilomas orales, y papilomatosis respiratoria recurrente-juvenil (PRRJ), son un ejemplo de ello¹⁰¹.

No obstante, a pesar de las altas prevalencias de infección reportadas, la enfermedad clínica en niños es poco común. Un estudio reciente, publicado por Mammas y col., usó el término “estrategia del caballo de Troya oncogénico”, para describir la historia del VPH en niños, refiriéndose a estos últimos como un reservorio silente de genotipos de VPH-AR, tal como el caballo de Troya de la mitología griega¹⁰⁷.

En cavidad oral las manifestaciones clínicas más comunes de la infección por VPH son: papilomas; *condiloma acuminatum*; verruga común; hiperplasia epitelial focal y en casos poco comunes la PRRJ y el carcinoma de células escamosas.

Los papilomas orales son los tumores epiteliales más comunes en población infantil (7,5%) y según una revisión bibliográfica realizada por Syrjänen S., aproximadamente el 50% de las lesiones son causadas por el VPH, particularmente, VPH 6 y 11, y el 75% de los condilomas orales, difíciles de distinguir clínicamente de los papilomas, han sido reportados positivos para VPH^{19,45}.

La PRRJ es una rara enfermedad que se presenta en 4,3/100.000 de los nacimientos. Suele manifestarse a los 5 años de edad y se caracteriza por el crecimiento recurrente de papilomas de

células escamosas en las cuerdas vocales, epiglotis y área subglótica y en algunas ocasiones tráquea o bronquios. Es causada por los genotipos 6 y 11, y fue la primera manifestación clínica en niños asociada a la infección por VPH^{21,32}.

El desarrollo de neoplasias en población infantil es aún un tema de estudio, aunque se han reportado casos aislados como el de Snietura y col., quienes identificaron un carcinoma de células escamosas en el canal auditivo externo en un niño de dos años nacido por cesárea de una madre VPH positiva, diagnosticada con cáncer cervical durante el embarazo. Muestras de la madre y el niño fueron analizadas, identificando al VPH 31 en ambos, corroborando la etiología viral.

VPH y HNSCC

El cáncer de cabeza y cuello comprende un grupo heterogéneo de malignidades del tracto aerodigestivo superior que juntas comprenden el séptimo cáncer más común alrededor del mundo. Se presentan en diferentes localizaciones como cavidad oral, faringe, laringe y glándulas salivales. Siendo la gran mayoría carcinomas de células escamosas (CCE). Los principales factores de riesgo de estos tipos de cáncer son el consumo de tabaco (fumado o mascado) y el alcohol¹⁰⁸. Sin embargo, en las últimas décadas revisiones de la agencia internacional de investigación del cáncer (IARC) concluyeron que existe suficiente evidencia de la carcinogenicidad especialmente del genotipo 16 del VPH en la orofaringe y posiblemente también en cavidad oral y laringe^{6,109}, donde la explicación más plausible del origen de los CCC asociados al VPH es una infección oral adquirida por vía sexual que no se elimina, persiste y evoluciona a cáncer invasivo^{110,111}.

Estudios clínicos y epidemiológicos han concluido que el HNSCC asociados a infección por el VPH comprenden un grupo diferente con respecto a los no asociados a esta infección viral. Se ha establecido específicamente que el cáncer orofaríngeo VPH positivo (COF-VPH), se presenta característicamente en hombres jóvenes con o sin historia previa de tabaquismo y consumo de alcohol y muestra una fuerte relación con factores de riesgo relacionados con el comportamiento sexual, como el inicio de actividad sexual a temprana edad y un alto número de parejas sexuales orales y vaginales. Respecto al pronóstico de los COF-VPH han sido reportadas altas tasas de sobrevivencia tras protocolos de tratamiento con quimioterapia y radioterapia con una baja

probabilidad de recurrencia y malignidades secundarias en comparación a tumores no asociados a infección por VPH¹¹².

CAPITULO IV

Infección Oral por VPH en adolescentes

En 2.001 un estudio realizado por Summersgill y col., buscaron determinar la frecuencia de VPH en cavidad oral de adolescentes entre los 13 a 20 años de edad encontrando una tasa de detección del 5,2% (5/97)¹¹³. Estudios posteriores han reportado prevalencias de infección del 1,5% en adolescentes entre los 12 a 15 años y del 3,3% entre los 16 a 20 años. En este estudio publicado por Smith y col., el sexo femenino, antecedentes de verrugas genitales y el tabaquismo fueron asociados con mayor riesgo de infección oral por VPH en el grupo de edad de 16 a 20 años. VPH-AR fueron identificados en el 0,5 a 1,2% en ambos grupos⁹¹.

En 2.010 Durzyńska y col., analizaron 2.837 muestra de lavado bucal de adolescentes entre los 13 a 18 años en una región de Polonia, encontrando porcentajes de infección del 1,4% (22/1551) en el grupo de 13 a 15 años y 1,1% (14/1286) en el grupo de 16 a 18 años. El genotipo detectado con mayor frecuencia fue el VPH 11. VPH 16 no fue detectado en la población estudiada.

De acuerdo al estatus de vacunación, en Suiza, un estudio conducido por Nordfors y col., fue reportada una prevalencia de VPH-AR en mucosa oral de 335 estudiantes de preparatoria vacunados y no vacunados entre los 17 a 23 años del 1,8% (3,1% en mujeres y 0,6% en hombres)¹¹⁴. Este estudio no encontró diferencias significativas en la detección de VPH entre géneros, ni entre el grupo de mujeres vacunadas y no vacunadas. En población masculina, un estudio publicado por Lehtinen y col., realizado en 395 jóvenes vacunados y no vacunados con una media de edad de 18 años, encontró diferencias significativas entre la prevalencia de detección oral de los genotipos de VPH 16 y 18 entre ambos grupos (0% vs. 2,1%)¹¹⁵. Estudios adicionales realizados en población de mayor edad evidencian diferencias significativas de acuerdo al estado de vacunación siendo la prevalencia de VPH en mucosa oral menor en población vacunada^{116,117}.

Estudios adicionales en adolescentes latinoamericanos son escasos, especialmente Colombia.

Vacunas contra el VPH

Actualmente, se cuenta con tres vacunas contra el VPH evaluadas en ensayos clínicos, licenciadas y recomendadas en un esquema de tres dosis (0, 2, 6 meses), aunque estudios recientes han reportado evidencia de una efectividad similar en esquemas de dos dosis.

En 2.006, fue aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) la primera vacuna profiláctica contra el VPH, Gardasil (Merck and Company Inc, Whitehouse Station, NJ), para su aplicación en mujeres entre los 9 a 26 años, para la prevención de cáncer cervical y verrugas genitales causados específicamente por los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18. En el año 2.009, su aprobación fue extendida para su aplicación en hombres, para la prevención de verrugas genitales y malignidades anales. Cervarix (GlaxoSmithKline, Philadelphia, Pa), la segunda vacuna contra el VPH, fue licenciada en 2.009, para la protección contra los VPH 16 y 18 en mujeres entre los 9 a 25 años¹¹⁸. Por último, la vacuna nonavalente, Gardasil-9 fue licenciada en 2.014, para su aplicación en hombres entre los 9 a 21 años y mujeres éntrelos 9 a 26 años^{119,120}.

Todas las vacunas consisten en partículas huecas fabricadas con una proteína recombinante, la proteína mayor de la cápside, L1. Estas partículas, denominadas partículas similares al virus (VLPs), poseen una morfología y geometría similar a la del virus nativo, pero carecen de material genético en su interior.

La vacuna Gardasil se compone de VLPs compuestos por L1 de VPH 6, 11, 16 y 18, Cervarix por L1 de VPH 16 y 18, y Cervarix-9 por L1 de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58¹²¹.

Cada vacuna brinda protección frente las enfermedades relacionadas con los tipos virales que incluyen.

Efecto Biológico de la Vacuna en Infecciones Cervicales y Cáncer

El efecto biológico de las vacunas contra el VPH se ha establecido mediante ensayos clínicos aleatorizados en fase 3 realizados en mujeres entre los 15 a 26 años, la tabla 2 resume los ensayos realizados para cada vacuna y los resultados obtenidos.

En general, estos estudios encontraron una alta eficacia de la vacunación (89,5%-98,2%) en la prevención de lesiones premalignas (NIC 2+) asociadas con los tipos específicos de VPH cubiertos por la vacuna en mujeres no expuestas previamente al VPH¹¹⁸. La eficacia disminuyó en todos los estudios cuando fueron analizadas mujeres con exposición o infección previa (54,8%-60,7%). Adicionalmente, la eficacia de la vacuna se redujo notablemente cuando se analizaron infecciones ocasionadas por tipos de VPH no incluidos en la vacuna (42,9%-64,9%). Datos que brindaron soporte para el desarrollo de la vacuna nona-valente (Gardasil-9), la cual ha mostrado una alta eficacia (96,7%) en la prevención de neoplasia intraepitelial cervical, vaginal y vulvar grado 2 y 3 e infecciones persistentes (96,0%) causadas por los VPH 31, 33, 45, 52 y 58. Así como su inmunogenicidad no demostró ser inferior (>99%) para los VPH6, 11, 16 y 18 al ser comparada con la vacuna cuadrivalente (Gardasil)^{119,122}.

Tabla 2. Resumen de ensayos clínicos de vacunas contra el VPH realizados en poblaciones de cáncer cérvico-uterino.

ENSAYO	COHORTE	VACUNA	CONTROL	PERSISTENCIA VIRAL EFICACIA DE LA INFECCIÓN (>6 MESES)	EFICACIA DE LA ENFERMEDAD (NIC 2+)
FUTURE I/II	Mujeres 15-26 años	Gardasil-4 (Merck) N=7.864	Placebo N= 7.865	No evaluada	98,2%
PATRICIA	Mujeres 15-25 años	Cervarix (GlaxoSmithKline) N= 7.338	Vacuna contra la Hepatitis A N= 7.305	91,4%-94,3%	92,9%
CVT	Mujeres 15-25 años	Cervarix (GlaxoSmithKline) N= 2.643	Vacuna contra la Hepatitis A N= 2.697	90,2%-93,1%	89,5%
Ensayo 9-Valente	Mujeres 15-26 años	Gardasil-9 (Merck) N= 5.948	Gardasil N= 5.943	Riesgo de Reducción: 96,0%*	Riesgo de Reducción: 96,3%-96,7%*

Abreviaturas: NIC 2+, neoplasia intraepitelial cervical de grado 2; CVT, Ensayo de vacunación contra el VPH Costa Rica (siglas en ingles); PATRICIA, Ensayo papiloma contra el cáncer en adultos jóvenes; FUTURE I/II, Mujeres unidas para reducir unilateralmente la enfermedad Ecto/Endocervical.

*Se muestra la reducción del riesgo para la enfermedad o infección asociada con los tipos específicos de VPH 31, 33, 45, 52 y 58, más que la eficacia absoluta.

Estudios de inmunogenicidad que han evaluado la respuesta de anticuerpos y la estabilidad de la respuesta inmune inducida por la vacuna, han encontrado altos títulos de anticuerpos un mes después de finalizar el esquema, incluso 100 veces más altos de lo que se obtiene tras una infección natural. Después de dos años se observa un descenso de los títulos, aunque se mantienen 10 veces más elevados con respecto a los niveles generados tras una infección natural¹²⁰.

Estudios realizados en población infantil entre los 10 a 15 años han demostrado una respuesta robusta en niños y niñas, con títulos de anticuerpos 1,7 a 2,7 veces mayor comparados con adultos jóvenes. Estos títulos, se ha reportado, permanecen estables hasta por 8 años post-vacunación^{120,122}.

Impacto Potencial de la Vacuna Profiláctica Contra la Infección Oral por VPH y Carcinoma Orofaringeo

La prevalencia del cáncer orofaríngeo (COF), un subgrupo de HNSCC, ha incrementado significativamente en las últimas décadas, a causa de la infección por el VPH. En los Estados Unidos, aproximadamente entre el 70 al 90 % de los casos de COF, son causados por el VPH. Frente a esto, hay un interés creciente en el efecto de la vacunación en la prevención del COF. Sin embargo, la efectividad de ninguna de las 3 vacunas disponibles ha sido rigurosamente evaluada frente a la protección de infección oral o desarrollo de COF. Su licencia recomienda su uso para la prevención de cáncer ano-genital, pre-cáncer y verrugas genitales¹²⁰.

Hasta la fecha son escasos los reportes sobre este tema, y solo datos provenientes del Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT), brindan evidencia indirecta de la potencial eficacia de la vacuna en la prevención de la infección oral por VPH al encontrar cuatro años después de la vacunación, prevalencias de VPH en mucosa oral mayores en el grupo control respecto al grupo vacunado (0,7% vs 0,03%), con una eficiencia estimada de 93,3%. Sin embargo, debido a que este estudio no fue diseñado con este objetivo, no cuenta con una línea de base de infección oral por VPH o un seguimiento que permita estimar en forma definitiva la efectividad de la vacuna en infecciones persistentes en esta localización anatómica¹²³.

En el estudio CVT además se encontró que la vacunación de mujeres con o sin exposición previa al VPH, pudo proveer protección frente a la infección por VPH16/18 en uno o más sitios anatómicos

(7,4% vs 30,4% $p<0.001$), Por lo tanto, mujeres expuestas al virus, pueden protegerse no solo contra la infección cervical, sino adicionalmente la región oral y anal¹²⁴.

Adicionalmente, anticuerpos que han mostrado ser importantes en la protección frente a la infección oral por VPH, como la Ig G de mucosa oral y la Ig A secretora, que han sido detectadas en mujeres con historia de infección natural por VPH, han sido también detectadas en individuos vacunados, lo que podría significar un mejoramiento de la inmunidad local tras la vacunación, sin embargo la respuesta de anticuerpos en este tejido ha sido poco evaluada¹²³.

En vista de la escasa información disponible y la creciente prevalencia de cáncer orofaríngeo en diversas regiones geográficas, son necesarios estudios adicionales que permitan determinar la eficacia de las vacunas disponibles contra el VPH en la infección oral o cáncer orofaríngeo.

Implementación de la Vacuna Profiláctica

Desde su licencia, la vacuna contra el VPH ha sido introducida en programas nacionales de inmunización en muchos países alrededor del mundo. En general estos programas van dirigidos a mujeres entre los 9 a 15 años de edad que no han iniciado su vida sexual. Algunos países de altos ingresos como Estados Unidos, Canadá, Austria y Australia han adicionalmente iniciado la vacunación masculina^{120,121}.

A nivel mundial se estima que el 4% de las mujeres elegibles han sido vacunadas, sin embargo, la mayoría de estas provienen de países de altos ingresos, sin embargo, las poblaciones con mayor incidencia y mortalidad de cáncer de cuello uterino se encuentran en el mundo en desarrollo y permanecen desprotegidas.

Los principales factores que han influenciado la baja cobertura en países de mediano y bajo ingreso han sido los costos, la logística que implica la aplicación de múltiples dosis, y la creencia de padres y cuidadores acerca de posibles efectos adversos relacionados con la vacuna, esto a pesar de la amplia evidencia sobre la alta eficacia y seguridad de la misma.

En los estados unidos, por ejemplo, para el 2.013, solo el 57% de las adolescentes entre 13 a 17 años había iniciado su vacunación, y solo en 37,6% completo el esquema, demostrando un limitado uso de la vacuna¹¹⁸.

Estrategias basadas en incrementar la percepción de la población de los beneficios de la vacunación, así como la susceptibilidad y severidad de las enfermedades prevenibles tras su aplicación, deben ser implementadas.

Vacunación Contra el VPH en Colombia

Desde el año 2.012 el Ministerio de Salud y Protección Social, como parte de una estrategia para reducir la morbilidad y mortalidad por cáncer de cérvix en Colombia, incluyó la vacuna contra el VPH en el esquema único de vacunación nacional.

La introducción se realizó en dos fases, la primera, iniciada en agosto del mismo año incluyó la vacunación de niñas escolarizadas en instituciones educativas públicas y privadas, que estuviesen cursando cuarto año y tuviesen 9 años o más. La segunda fase, iniciada en febrero de 2.013, tuvo como objetivo la vacunación de niñas no escolarizadas de zonas rurales y urbanas. Ese mismo año se amplió la edad de cobertura de niñas escolarizadas, desde los 9 años cumplidos hasta el grado once con independencia de la edad; y no escolarizadas desde los 9 hasta los 17 años¹²⁵.

La vacuna utilizada fue Gardasil (tetraivalente), que permite la protección frente a los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18. En un esquema de tres dosis (0, 2 y 6 meses).

Según la base de datos del Programa Ampliado de Inmunización, PAI, desde su implementación y hasta el 2.015, fueron vacunadas en Colombia, un total de 3.1 millones de niñas, con tasas de cobertura superiores al 90%, una de las mayores a nivel mundial¹²⁶. Sin embargo, en el año 2.014, la cobertura descendió bruscamente hasta el 20,4%, muy probablemente, a causa de los hechos ocurridos en el municipio del Carmen de Bolívar, en los que se prestaron más de 200 reportes de eventos adversos aparentemente secundarios a la vacunación de un grupo de niñas entre los 8 y 19 años. Posteriormente, tales reportes fueron descartados como efectos secundarios a la vacunación

y se catalogaron como episodios psicogénicos, a causa del miedo colectivo hacia la vacuna¹²⁷. Un estimado más reciente, indica que la tasa de cobertura no supera el 16%¹²⁸.

En la ciudad de Cali, el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) de la secretaría de salud de Santiago de Cali desde el 2012 ha venido realizando jornadas de vacunación gratuita, en niñas escolarizadas y no escolarizadas, como parte de la estrategia nacional en salud pública para reducir la morbilidad y mortalidad por cáncer de cuello uterino en mujeres colombianas. Las primeras dosis fueron suministradas a 97.976 niñas escolarizadas de un censo de 100.548 para una cobertura del 97,4%. De este grupo de niñas 53.492 han recibido la segunda dosis. Así, el porcentaje de cobertura de las instituciones educativas ha sido del 93,1%, en donde el 96.9% corresponde a colegios públicos y el 90,75% a colegios privados.

CAPITULO V

VPH y cáncer cervical

Como se ha mencionado anteriormente, el VPH es considerado el agente causal necesario de más del 90% de los casos de cáncer cervical¹²⁹; y hasta la fecha se han identificado más de 40 tipos mucoso trópicos, los cuales han sido clasificados como VPH-AR o VPH-BR de acuerdo a su potencial carcinogénico. Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, siglas en inglés) el grupo de AR se compone de 15 genotipos de VPH: VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82; un grupo de posible riesgo oncológico incluye seis genotipos: VPH 26, 53, 67, 68, 70 y 73; y en el grupo de BR se encuentran el VPH 6 y 11^{109,130}. Las infecciones por este agente viral pueden ser únicas o múltiples, con infección simultánea por más de un genotipo de VPH, siendo estas últimas asociadas con grados severos alteración histológica e incremento de la persistencia de la infección¹³¹⁻¹³³.

El cáncer cervical (CC) es el cuarto tipo de cáncer más común alrededor del mundo en población femenina¹³⁴. Normalmente, está precedido generalmente por una serie de cambios histológicos que se caracterizan microscópicamente por manifestaciones que van de la atipia celular a diversos grados de displasia o de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) antes de progresar a carcinoma

invasor¹³⁵. No existen síntomas específicos ni características clínicas que indiquen la presencia de displasia cervical, razón por la cual métodos de tamizaje como la citología cérvico-uterina han permitido la identificación oportuna de lesiones potencialmente malignas, mediante un examen microscópico de las células cervicales denominado prueba de Papanicolau. Sin embargo, el diagnóstico final de NIC se establece mediante un examen histopatológico de biopsia cervical. Este procedimiento permite determinar la presencia y grado de la neoplasia en función de la diferenciación, maduración y estratificación celular^{135,136}. Actualmente el sistema Bethesda, nomenclatura histopatológica propuesta en 1.988 por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos incorpora nuevos conceptos citológicos para unificar la terminología empleada en el diagnóstico final de NIC¹³⁷. Este sistema propone la utilización del término de Lesiones Escamosas Intraepiteliales (LEI) con dos grados: LEI de bajo grado (LEI-BG) y LEI de alto grado (LEI-AG). Esta clasificación ubica a NIC 1 en la categoría LEI-BG; mientras la categoría LEI-AG abarca NIC 2 y NIC 3¹³⁷.

Con relación a la prevención primaria del CC, hay actualmente tres vacunas comerciales que brindan protección en contra del VPH: Cervarix, Gardasil_4 y Gardasil_9^{119,120,122}. Estas vacunas protegen contra los genotipos VPH 16 y 18 responsables del 70% de los CC. Además, la vacuna Gardasil_4 protege contra los genotipos de VPH 6 y 11. Igualmente, la vacuna Gardasil_9 ayuda a prevenir la infección por los cuatro genotipos del VPH previamente mencionados más otros cinco VPH-AR: VPH 31, 33, 45, 52 y 58, los cuales son los responsables de un 20% adicional de CC¹¹⁹ por lo que se sugiere que la vacuna Gardasil 9 podría evitar un 90% de los CC. En Colombia, desde el 2.012 el Ministerio de Salud y Protección Social en equipo con los Programas Ampliados de Inmunización (PAI) de las secretarías de salud municipales empezaron a implementar la vacunación gratuita contra VPH con la vacuna Gardasil_4 en niñas escolarizadas de sexto a once grado y no escolarizadas entre los 9 a 17 años con un esquema de vacunación de 0 y 6 meses^{138,139}. En el 2.014 el Ministerio de Salud y Protección social de Colombia presentó una nueva guía de práctica clínica para la prevención secundaria del CC mediante la detección y manejo de lesiones potencialmente malignas de cuello uterino con algoritmos que se aplican según la edad de la paciente¹⁴⁰. Para mujeres de 30 años o más, el algoritmo propone un tamizaje primario con prueba ADN-VPH (Figura 7), si la prueba tiene un resultado negativo, la mujer deberá repetir esta prueba transcurridos 5 años. Por otro lado, si la prueba ADN-VPH es positiva, la mujer deberá realizarse la prueba de citología. A continuación, si la

prueba citológica tiene resultado anormal, a la paciente se le debe realizar una prueba colposcópica, y según el hallazgo histopatológica, se le debe dar manejo clínico. En el caso contrario, si el resultado de la citología es negativo, la mujer deberá hacerse el tamizaje con prueba ADN-VPH transcurridos 18 meses, tiempo suficiente para saber si el sistema inmune pudo resolver la infección por VPH en la región cervical y eliminarlo o en caso contrario que la infección persista, en este caso, a la paciente se le debe realizar la prueba colposcópica sin necesidad de citología previa (Figura 7). Para mujeres entre 25 a 30 años de edad, el algoritmo propone una citología cérvico-uterina anual como principal estrategia de tamizaje primario. Si se encuentra alguna anormalidad celular, la paciente deberá realizarse la prueba de ADN-VPH, y seguir la guía propuesta dependiendo de los resultados. Para mujeres menores de 25 años se propone una prueba citológica anual, 3 años después del inicio de su vida sexual o bajo criterio medico en población en riesgo.

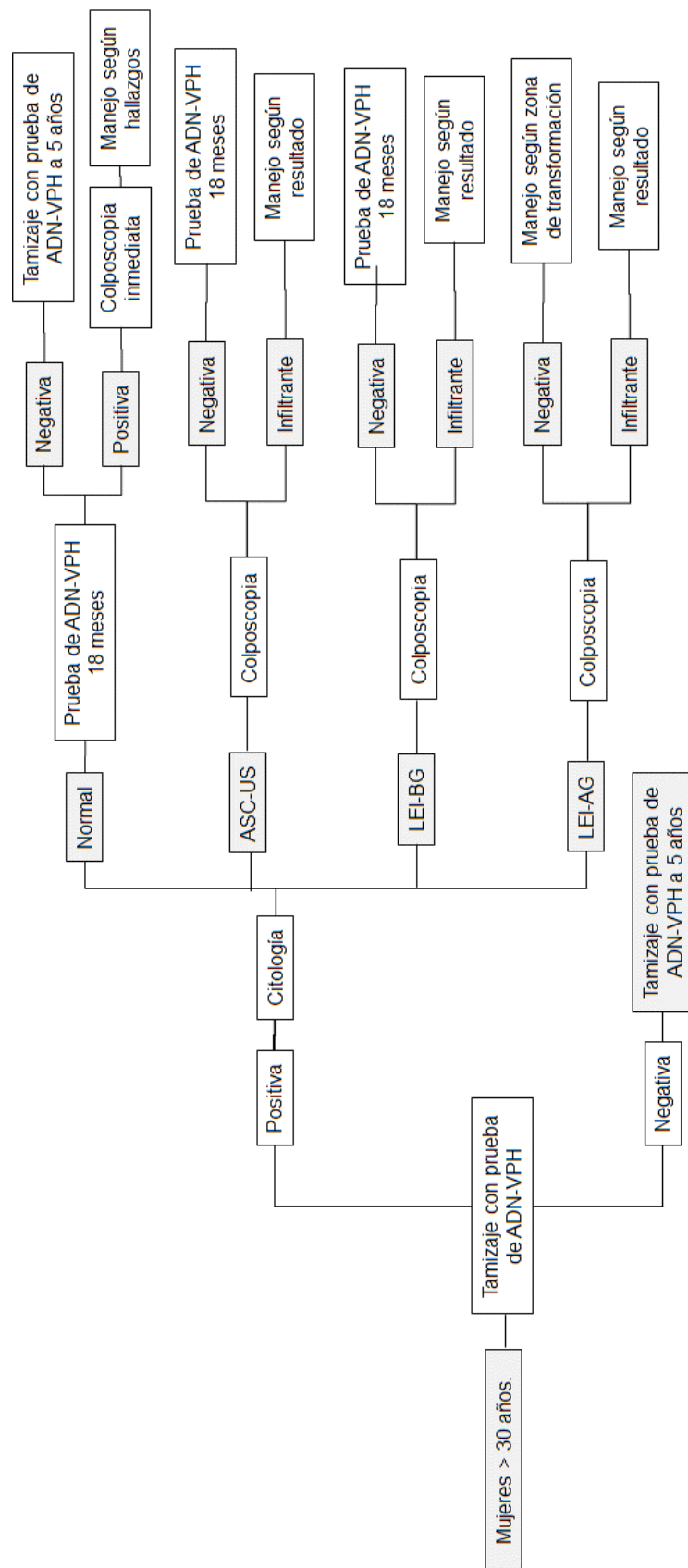


Figura 7. Pasos para tamizaje y diagnóstico de lesiones precancerosas de cuello uterino en mujeres de 30 años o más, según la nueva Guía Práctica del Ministerio de Salud y Protección Social.
Modificado de: Colombia Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de Práctica Clínica Para La Detección y Manejo de Lesiones. Colombia; 2014.

REVISIÓN Y RACIONALIZACIÓN DE LOS CAPÍTULO DE LA TESIS

Como se ha mencionado, los capítulos de esta tesis, abordan diferentes aspectos de la exposición al VPH por parte de población femenina colombiana mediante una serie de estudios de tipo transversal. Permitiéndonos un acercamiento a la dinámica de detección de este patógeno en diferentes tipos de muestras biológicas y diferentes edades.

La figura 8 muestra un esquema general que representa los diferentes objetivos de esta tesis y expone los vacíos en el conocimiento actual que se investigan en el presente trabajo abordándose de forma secuencial a partir del capítulo 2. El presente capítulo como se observa brinda las bases conceptuales que sustentan este trabajo, así como una breve introducción de los capítulos subsiguientes.

El capítulo 2 aborda la transmisión vertical del VPH mediante el análisis molecular de muestras de origen materno (placenta y sangre) y fetal (sangre y células endoteliales de cordón umbilical). El material biológico analizado perteneció a 300 mujeres primigestantes aparentemente sanas entre los 16 a 31 años de edad, de la ciudad de Cali, Colombia. Estas muestras hacían parte del bio-banco del grupo de Nutrición de la Universidad del Valle, y provenían de un proyecto anterior titulado "Efecto del Ejercicio Físico y de la Complementación con micronutrientes sobre factores maternos y placentarios asociados a la programación fetal de enfermedades crónicas no transmisibles" (Código 1106-459-21540), ejecutado entre los años 2.010 a 2.012.

Con el fin de optimizar los recursos y muestras biológicas recolectadas, se plantea este proyecto, con base en la evidencia científica que sugiere un mecanismo de transmisión no sexual del VPH. La transmisión intrauterina específicamente, definida como el acceso del VPH al feto a través de micro lesiones en las membranas fetales o por vía transplacentaria, ha sido reportada con antelación en diferentes países alrededor del mundo y publicando frecuencias de este tipo de transmisión entre el 0 al 20% de los casos estudiados. No obstante, en nuestro país hasta la fecha no ha sido publicado un estudio semejante.

La evaluación de este tipo de transmisión cobra importancia teniendo en cuenta la alta prevalencia de infección cérvico-genital por VPH en población femenina en edad reproductiva y el poder carcinogénico de ciertos genotipos virales, así como su capacidad de establecer infecciones

persistentes y latentes por largos periodos de tiempo. El conocimiento de cuan a menudo se presenta este tipo de transmisión podría impactar las estrategias de vacunación actuales y el manejo clínico de mujeres infectadas en condición de embarazo. Toda vez que si bien la asociación entre la detección de VPH en diferentes tipos de muestras biológicas relacionadas con el proceso de gestación y efectos adversos del embarazo no ha sido consistente, una infección por genotipos oncogénicos en etapas tempranas de la vida podría traer consecuencias a largo plazo como el desarrollo de cánceres relacionados con este virus y afectar la efectividad de la vacunación profiláctica, actualmente suministrada a niñas a partir de los 9 años, debido a su establecida baja eficacia en individuos previamente infectados.

En el capítulo 3 se estudia de forma exploratoria otra vía de transmisión no sexual, la transmisión horizontal, que se presentan por contacto directo con individuos infectados mediante hetero inoculación o a través de fómites, entre un grupo de madres incluidas en el estudio "Efecto del Ejercicio Físico y de la Complementación con micronutrientes sobre factores maternos y placentarios asociados a la programación fetal de enfermedades crónicas no transmisibles", y sus bebés de aproximadamente dos años de edad. Adicionalmente, se aborda la detección de VPH en mucosa oral en mujeres entre los 18 a 30 años de edad y en niños menores de 2 años. Este abordaje podría llevar al replanteamiento de las estrategias de vacunación actuales teniendo en cuenta que éstas están orientadas a iniciar el esquema de vacunación a una edad previa al inicio de las relaciones sexuales, sin tener en cuenta exposiciones previas a causa de las vías de transmisión no sexual. Así mismo explorar la presencia de VPH en cavidad oral, una localización donde cada día incrementa la evidencia de carcinogenicidad del VPH, en población aparentemente sana brindaría una línea base para futuros estudios de efectividad de la vacuna sobre la presencia de VPH en cavidad oral.

El capítulo 4, indaga sobre la tasa de detección de VPH-16 en cavidad oral de adolescentes escolarizadas vacunadas y no vacunadas entre los 14 a 17 años de edad. Este estudio aporta evidencia regional sobre la efectividad de la vacuna en la detección de VPH en mucosa oral, así como su asociación con covariables como la edad y actividad sexual.

El capítulo 5, se trata de un estudio exploratorio a cerca de asociaciones estadísticas entre lesiones precancerosas de cérvix y genotipos de VPH identificados en un grupo de mujeres diagnosticadas de acuerdo a la Guía de Práctica Clínica para la detección y manejo oportuno del cáncer de cuello uterino del Ministerio de Salud y Protección Social, ultima estrategia del gobierno nacional en pro de la reducción de la morbi-mortalidad asociada al cáncer cervical. Con este estudio se pretende abordar la frecuencia de detección de diferentes genotipos de VPH en la ciudad de Cali en mujeres no vacunadas, con el fin de brindar una base para el estudio posterior de la efectividad de los programas de vacunación y detección temprana de cáncer cervical. Adicionalmente, se explora el impacto que tendría la vacunación contra el VPH con la vacuna cuadrivalente; y la vacuna nonavalente recientemente desarrollada y para la que aún no se han publicado ensayos clínicos a gran escala en nuestro país.

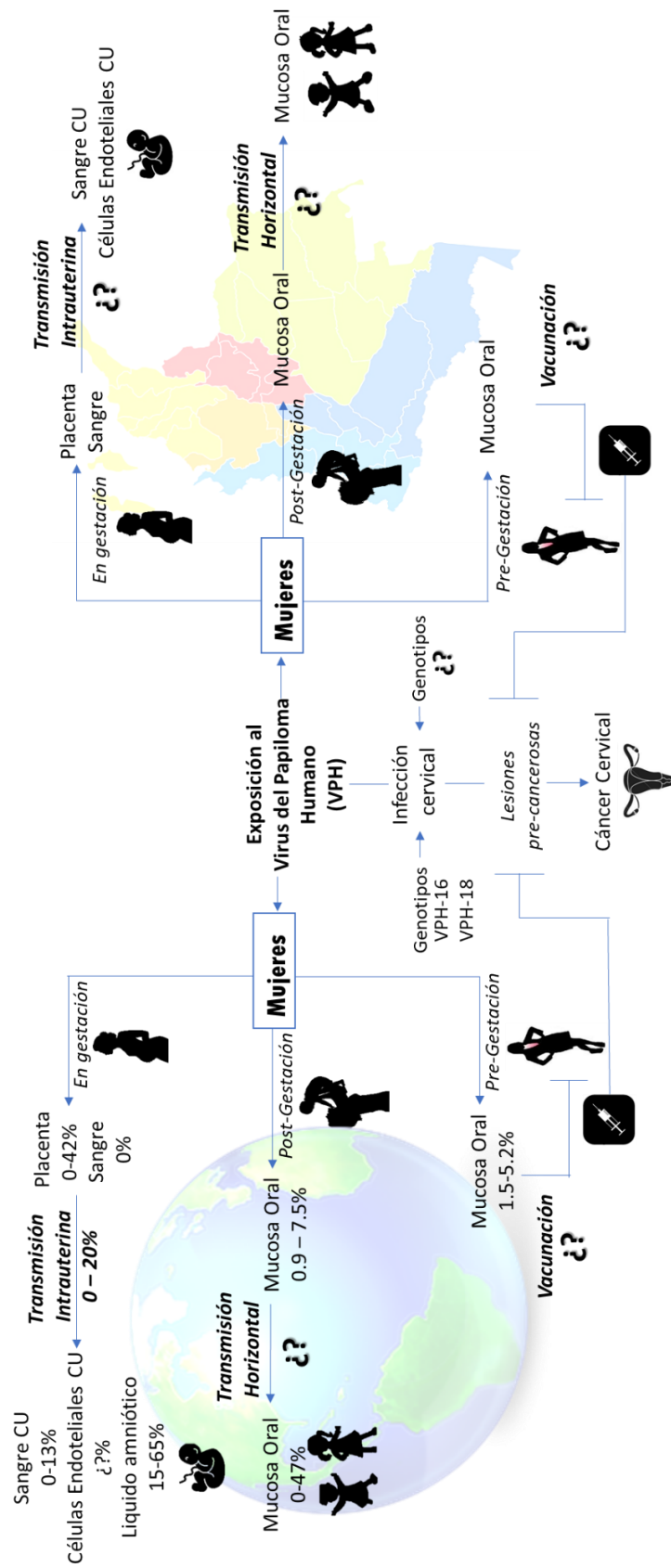


Figura 8. Visión general de la tesis doctoral.

APROXIMACIÓN METODOLÓGICA

Las preguntas de investigación de los capítulos subsiguientes fueron abordadas a partir de la implementación de diferentes técnicas de biología molecular que permitieron la detección y genotipificación inequívoca del VPH en las muestras analizadas. A continuación, se expone una revisión de los métodos utilizados.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR permite la amplificación in vitro de una región específica del ADN más de un billón de veces facilitando su detección.

Esta técnica requiere de 4 componentes fundamentales; nucleótidos trifosfato, que sirven como bloques de construcción de las nuevas hebras de ADN; los cebadores, encargados de flanquear la región génica a amplificar, la muestra y una enzima encargada de la síntesis. La Taq polimerasa, extraída de la bacteria termófila, *Thermus aquaticus*, gracias a su habilidad de tener una alta actividad catalítica a altas temperaturas facilita este proceso¹⁴¹.

Esta técnica consta de ciclos de tres pasos consecutivos que requieren de condiciones específicas de temperatura. El primer paso es el calentamiento a 90°C, lo que permite la separación de la doble hélice de ADN, en el segundo paso la temperatura baja (alrededor de los 50°C), para permitir la hibridación de los cebadores con el ADN molde; y por último la temperatura sube hasta aproximadamente los 72°C, permitiendo la elongación de la cadena, como lo muestra la figura 9^{141,142}.

La repetición de estos tres pasos resulta en el doblaje del número copias de ADN por cada ciclo (2^n , donde n es el número de ciclos). Esta reacción enzimática, sigue un patrón exponencial alcanzando una fase de platea alrededor de los 30-40 ciclos, cuando los sustratos de la reacción se han agotado y no son generados más productos. Dada esta enorme capacidad de amplificación, esta técnica permite la detección del ADN de incluso una sola célula¹⁴¹.

El ADN amplificado puede ser visualizado posteriormente mediante una electroforesis de ácidos nucleicos, donde mediante el uso de agentes intercalantes fluorescentes que se unen al ADN de doble cadena (dsADN) y un campo eléctrico, se lleva a cabo la separación por tamaño de los

productos de amplificación en una matriz porosa. Los productos de PCR se observan en forma de bandas brillantes bajo luz UV. De esta forma el resultado de una PCR es meramente cualitativo¹⁴¹.

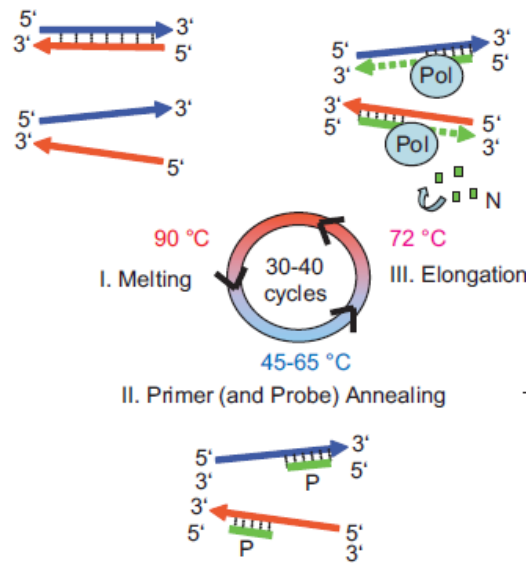


Figura 9. Representación esquemática de la técnica de PCR.

Tomada de: Ishmael FT, Stellato C. Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2008;101(4):437-443.

PCR anidada

Este tipo de PCR es empleada cuando se quiere incrementar la sensibilidad y especificidad de la reacción. Usualmente, la PCR anidada involucra dos amplificaciones secuenciales usando diferentes pares de cebadores. En este caso, el producto de la primera amplificación es utilizado como molde para la segunda PCR. El principio de la reacción de amplificación y los componentes son los mismos a los descritos anteriormente para una PCR convencional¹⁴³.

La detección de VPH mediante PCR generalmente implica el uso de cebadores de amplio espectro que reconocen una región homóloga conservada entre genotipos cuya secuencia completa ha sido caracterizada. Las parejas de cebadores más utilizadas para la detección de VPH en muestras clínicas son MY09/11 y Gp5+/6+, los cuales reconocen una región conservada del gen L1 de una gran variedad de genotipos con varios niveles de sensibilidad^{144,145}.

La pareja de cebadores MY09/11 es sintetizada con varios nucleótidos degenerados, resultando en una mezcla de 25 secuencias únicas de oligonucleótidos. La pareja Gp5+/6+, posee una secuencia fija de nucleótidos que detecta un amplio rango de tipos de VPH utilizando una baja temperatura de alineamiento durante la PCR¹⁴⁴.

El empleo de MY09/11 y Gp5+/6+, en una PCR anidada ha mostrado incrementar de forma sustancial la sensibilidad en comparación a su uso individual, permitiendo la detección de un bajo número de copias^{146,147,148}.

Como se observa en la figura 10, la pareja de cebadores MY09/11, se emplean en una primera PCR como cebadores externos, los cebadores Gp5+/Gp6+ son utilizados en la segunda PCR como cebadores internos¹⁴⁹.

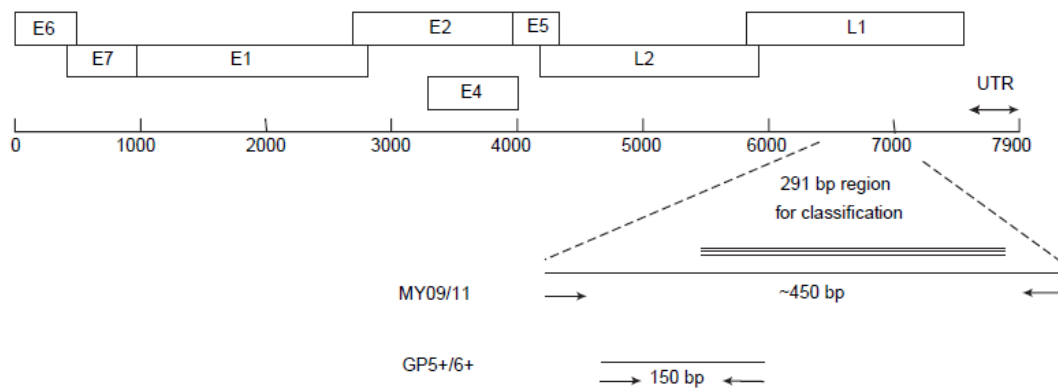


Figura 10. Región de reconocimiento de los cebadores MY09/11 y Gp5+/Gp6+.

Modificada de: van Doorn L-J, Kleter B, Quint W. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn.* 2001;1(4):394-402.

Después de la amplificación con cebadores generales, son necesarias técnicas adicionales para identificar los genotipos de VPH detectados en las muestras positivas. Estas incluyen secuenciación directa, métodos de hibridación inversa, entre otros¹⁴⁹.

Tecnología Luminex xMap

La tecnología Luminex xMap es un método rápido y costo-efectivo que permite la detección simultánea de una gran variedad de microorganismos mediante la identificación de antígenos o fragmentos de ADN¹⁵⁰.

Esta tecnología incorpora el uso de micro esferas de poliestireno teñidas con relaciones precisas de dos fluorocromos de espectro distintos. Cada esfera puede ser recubierta por diferentes tipos de moléculas y puede ser distinguida de forma espectral, permitiendo la realización de hasta 100 análisis de forma simultánea. Un tercer fluorocromo acoplado a una molécula reportera, permite por otro lado detectar la interacción molecular que haya tenido lugar en la superficie de la microesfera^{150,151}. Posteriormente, cada microesfera es inspeccionada individualmente en un flujo continuo mediante dos láser separados en el analizador Luminex®, como se muestra en la figura 11. La señal generada, permite la clasificación las microesferas con base en el espectro y cuantifica la reacción sobre su superficie^{150,151}.

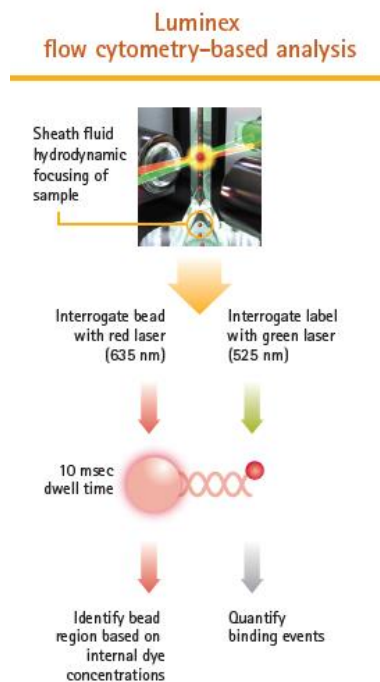


Figura 11. Tecnología Limunex xMap

Tomado de: www.merckmillipore.com/luminex. Fecha de consulta: Marzo 2019.

Con este método, el ADN del VPH y el control interno, β -globina, son amplificados empleando cebadores tipo-específicos por medio de una PCR multiplex. Posteriormente, los productos de PCR son detectados mediante su unión (hibridación) con sondas de oligonucleótidos con secuencias complementarias, adheridas a microesferas con una referencia espectral específica. El ADN de VPH que ha hibridado en la superficie de las microesferas es reconocido mediante el marcaje con Estrectavidina y R-Ficoeritrina (SAPE)¹⁵¹.

LINEAMIENTO DEL PLANTEAMIENTO DE CADA CAPÍTULO

Los capítulos descritos de esta tesis doctoral se plantean de este modo dado que el abordaje de cada subtema surge de proyectos de investigación independientes.

Se inicia con el proyecto de investigación “INFECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PLACENTA Y SU TRANSMISIÓN AL RECIÉN NACIDO” aprobado para financiación por la convocatoria de Colciencias de año 2012. Esta investigación, permite aprovechar las muestras biológicas almacenadas en el biobanco de grupo de Nutrición recolectadas gracias un proyecto anterior.

En el año 2014 es aprobado para financiación por convocatoria interna Univalle el proyecto “DETECCION DEL VPH EN MUCOSA ORAL DE NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS Y SUS MADRES”. Esta investigación implicaba rastrear nuevamente un grupo de mujeres participantes del proyecto “Efecto del Ejercicio Físico y de la Complementación con micronutrientes sobre factores maternos y placentarios asociados a la programación fetal de enfermedades crónicas no transmisibles”, de quienes se tomaron las muestras analizadas en el capítulo 2. Se logró la recaptura de 78 mujeres y sus hijos, ahora con una edad aproximada de 2 años de edad.

Posteriormente en el año 2015 se aprueba para financiación el proyecto “EFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA EL VPH EN LA FRECUENCIA RELATIVA DE SU DETECCIÓN EN CAVIDAD ORAL DE NIÑAS Y ADOLESCENTES ENTRE 14 A 17 AÑOS DE LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA” por

convocatoria Colciencias. Este proyecto implica la recolección de muestras de 1.034 adolescentes vacunadas y no vacunadas de diferentes instituciones educativas de la ciudad de Cali.

Por último, el capítulo 5, surge a partir de una asesoría científica al laboratorio de patología cervical de la Red de Salud Ladera E.S.E. y al Laboratorio de Diagnóstico Molecular – DIMOL y un interés común de analizar la dinámica del VPH en la región.

CAPÍTULO II

TRANSMISIÓN INTRAUTERINA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de transmisión intrauterina del VPH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar la frecuencia relativa de VPH en muestras de placenta, sangre periférica materna, células endoteliales de cordón umbilical y sangre de cordón umbilical.
2. Identificar los genotipos del VPH presentes en muestras de placenta, sangre periférica materna, células endoteliales de cordón umbilical y sangre de cordón umbilical.
3. Estimar la concordancia tipo-específica entre los genotipos de VPH identificados en muestras de origen materno y fetal.
4. Evaluar la asociación entre la presencia del VPH con características sociodemográficas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y Muestra

En este estudio fueron analizadas 551 muestras obtenidas de mujeres primigestantes (278 de tejido placentario y 273 de sangre periférica) y 519 muestras obtenidas de sus recién nacidos (283 muestras de células endoteliales de cordón umbilical y 235 de sangre de cordón umbilical). Estas muestras fueron recolectadas durante el estudio financiado por Colciencias, Univalle y FES, titulado: "Efecto del Ejercicio Físico y de la Complementación con Micronutrientes sobre Factores Maternos

y Placentarios Asociados a la Programación Fetal de Enfermedades Crónicas no Transmisibles", (Código 1106-459-21540), y se encontraban almacenadas en el biobanco del grupo de Nutrición de la Universidad del Valle.

Los criterios de inclusión y de exclusión de participantes del estudio en mención fueron:

Criterios de Inclusión

- Primigestante entre 16 a 30 años de edad.
- Con edad gestacional entre 16 a 20 semanas.
- Sin malformaciones severas detectables en el ultrasonido.
- Que asista al control prenatal institucional según régimen subsidiado o contributivo.
- Gestantes con la disposición de participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.

Criterios de Exclusión

Contraindicaciones obstétricas o médicas según los conceptos del American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) 2.003, o el American College of Sports Medicine (ACSM) 2.000 que incluyen:

- Gestantes con cirugía o trauma mayor en el último año
- Hb < 10 gr/dl
- Ruptura de membranas
- Diagnóstico previo de diabetes o hipotiroidismo
- Diagnóstico de cáncer
- Diagnóstico de Incompetencia Cervical
- Antecedentes de 2 o más abortos espontáneos
- Embarazo Múltiple
- Hemorragia vaginal, Placenta previa o Amenaza de Aborto
- Diagnóstico de EPOC, Asma o Bronquitis
- Diagnóstico previo de VIH
- Antígeno de superficie de hepatitis B positivo
- Antecedente de problemas renales

- Enfermedad osteomuscular
- Enfermedad Cardiovascular
- Diagnóstico de Hipertensión arterial crónica y que consuma antihipertensivos
- Polihidramnios u Oligohidramnios.

Extracción de ADN y verificación de su calidad

El ADN de las muestras fue extraído empleando el kit Dneasy Blood and Tissue (QIAGEN, Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante. El análisis de pureza del ADN extraído fue realizado por espectrofotometría, empleando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

La calidad del ADN fue verificada mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 110 pb del gen humano β -globina, empleando los cebadores PCO3: 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'; y PCO4: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l con 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M de ambos cebadores, y 0,5U de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer).

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificación de 95°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 2 min, con una extensión final por 5 min a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de etidio.

Fueron consideradas muestras positivas aquellas en donde se visualizó bajo luz ultravioleta una banda de 110 pb.

Detección del VPH y genotipificación

La detección general de ADN del VPH se realizó mediante la amplificación anidada de un fragmento del gen L1, utilizando como cebadores externos la pareja MY09/11 (MY11: 5'- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' y MY09: 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3') y como cebadores internos la pareja GP5+/GP6+ (GP5+: 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3' y GP6+: 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'). La primera reacción se realizó en un volumen final de 25 μ l con 0,2mM de dNTPs, 0,35 μ M de cada cebador, 1 μ l de ADN blanco (100ng) y 0,5 unidades de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer). Los ciclos de amplificación fueron de 5 min a 95 °C seguido por 35 ciclos de 1 min a 95°C seg,

1 min a 55°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C. Finalizado en primer ciclo de amplificación, la segunda reacción era montada en un volumen final de 25 uL con 0,2 mM de dNTPs, 0,35 de cada primer, 0,5 U de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer), y 1 ul del producto de amplificación de la primera reacción. Las condiciones de amplificación fueron 5 min a 95 °C seguido, por 35 ciclos de 1 min a 95°C seg, 2 min a 40°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% usando la tinción bromuro de etidio, bajo luz UV. Fueron consideradas muestras positivas para VPH, aquellas donde se observó una banda de ~150pb.

Como control positivo fue utilizado el ADN extraído de la línea celular HeLa, positiva para VPH 18, y como control negativo fue empleada una alícuota de agua estéril.

Posteriormente, las muestras positivas para VPH fueron enviadas a la IARC para su genotipificación empleando la tecnología Luminex xMap. Brevemente, cada muestra fue previamente amplificada por PCR empleando nuevamente la pareja de cebadores GP5+/GP6+ y posteriormente introducidas al equipo Luminex 200™ donde hibridaron con sondas de 22 genotipos de VPH-AR y VPH-BR oncológico: VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 72, y 82.

Análisis estadístico

A las variables de estudio se les evaluó su distribución. Se elaboraron tablas de frecuencias para las variables categóricas, y se calcularon medidas de tendencia central para las variables continua (medias y desviación estándar, y mediana y su rango). La comparación de proporciones por grupos se llevó a cabo usando la prueba exacta de Fisher, mientras para la diferencia por grupos en variables continuas se usó la prueba t de Student. Los grupos de comparación fueron las muestras positivas y negativas para detección de VPH; las variables categóricas fueron la vía de finalización de parto, vaginal y cesárea; y las variables continuas fueron, la edad gestacional al momento del parto y el peso al nacer. Se consideraron estadísticamente significativos solo los hallazgos con valores de P menores a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA14 (Copyright 1985-2015 StataCorp LP).

RESULTADOS

En la tabla 3 se observan las características sociodemográficas de las 301 mujeres participantes. La edad media fue de 20,2 años de edad. En su mayoría se autodenominaron de etnia mestiza, todas ellas tenían algún grado de educación formal, y más del 60% convivían en unión libre. Adicionalmente, más del 90% manifestaron no consumir ningún tipo de sustancia psicoactiva.

Tabla 3. Características sociodemográficas de las mujeres participantes.

Variables		
Edad (años)	Media (DS)	20,2 (3,3)
	Mediana (RIQ)	19 (4)
Etnia	Mestiza (%)	275 (91,4)
	Indígena (%)	6 (2)
	Negra (%)	20 (6,6)
Escolaridad	Ninguna (%)	-
	Primaria (%)	16 (5,3)
	Secundaria (%)	273 (90,7)
	Bachillerato (%)	12 (4)
Estado civil	Casada (%)	17 (5,7)
	Unión Libre (%)	190 (63,1)
	Soltera (%)	94 (31,2)
	Separada (%)	-
Consumo de Tabaco*	Si (%)	2 (0,7)
	No (%)	296 (99,3)
Consumo del Alcohol **	Si (%)	2 (0,7)
	No (%)	297 (99,3)
Consumo de Drogas	Si (%)	2 (0,7)
	No (%)	299 (99,3)

DS, Desviación estándar; RIQ, Rango intercuartílico.

* Datos faltantes = 3

** Datos faltantes = 2

La tabla 4 muestra los resultados de la detección de VPH en las 1.075 muestras analizadas. De las 281 muestras de tejido placentario, tres de ellas resultaron positivas, para un porcentaje de

detección del 1,1%. De las 286 muestras de células endoteliales de cordón umbilical, 2 de ellas resultaron positivas, para un porcentaje de detección del 0,7%. Las muestras de sangre tanto materna, como de cordón umbilical fueron todas negativas para la presencia de ADN de VPH.

Los genotipos identificados fueron los VPH 6, 16, 52, 56 y 66 en placenta, y VPH 6 y 56 en células endoteliales de cordón. En su mayoría se trataron de infecciones únicas, a excepción de una muestra de placenta que presentó una infección múltiple con cuatro genotipos diferentes de forma simultánea, VPH 6, 16, 51, 52, 66.

En ningún caso más de una muestra procedente de la misma mujer fue positiva para VPH, razón por la cual, tampoco se encontró una concordancia genotipo-específica entre las muestras que evidenciara la transmisión intrauterina del VPH.

Tabla 4. Resultados de la detección de VPH en muestras de origen materno y fetal.

Muestras Analizadas				
	Placenta n (%)	Sangre Materna n (%)	Células Endoteliales de Cordón n (%)	Sangre de Cordón Umbilical n (%)
Negativas	278 (98,9)	273 (100)	284 (99,3)	235 (100)
Positivas	3 (1,1) *	-	2 (0,7) **	-
Total	281	273	286	235

* Genotipos de VPH identificados: VPH 56/ VPH 6,16,51,52,66/ VPH 66

** Genotipos de VPH identificados: VPH 6 / VPH 66

Las características como la vía de parto, la edad gestacional al momento del parto y el peso al nacer del neonato, respecto a los resultados de detección de VPH se muestran en la tabla 5. En ella se evidencia como las muestras positivas provinieron en su mayoría de parto vaginal, a excepción de una muestra de placenta proveniente de un parto por cesárea.

En cuanto al número de semanas de gestación al momento del parto y el peso de los recién nacido, no se evidencia diferencias significativas entre los grupos analizados, aunque las muestras de ADN

de células endoteliales de cordón umbilical positivas para VPH, en comparación con las muestras negativas, se presentaron con mayor frecuencia en partos tempranos y recién nacidos con menores pesos.

Tabla 5. Características del parto de las mujeres participantes.

VPH	Placenta		Células Endoteliales de Cordón	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Vía de Parto				
Vaginal n (%)	2 (0,95)	208 (99,05)	2 (0,94)	210 (99,06)
Cesárea n (%)	1 (1,49)	66 (98,51)	-	70 (100)
Edad Gestacional al Parto (media $\pm$ DS)				
	39 $\pm$ 1	38,8 $\pm$ 3,2	36,5 $\pm$ 2,1	39 $\pm$ 3,2
Peso al nacer	2.980 $\pm$ 225,4	3.146 $\pm$ 440,3	2.850 $\pm$ 495	3.152 $\pm$ 451,3

DISCUSIÓN

EL VPH, reconocido agente causal del cáncer de cérvix, y otros tipos de cáncer como el de vulva, vagina, ano y orofaringe⁴, es transmitido de persona a persona principalmente mediante el contacto sexual, no obstante evidencia creciente soporta la existencia de vías alternas de transmisión, entre ellas, la transmisión vertical, de madre a hijo^{48,86}.

En el presente estudio, fueron analizadas 1.075 muestras de origen materno-fetal en busca de evidencia de una ruta de transmisión intrauterina del VPH, no obstante, los resultados obtenidos no indicaron su ocurrencia en el grupo de mujeres gestantes analizadas, toda vez que no se encontró una concordancia genotipo-específica entre las muestras positivas de las madres y sus hijos.

Al respecto, la literatura muestra resultados incongruentes con tasas de transmisión vertical que van desde 0 a 20%, como lo demuestra el meta-análisis publicado por Merckx y col²⁷. Lo anterior,

podría estar relacionado con las características de las poblaciones estudiadas y las muestras analizadas; de esta forma, mayores prevalencias suelen asociarse a pequeños grupos poblacionales y el análisis de muestras neonatales inmediatamente después del parto (mucosa ora/aspirado nasofaríngeo) cuyos resultados positivos podrían estar deberse a la contaminación de las muestras biológicas tras su paso por el canal vaginal contaminado de la madre.

Por otro parte, es importante resaltar la detección e identificación de genotipos de VPH en tejido placentario y de cordón umbilical. En este aspecto, hasta la fecha no ha sido reportada la presencia de VPH en células endoteliales, razón por la cual éste sería el primer hallazgo de esta naturaleza. Previas detecciones de VPH en muestras de placenta han sido publicadas por Sarkola y col., y Lee y col., quienes reportaron tasas de detección cercanas al 3%^{31,46}, lo que se aproxima a los resultados del presente estudio (1,1%). Otros investigadores como el de Rombaldi y col., han publicado tasas de detección mucho mayores, superiores al 20%¹⁵². En referencia a las muestras de sangre materna y de cordón umbilical, los resultados concuerda con algunos estudios previos que también han reportado porcentajes de detección del 0%⁵¹, aunque algunos otros muestra resultados desiguales³¹. En este aspecto, se observa igualmente una gran heterogeneidad en los reportes previos, la cual podría estar relacionada con diferentes aspectos del diseño experimental como se mencionó anteriormente. No obstante, las bajas tasas de detección estarían relacionadas con la ausencia de antecedentes clínicos de lesión cervical de las gestantes analizadas, lo que podría significar la ausencia de infección cervical por VPH o la presencia de infecciones silentes caracterizadas por bajas cargas virales y ausencia de manifestaciones clínicas. De esta forma la ausencia de un foco de infección o una infección latente, explicaría nuestros hallazgos.

Los genotipos detectados en las muestras identificadas como positivas fueron VPH-AR, poniendo en evidencia la capacidad de genotipos oncogénicos de acceder a este tipo de tejidos, y posiblemente al bebé en gestación. No obstante, este estudio no permite esclarecer el origen de esta exposición, la cual pudo ocurrir durante el parto, tras el paso por el canal vaginal de la madre, dado que en su mayoría, las muestras positivas provenían de partos naturales. En una muestra, por el contrario, la vía de parto fue la cesárea, lo que sugiere la posibilidad de vía alterna de exposición, como la intrauterina, sin embargo, son necesarios estudios adicionales que permitan confirmar esta afirmación.

Por otro lado, también se desconoce si estas detecciones del genoma viral corresponden realmente a infecciones productivas en estos tejidos, que pudiese afectar el funcionamiento normal de las células o si simplemente se trata de una contaminación de los mismos por condiciones propias del parto o del periodo postnatal. Así mismo, las implicaciones de una posible infección viral son también desconocidas aunque una variedad de estudios han reportado asociaciones entre la detección del genoma viral de tejidos propios del embarazo, como la placenta, con partos pretérmino, e incluso abortos espontáneos^{57,58,153}. Nuestros resultados por el contrario no apoyan estos hallazgos ya que tanto los partos como la salud de los neonatos con muestras positivas de placenta o células endoteliales de cordón umbilical no sufrieron ningún tipo de complicación, lo que también concuerda con estudios previos^{35,70,71}. Así mismo, los resultados de este proyecto no muestran diferencias significativas entre la edad gestacional al momento de parto y el peso de los recién nacidos de los grupos positivos y negativos para VPH, por lo que la presencia de este virus no habría afectado el proceso de gestación que implique una anticipación de la fecha de parto o afectación del crecimiento intrauterino del bebé.

En conclusión, los resultados del presente estudio no arrojaron evidencia de transmisión intrauterina del VPH, aunque demostró la capacidad de este agente viral de acceder a este tipo de tejidos, sin embargo, no fue posible establecer la vía de exposición o si la detección del genoma de este virus representa o no una infección productiva o una mera contaminación transitoria.

LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

De acuerdo a la literatura, el presente es el primer estudio realizado en Colombia de este tipo; lo que ha permitido un abordaje diferente y poco explorado en lo relacionado a rutas de transmisión no sexuales del VPH a nivel nacional, logrando una aproximación al estudio de la transmisión intrauterina de este virus en población aparentemente sana.

Por otro lado, dado el origen de las muestras analizadas y los criterios de inclusión de las participantes del estudio que permitieron su recolección, solo fue posible constatar que todas las mujeres carecían de antecedentes de lesión cervical asociada al VPH. De forma que los resultados obtenidos provienen de mujeres gestantes sin lesión cervical aparente, sin embargo no se logró establecer la presencia de infecciones silentes durante el proceso de gestación y parto que permitiera establecer una fuente de exposición.

Estudios adicionales en grupos poblacionales representativos que impliquen el muestreo regular de cuello uterino durante el proceso de gestación permitiría establecer la presencia o no de un foco infeccioso activo como fuente de exposición que permitiera estimar la frecuencia de transmisión intrauterina de VPH en una población mejor caracterizada.

CAPÍTULO III

DETECCIÓN DEL VPH EN CAVIDAD ORAL DE MUJERES ENTRE 18 A 31 AÑOS Y SUS HIJOS MENORES DE 2 AÑOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estimar la frecuencia de transmisión horizontal del VPH de madre a hijo, en un grupo de mujeres aparentemente sanas y sus hijos menores de 2 años.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar la frecuencia relativa del VPH en la cavidad oral en un grupo de mujeres aparentemente sanas y sus hijos menores de 2 años.
2. Identificar los genotipos del VPH presentes en la cavidad oral en un grupo de mujeres aparentemente sanas y sus hijos menores de 2 años.
3. Identificar la concordancia tipo-específica entre los genotipos de VPH identificados en muestras de origen materno y de su descendencia.
4. Evaluar la asociación entre la presencia del VPH en la cavidad oral con características sociodemográficas y de comportamiento sexual en un grupo de mujeres aparentemente sanas

MATERIALES Y MÉTODOS

Captación de participantes

En la presente investigación se analizó la presencia de ADN del VPH en 76 muestras de células epiteliales de mucosa oral obtenidas de un grupo de mujeres aparentemente sanas entre los 18 a 31 años y sus hijos menores de 2 años.

Las participantes, fueron seleccionadas a conveniencia a partir de la base de datos del proyecto: "Efecto del Ejercicio Físico y de la Complementación con micronutrientes sobre factores maternos y placentarios asociados a la programación fetal de enfermedades crónicas no transmisibles", (Código 1106-459-21540).

Cada mujer seleccionada fue contactada por vía telefónica e invitada a participar en el estudio brindándole una breve información sobre el mismo. Posteriormente, en una cita asignada, se brindó personalmente a cada posible participante la información detallada del proyecto y la naturaleza de su participación. Se llevó a cabo la lectura y explicación de cada punto del consentimiento informado, y una vez comprendido; las participantes que aceptaron participar procedieron a firmarlo.

Este proyecto contó con acta de aprobación ética N° 05-013 de 2013.

Obtención de las muestras biológicas e información adicional

Luego de la firma del consentimiento informado, cada participante diligenció de forma asistida una encuesta con una serie de preguntas acerca de las características sociodemográficas, comportamiento sexual y antecedentes gineco-obstétricos. Este cuestionario también incluyó algunas preguntas sobre antecedentes de salud y convivencia de los menores, ver anexo 2.

Una vez finalizada la encuesta se procedió con la toma de las muestras biológicas. Las células del epitelio estratificado mucoso de cavidad oral fueron recolectadas utilizando un hisopo estéril de algodón mediante un frotis circular de las mejillas internas derecha e izquierda, lengua, paladar duro y blando, y encías de cada participante, madre e hijo.

Terminado el procedimiento, el hisopo se introdujo en un tubo *ependorf* con 500 ul de PBS estéril y fueron transportados en refrigeración (4°C) hasta el laboratorio de nutrición de la Universidad del Valle donde fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

Las encuestas diligenciadas y las muestras biológicas fueron posteriormente codificadas con el fin de mantener la información personal de cada participante a salvo.

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit comercial Puregene Bucal Cell Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo los protocolos del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinó por espectrofotometría (λ 260/280) empleando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) y la calidad del mismo fue evaluada mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 110 pb del gen beta-globina humano. En esta reacción de amplificación se utilizaron los cebadores PCO3: 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'; y PCO4: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'. Se realizaron 35 ciclos de amplificación a 95°C por 20 seg, 55°C por 45 seg y 75°C por 45 seg. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio. Fueron consideradas muestras positivas aquellas en donde se observó bajo luz ultravioleta una banda de 110 pb.

Detección y genotipificación del VPH

La detección de ADN del VPH se realizó mediante la técnica de PCR anidada empleando como cebadores externos la pareja MY09: 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' y MY11: 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3' y como cebadores internos la pareja GP5+: 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3' y GP6+: 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'¹⁵⁴. Ambos cebadores permiten la amplificación de un fragmento del gen L1 de un amplio espectro de genotipos.

La primera reacción de amplificación fue realizada en un volumen final de 25 ul; consistió en 0,2 mM de dNTPs; 0,35 mM de cada cebador MY09/MY11, buffer Taq 1x (100 mM tris-HCl), 1,5mM de MgCl y 0,5 unidades de Ampli Taq Gold (Perkin Elmer, USA). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 1 min a 95°C; seguido por 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min. En la segunda reacción de amplificación se

utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial de 1 min a 95°C, seguida por 35 ciclos de 95°C por 1 min, 40°C por 2 min, 72°C por 1 min, con un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de etidio bajo luz UV. Fueron consideradas como positivas, aquellas muestras en donde se visualizó una banda de ~150pb.

Como control positivo fue utilizado el ADN extraído de la línea celular HeLa, positiva para VPH-18, y como control negativo fue empleada una alícuota de agua estéril.

Posteriormente, las muestras positivas para VPH fueron enviadas a la IARC para su genotipificación empleando la tecnología Luminex xMap. Brevemente, cada muestra fue previamente amplificada por PCR empleando nuevamente la pareja de cebadores GP5+/GP6+ y posteriormente introducidas al equipo Luminex 200™ donde hibridaron con sondas de 22 genotipos de VPH-AR y VPH-BR oncológico: VPH-6, -11, -16, -18, -26, -31, -33, -35, -39, -43, -45, -51, -52, -53, -56, -58, -59, -66, -68, -70, -72, y -82.

Análisis estadístico

A las variables de estudio se les evaluó su distribución. Se elaboraron tablas de frecuencias para las variables categóricas, y se calcularon medidas de tendencia central para las variables continuas (medias y desviación estándar, y mediana y su rango). La comparación de proporciones (variables categóricas) por grupos se llevó a cabo usando el test exacto de Fisher, mientras para la diferencia por grupos en variables continuas se usó el test t de Student. Los grupos de comparación fueron las muestras positivas y negativas para la detección de VPH, las variables categóricas fueron el uso o no de condón por parte de las mujeres participantes en el estudio y las variables continuas fueron la edad de las mismas. Se consideraron estadísticamente significativos solo los hallazgos con valores de p menores a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA14 (Copyright 1985-2015 StataCorp LP).

RESULTADOS

En total, 152 muestras de ADN fueron evaluadas para la presencia del VPH, 76 pertenecían a las madres y 76 a sus hijos. Respecto a las muestras maternas, fueron positivas para el virus 5 de ellas, para una frecuencia relativa de detección del 6,6 %. En las muestras de los niños menores de dos años, solo se encontró una muestra positiva, para una frecuencia relativa de detección del 1,3 %. No se encontró una concordancia tipo-específica entre las muestras positivas de madres e hijos. En la tabla 6, se muestran los genotipos de VPH identificados. En las muestras de mucosa oral de las madres, fueron identificados los VPH 11, 43 y 72, todos ellos de bajo riesgo oncológico. En la única muestra positiva del grupo de menores, fue identificado el VPH 6, igualmente de bajo riesgo.

Tabla 6. Genotipos de VPH identificados presentes en la cavidad oral de madres e hijos participantes.

Genotipos de VPH	Muestras	Muestras
	Maternas n (%)	Hijos n (%)
VPH-6	-	1 (1,3)
VPH-11	2 (2,6)	-
VPH-43	2 (2,6)	-
VPH-72	1 (1,3)	-
Clasificación de Riesgo		
VPH-BR	5 (6,6)	1 (1,3)
VPH-AR	0 (0)	-

La única muestra de mucosa oral positiva para VPH del grupo de niños participantes pertenecía a un varón nacido por parto vaginal, sin antecedentes de lesiones verrugosas y quien se encontraba en ese momento asistiendo a una guardería cercana a su lugar de residencia. La mucosa oral de la madre de este menor, fue negativa para VPH.

En el grupo de mujeres analizadas, la detección de VPH fue significativamente mayor entre los 25 a 31 años de edad en comparación con el grupo de edad menor a 25 años, con un valor de $p < 0,05$

(Tabla 7). Adicionalmente, también se encontró una mayor detección de VPH en mujeres solteras o en unión libre, en el quintil más bajo de riqueza; no obstante, estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 7). Con respecto al nivel educativo, ninguna de las participantes con un nivel de educación superior fue positiva para el VPH. Todos los hijos de estas cinco mujeres, fueron negativos para la detección de VPH en mucosa oral.

Tabla 7. Características sociodemográficas según la detección de VPH y los genotipos identificados en mucosa oral de 76 mujeres de la ciudad Cali, Colombia.

Variable Explicativa (<i>n total</i>)	Detección del VPH		Genotipo del VPH		
	Negativo	Positivo	VPH-11	VPH-43	VPH-72
	<i>Número (%)</i>		<i>Número (%)</i>		
Grupo de Edad (*)					
18 - 24 (61)	59 (96,7)	2 (3,3)	-	2 (3,3)	-
25 - 31 (15)	12 (80,0)	3 (20,0)	2 (13,3)	-	1 (6,7)
Estado Civil					
Nunca casada/Unida (70)	65 (92,9)	5 (7,1)	2 (2,9)	2 (2,9)	1 (1,4)
Casada/Separada (6)	6 (100)	-	-	-	-
Educación					
Sin Educación/Primaria (29)	27 (93,1)	2 (6,9)	-	2 (6,9)	-
Secundaria (31)	28 (90,3)	3 (9,7)	2 (6,4)	-	1 (3,2)
Superior (16)	16 (100)	-	-	-	-
Quintil de riqueza					
Más bajo (47)	42 (89,4)	5 (106)	2 (4,3)	2 (4.26)	1 (2,1)
Bajo/Medio (29)	29 (100)	-	-	-	-
TOTAL (76)	71 (93,4)	5 (6,6)	2 (2,6)	2 (2,6)	1 (1,3)

(*) Estadísticamente significativo, valor de $p = 0,05$

En la figura 12, se muestran tres gráficos sobre algunas variables de comportamiento sexual del grupo de madres analizado, como la edad de inicio de relaciones sexuales, los métodos anticonceptivos empleados y la práctica de la citología cérvico-uterina. En ellas se evidencia, como más del 50% de la población inicia sus relaciones sexuales antes de los 18 años, prefiere el

uso de métodos anticonceptivos de tipo hormonal y el 96,1% de las mujeres se ha practicado la citología al menos una vez en la vida.

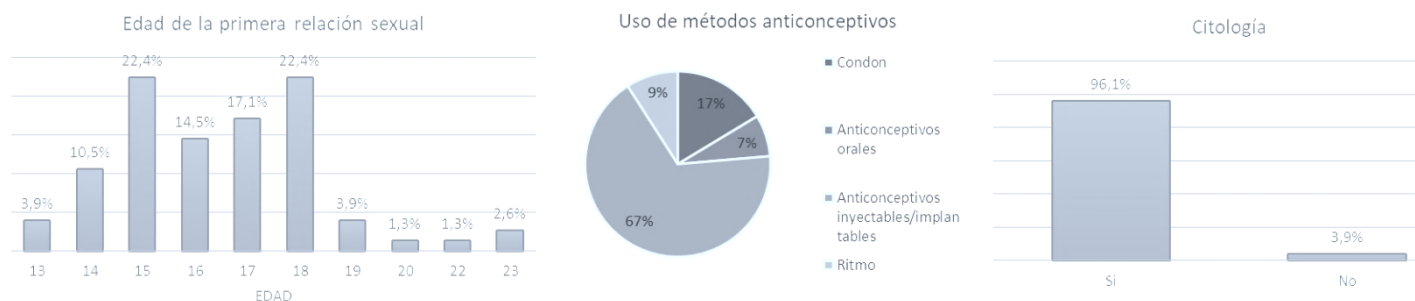


Figura 12. Características de comportamiento sexual de un grupo de mujeres aparentemente sanas entre los 18 a 31 años.

Finalmente, para el comportamiento sexual, 55 participantes señalaron tener en el momento de la encuesta una vida sexual activa y 21 participantes informaron no haber tenido relaciones sexuales en el último año. Siendo en el grupo de participantes sexualmente activas donde se detectó únicamente la presencia del VPH. Además, al analizar solo las respuestas dadas por las participantes sexualmente activas acerca del uso de preservativos de barrera como el condón, los resultados mostraron que en el grupo de mujeres que respondió no usar condón en sus relaciones sexuales, el porcentaje de detección de VPH fue mayor, para el grupo de edad entre 25 a 31 años (Tabla 8), siendo lo anterior estadísticamente significativo con un valor de $p = 0,037$. En contraste, en el grupo de mujeres que afirmaron usar condón, no se encontró diferencias significativas en la detección de VPH por grupo de edad. Adicionalmente, a las mujeres se les preguntó por: edad de la primera relación sexual; número de compañeros sexuales en los últimos seis meses; la presencia de verrugas genitales; y enfermedades de transmisión sexual. Sin embargo, ninguna de las anteriores variables de comportamiento sexual mostró diferencias significativas entre los grupos positivo y negativo para VPH.

Tabla 8. Grupos de edad y detección de VPH en mucosa oral discriminando por uso y no uso de condón entre las mujeres sexualmente activas.

Variable Explicativa (<i>n total</i>)		Detección del VPH		Valor de <i>p</i>
		Negativo	Positivo	
Número (%)				
MUJERES SEXUALMENTE ACTIVAS				
<i>No usa condón</i>				
<i>Edad</i>	18 - 24 (35)	34 (97,1)	1 (2,9)	0,037
	25 - 31 (11)	8 (72,7)	3 (27,3)	
<i>Usa condón</i>				
<i>Edad</i>	18 - 24 (8)	7 (87,5)	1 (12,5)	0,889
	25 - 31 (1)	1 (100,0)	-	
TOTAL (55)		50 (90,9)	5 (9,1)	

DISCUSIÓN

Transmisión horizontal del VPH

El VPH es considerado el agente causal necesario de cáncer de cérvix, así como otros tipos de cáncer, entre ellos un subgrupo de HNSCC, sin embargo relativamente poco se conoce a cerca de la historia natural de la infección oral por VPH y su progresión a cáncer, aunque se ha planteado que la explicación del origen de este tipo de malignidad, es una infección oral por VPH que no se resuelve, persiste y progresa a una lesión neoplásica¹⁵⁵. La transmisión sexual se ha considerado como principal ruta de contagio del VPH, no obstante, aún no se descarta la existencia de vías de transmisión alternas, entre ellas, la transmisión horizontal. De esta forma, la detección de VPH en mucosa oral de madres y sus hijos menores de dos años, así como el abordaje de una posible transmisión horizontal de este virus entre ambos, brindaría la oportunidad de evaluar no solo las tasas de detección de VPH en estos dos tipos de poblaciones, sino además estimar la posible exposición al VPH desde muy temprana edad por medio del contacto cercano con sus madres.

En este estudio, no obstante, no se logró identificar una transmisión del VPH entre la mucosa oral de madres y sus hijos menores de dos años, a pesar de si detectar material genético viral en esta región anatómica de cinco mujeres y uno de los niños participantes.

Es importante resaltar, que nuestros resultados no permiten descartar este tipo de transmisión, teniendo en cuenta no solo el número de participantes del estudio, sino adicionalmente la común convivencia de los menores con numerosos integrantes de la familia como tíos, abuelos y cuidadores, incluso por periodos de tiempo superiores a los que conviven con su madre, por circunstancias laborales, u otras.

Por otra parte, la sola detección de VPH en cavidad oral de un niño menor de dos años, pone en evidencia la exposición que tiene la población infantil desde muy temprana edad a este agente viral, como lo han reportado estudios previos como el de Smith y col., y Rintala y col., quienes encontraron tasas de detección entre el 0.8 – 13% en niños menores de 3 años^{91,156}.

En nuestro caso la tasa de detección de VPH en niños menores de 2 años fue de 1.3% (1/76), que concuerda con las publicaciones mencionadas. El genotipo detectado es esta única muestra fue VPH-6, clasificado como VPH-BR oncológico por la IARC y comúnmente aislado de mucosa oral y genital, asociado o no a lesiones verrucosas¹⁵. En este caso, si bien el único genotipo detectado es VPH-BR oncológico, consideramos altamente probable la exposición de los menores a VPH-AR, a consecuencia de la circulación de éstos en mucosa oral, manos e incluso uñas de población adulta^{95,157}, teniendo en cuenta el estrecho contacto de niños de estas edades con individuos adultos como consecuencia natural de su cuidado y atención.

Finalmente, el significado de esta exposición, así como es establecimiento de infecciones productivas o no, y su resolución por el sistema inmunológico debe ser abordado por estudios posteriores que permitan predecir las implicaciones sobre la salud de la población infantil a corto y largo plazo. Adicionalmente, estos resultados son de gran importancia en vista de las estrategias de vacunación actualmente implementadas contra el VPH, teniendo en cuenta la probable exposición a genotipos oncológicos no relacionada con el contacto sexual.

Detección de ADN del VPH en mucosa oral de mujeres aparentemente sanas de 18 a 31 años.

Uno de los resultados más interesante de este estudio exploratorio, fue la relativamente alta detección de VPH en el grupo de madres analizadas, en este caso, mujeres jóvenes entre los 18 a 31 años aparentemente sanas. La tasa de detección de VPH en mucosa oral en esta población fue del 6,6% (5/76), la que concuerda con una serie de estudios realizados a nivel mundial que reportan una detección entre el 0,9 – 7,5%⁷².

Por otro lado, nuestros resultados son un poco más elevados en comparación con estudios realizados en países latinoamericanos como Perú y Brasil, con porcentajes de detección en mujeres del 5,5% y 5,3% respectivamente^{96,98}, pero muestran aun mayor disparidad respecto a estudios realizados en otras localizaciones como Alemania y los Estados Unidos, donde se reportaron porcentajes de detección del 18,1 y 3,2% respectivamente^{95,158}.

Lo anterior podría explicarse por notables diferencias en los tamaños de muestra de los estudios mencionados, así como los grupos de edad abarcados. Los estudios latinoamericanos incluyeron entre 84 hasta 595 mujeres entre los 10 a 85 años de edad, y en los Estados Unidos se incluyeron un total de 4.641 mujeres entre los 18 a 69 años. En nuestro estudio por su parte fueron analizadas en total solo 76 muestras entre los 18 a 31 años de edad. Otro aspecto que debe tenerse en cuenta son las ya reportadas diferencias en la prevalencia de la infección por VPH en diferentes regiones geográficas, las cuales ha sido relacionadas con las conductos o comportamientos propios de cada población, específicamente aquellos relacionados con las prácticas sexuales y acceso a los sistemas de salud⁹⁴.

Estudios poblacionales al respecto que incluyan un rango más amplio de edades, así como una caracterización de las conductas sexuales, podrían confirmar estos hallazgos.

En lo que respecta a Colombia, hasta la fecha, se cuentan con un número limitado de publicaciones al respecto. En la ciudad de Cali, Mancilla y col., determinaron la presencia de material genético del VPH 16 en mucosa oral de 48 individuos entre hombres y mujeres mayores de 18 años, reportando un porcentaje de detección del 71,4% en el sexo femenino¹⁰⁰, cifra que no concuerda con nuestros resultados e incluso con publicaciones internacionales que establecen porcentajes de detección del

VPH16 entre 0-2%. La razón de esta disparidad podría radicar en el diseño del estudio o la metodología empleada para la detección viral.

Genotipos detectados en muestras de mucosa oral VPH-positivas

En las 5 muestras VPH positivas fueron identificados los genotipos del VPH 11, 43, y 72, todos ellos de bajo riesgo oncológico. Resultados que concuerdan con un estudio realizado en Brasil por Oliveira y col., quienes al analizar un número idéntico de muestras identificaron solo VPH-BR⁹⁸. Estudios adicionales realizados también en Latinoamérica han identificado además VPH-AR. Un ejemplo de ello son los estudios realizados en México y Perú donde identificaron genotipos de VPH-BR en una frecuencia aproximada del 4,5% y VPH-AR con una frecuencia entre el 1 y el 2,4%. En Estados Unidos, la encuesta NHANES identificó por su parte frecuencias similares de VPH-AR y VPH-BR (1,4% vs. 1,8%).

La razón de estas diferencias podría estar en el diseño experimental de cada estudio, número de muestras analizadas y edad de las participantes, así como la metodología empleada para la detección y genotipificación viral.

Asociación entre la presencia de ADN del VPH y variables sociodemográficas y de comportamiento sexual.

La presencia de ADN del VPH en la cavidad oral de mujeres entre 18 a 31 años se relacionó con una serie de variables sociodemográficas y de comportamiento sexual, encontrándose una diferencia significativa en la detección de VPH entre los grupos de edad, siendo ésta mayor en las mujeres entre los 25 a 30 años (20%), en comparación con mujeres entre los 18 a 24 años (3,3%). Resultado que concuerda con investigaciones poblacionales previas, que reportan un incremento gradual de la detección de VPH entre los 15 a 34 años^{93,95}.

En cuanto a las variables de escolaridad, estado civil, educación y quintil de riqueza no se encontraron diferencias significativas con respecto a la detección de VPH en cavidad oral, no obstante, fue evidente la ausencia de VPH en las mujeres con mayor nivel educativo y con niveles de riqueza superiores, lo que podría estar relacionado con un mayor acceso a servicios de salud e

información sobre su autocuidado. Análisis de grupos poblacionales mayores contribuirían con la confirmación de estos hallazgos.

En cuanto al uso de métodos anticonceptivos de barrera como el condón las mujeres sexualmente activas que afirmaron no usarlo, presentaron de forma significativa una mayor detección de VPH en mucosa oral, en comparación con mujeres que indicaron no utilizarlo condón. Lo anterior, apoya la hipótesis de que la ruta de adquisición de VPH en cavidad oral es principalmente mediante el contacto sexual, especialmente el oro-genital. Esto con base en estudios previos que han demostrado que el uso de condón está asociado a una menor presencia de esta infección viral en mujeres jóvenes sexualmente activas, debido a que éste puede impedir la infección o reinfección entre las parejas, impidiendo el contagio y acortando las duración de las mismas^{159,160}. Por otro lado, nuestros resultados también evidencian la presencia de VPH en mujeres que han afirmado usar el condón, lo que podría estar relacionado con la frecuencia y correcto uso del mismo, así como con rutas de transmisión alternas al contacto sexual como los besos profundos o incluso la auto o hetero inoculación como los sugiere Rautava y col., y entre otros autores^{19,28,80,157}.

Características de la Población Estudiada

En el año 2016 fue publicada la séptima y última versión de la Encuesta Nacional de Demografía y Salud (ENDS-2015), la cual hace parte del Sistema Nacional de Estudios y Encuestas Poblacionales para la salud y del Plan Nacional de Estadísticas (PEN), liderado por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE).

Esta encuesta ha permitido estudiar el comportamiento y los cambios en la vida reproductiva de las mujeres colombianas, convirtiéndose en un instrumento de análisis de la realidad social en el campo de la salud sexual y reproductiva, entre otros^{161,162}.

Dado que el presente estudio abarca una población de mujeres entre los 18 a 31 años, en edad reproductiva y sexualmente activas, quisimos analizar ciertos aspectos que plantea la ENDS respecto a este grupo de edad.

Uno de los aspectos importante es el comportamiento sexual, partiendo de la edad de la primera relación sexual, la cual marca el inicio de exposición a las enfermedades de transmisión sexual (ETS), como la infección por VPH, los resultados de la ENDS indican que a los 17,7 años, el 50% de las mujeres inician su vida sexual¹⁶¹, en nuestro estudio encontramos que a los 17 años aproximadamente el 70% de las mujeres habían iniciado relaciones sexuales, con lo cual podríamos decir que nuestra población de estudio en su mayoría se encontraban en riesgo de adquirir cualquier tipo ETS.

Respecto al uso de métodos anticonceptivos de barrera como el condón, que brinda protección frente estas enfermedades, la ENDS reportó un amplio conocimiento acerca del mismo (>90%) en las mujeres encuestadas, sin embargo menos del 8% de las mujeres entre 13 a 34 años lo usan actualmente, siendo los métodos anticonceptivos preferidos los de tipo hormonal (píldora, implante e inyección) que solo brindan protección frente a embarazos no deseados¹⁶¹.

En nuestro estudio el uso del condón reportado por las participantes sexualmente activas fue del 16,4%. Estos resultados si bien muestran un incremento respecto a la ENDS, probablemente debido al nivel educativo de las participantes, todas ellas con algún grado de educación formal, siguen siendo una situación poco favorable cuando uno de los objetivos del milenio para Colombia es el mejoramiento de la salud sexual de la población, así como la disminución de la prevalencia de ETS.

La ENDS-2015, adicionalmente aborda la problemática del cáncer de cuello uterino en las mujeres colombianas. Esta encuesta afirma que el 99,4% de las mujeres entre 21 a 64 años tienen conocimiento acerca de la citología cérvico-uterina, y el 94,6% afirman habérsela realizado al menos una vez en la vida, aunque solo el 66,4% se la practican anualmente. Frente al conocimiento del VPH como agente causal de cáncer de cuello uterino, el 90,3% de las mujeres encuestadas afirman tener conocimiento al respecto, aunque solo el 40,4% conocen las pruebas de diagnóstico¹⁶². Estos resultados indican que si bien la población colombiana presenta unos buenos niveles de conocimiento general respecto al VPH y las pruebas de tamizaje, el conocimiento específico así como la práctica de la citología es bajo, lo que probablemente impida que mujeres sexualmente activa, en riesgo de adquirir cualquier tipo de infección por VPH se acerquen a los centro de salud de forma oportuna y reciban la orientación o cuidado clínico necesario, lo que el ultimas podría contribuir con el incremento en las tasas de infección.

En conclusión, esta investigación de tipo exploratoria, permitió un acercamiento al conocimiento de la presencia del VPH en un grupo de muestras de cavidad oral de mujeres aparentemente sanas no vacunadas en nuestra población, información útil para la realización de estudios epidemiológicos que pretendan determinar la historia natural de este virus en cavidad oral y su asociación etiológica con HNCSS, e igualmente, para estudios que aspiren determinar el efecto de la vacunación contra la infección oral del VPH en la población femenina.

Estudios donde se evalúen grupos poblacionales mayores con características y factores de riesgo variados permitirían plantear una asociación más amplia con respecto a las características evaluadas y la presencia del ADN del VPH.

FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio al ser de tipo exploratorio, contó con un limitado número de muestras, lo que probablemente no permitió una evaluación más precisa de las variables del estudio, sin embargo, nuestros resultados permiten observar tendencias entre la presencia de VPH en cavidad oral y su asociación con diferentes variables del estudio que guardan concordancia con estudios poblacionales previos.

Adicionalmente, es importante resaltar que este es el primer estudio de este tipo que se lleva a cabo en Colombia con el objetivo, no solo de obtener evidencia de una ruta de transmisión no sexual de este virus, sino que aborde la detección de VPH en mucosa oral de estos grupos poblacionales escasamente explorados.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA EL VPH EN LA FRECUENCIA RELATIVA DE SU DETECCIÓN EN CAVIDAD ORAL DE NIÑAS Y ADOLESCENTES ENTRE 14 A 17 AÑOS DE LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la vacunación contra del VPH en la frecuencia relativa de la presencia del VPH en la cavidad oral en un grupo de niñas y adolescentes aparentemente sanas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estimar la frecuencia relativa del VPH en la cavidad oral en un grupo de mujeres aparentemente sanas vacunadas en contra del VPH *versus* un grupo control.
2. Identificar los genotipos de los VPHs presentes en la cavidad oral en un grupo de mujeres aparentemente vacunadas en contra del VPH *versus* un grupo control.
3. Estimar la asociación entre el número de dosis recibidas de la vacuna contra VPH y la presencia del VPH en la cavidad oral en un grupo de mujeres aparentemente sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y descripción de las muestras biológicas

En la presente investigación se analizó la presencia de ADN del VPH en 1.034 muestras de células de la mucosa oral obtenidas de la cavidad bucal de un grupo de niñas y adolescentes escolarizadas aparentemente sanas de la ciudad de Cali, entre los 14 a 17 años. Las muestras se habían recolectado y almacenado en un estudio previo, avalado por el Comité Institucional de Ética para la Investigación con Humanos de la facultad de salud de la Universidad del Valle, con acta de aprobación N°011-014 del 2014.

En dicho estudio, las mujeres invitadas a participar por ser menores de edad necesitaban de la aprobación de sus padres o personas responsable, los cuales debían leer y firmar un consentimiento informado, y posteriormente, la menor de edad decidía si participaba o no, mediante lectura y firma de un asentimiento informado. Posteriormente, a las mujeres que aceptaron participar, se le aplicó un cuestionario con preguntas sobre su estado de vacunación contra el VPH, el número de dosis recibidas, características sociodemográficas y de comportamiento sexual. Las muestras fueron obtenidas mediante visitas a diferentes colegios de la ciudad de Cali, donde el programa ampliado de inmunización había previamente aplicado la vacuna contra el VPH. Durante estas visitas, cada estudiante debía realizar un enjuague bucal y gárgaras con 15 ml de agua estéril por un periodo de 15 segundos cada uno, y posteriormente depositar el líquido en un recipiente igualmente estéril.

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó con el estuche comercial PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), siguiendo los protocolos del fabricante. La concentración y pureza del ADN obtenido se evaluó por espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). El grado de integridad del ADN se determinó mediante la amplificación por PCR convencional de un fragmento de 110 bp del gen beta-globina humano. Para esta reacción se utilizaron los cebadores PCO3: 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'; y PCO4: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'. La amplificación se realizó por 35 ciclos a 95°C por 20 seg, 55°C por 45 seg y 75°C por 45 seg. Los amplificados fueron visualizados mediante la técnica de electroforesis

usando un gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio. Las muestras positivas fueron consideradas aquellas en donde se observó bajo luz ultravioleta una banda de 110 pb.

Detección y genotipificación del VPH

La detección del ADN del VPH se realizó mediante la técnica de PCR. En el procedimiento se realizó la amplificación de un fragmento del gen L1 con los cebadores genéricos MY09: 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' y MY11: 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'. En el caso de las muestras negativas, se realizaba una PCR anidada con los cebadores genéricos internos, GP5+: 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3' y GP6+: 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'¹⁵⁴.

La mezcla de la primera reacción de amplificación consistió en 0,2 ng de dNTPs; 10 pmol de cada cebador MY09/MY11, Buffer Taq 1X (100 Mm tris-HCl), 1,5Mm de MgCl y 1,5 unidades de Ampli Taq Gold (PerkinElmer, USA). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 1 min a 95°C; seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min, con un paso de extensión final de 72°C por 1 min. En el caso de una segunda reacción de amplificación por PCR anidado se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial de 1 min a 95°C, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 40°C por 1 min, 72°C por 1 min, con un paso de extensión final de 72° por 1 min. Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio. Como control positivo fue utilizado el ADN extraído de la línea celular HeLa, positiva para VPH-18.

Posteriormente, a las muestras de ADN positivas para VPH se les realizó la identificación de su genotipo viral mediante secuenciación directa del fragmento del gen de L1 amplificado por el método Sanger¹⁶³, seguido de un análisis de porcentajes de identidad con el algoritmo BLASTn usando como secuencias de referencia de genotipos de VPH almacenadas en los repositorios del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=HPV>).

Análisis estadístico

A las variables de estudio se les evaluó su distribución. Se elaboraron tablas de frecuencias para las variables categóricas, y se calcularon medidas de tendencia central para las variables continuas (medias y desviación estándar, y mediana y su rango). La comparación de proporciones (variables

categorías) por grupos se llevó a cabo usando el test exacto de Fisher, mientras para la diferencia por grupos en variables continuas se usó el test t de Student. Los grupos de comparación fueron las mujeres vacunadas o no contra el VPH, las variables categóricas fueron la escolaridad, el inicio de las relaciones sexuales, el resultado de la detección de VPH, y los genotipos identificados; y las variables continuas fueron la edad. Se consideraron estadísticamente significativos solo los hallazgos con valores de p menores a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA14 (Copyright 1985-2015 StataCorp LP).

La asociación entre vacunación (variable independiente o de exposición) y detección de VPH (variable dependiente o resultado) se llevó a cabo usando Razones de Oportunidad (OR, por sus siglas en inglés) con intervalos de confianza (IC) del 95%. La variable vacunación consistió de dos grupos, uno que había sido vacunado contra el VPH y otro no vacunado (grupo de referencia). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA14 (Copyright 1985-2015 StataCorp LP).

RESULTADOS

En total, 1.034 muestras de ADN fueron evaluadas para la presencia del VPH, donde 944 procedían de mujeres vacunadas contra el VPH y 90 de mujeres no vacunadas. En la tabla 9 se observa las características sociodemográficas de los dos grupos bajo análisis, mujeres vacunadas contra el VPH y no vacunadas, en donde no se encontró diferencias estadísticamente significativas con relación a sus categorías de edad, escolaridad o inicio de relaciones sexuales. Con relación a las frecuencias relativas de la presencia del VPH por grupo, se encontró que, en el grupo de mujeres vacunadas, el virus fue detectado en 6 de las 944 muestras (0,6%) y en el grupo de mujeres no vacunadas, el virus fue detectado en 3 de las 90 muestras (3,3%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Igualmente, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la identificación y distribución de genotipos del VPH entre grupos, con el genotipo VPH 16 mostrando mayor frecuencia relativa de detección en el grupo de mujeres no vacunadas (3,3% vs 0,4 % en mujeres vacunadas). Otros genotipos virales identificados fueron el VPH 32 y VPH 66, pero solo en el grupo de mujeres vacunadas.

Tabla 9. Características sociodemográficas, comportamiento sexual y presencia del VPH en cavidad oral en un grupo de mujeres que recibieron la vacuna en contra del VPH versus un grupo de mujeres sin vacunar de la ciudad de Cali, Colombia.

Variables	Total (n =1.034)	Mujeres Vacunadas (n = 944)	Mujeres No Vacunadas (n = 90)	Valor de p
<i>número (porcentajes)</i>				
Edad (años)				0,476
14	300 (29,01)	275 (29,13)	25 (27,78)	
15	285 (27,56)	258 (26,69)	27 (30,00)	
16	280 (27,08)	252 (26,69)	28 (31,11)	
17	169 (16,34)	159 (16,84)	10 (11,11)	
Escolaridad				0,234
Secundaria Básica (De sexto a noveno)	485 (46,91)	439 (46,50)	46 (51,11)	
Educación Media (De decimo a undécimo)	549 (53,09)	505 (53,50)	44 (48,89)	
Relaciones sexuales				0,543
No ha iniciado	651 (63,27)	594 (63,26)	57 (63,33)	
Ha iniciado	378 (36,73)	345 (36,74)	35 (36,67)	
Detección de VPH				0,036
Negativo	1025 (99,13)	938 (99,36)	87 (96,67)	
Positivo	9 (0,87)	6 (0,64)	3 (3,33)	
Genotipos				0,040
Negativo	1025 (99,13)	938 (99,36)	87 (96,67)	
VPH-16	7 (0,68)	4 (0,42)	3 (3,33)	
VPH-32	1 (0,10)	1 (0,11)	-	
VPH-66	1 (0,10)	1 (0,11)	-	

En la tabla 10, se presentan las razones de oportunidad (OR) entre la detección del VPH-16 con el número de dosis recibidas de la vacuna contra el VPH. Se encontró un OR de 0,08 (IC al 95% 0,01 – 0,72), que se interpreta como una disminución del 92% de detectar el VPH-16 en cavidad oral de

mujeres aparentemente sanas vacunadas con dos dosis (vs. Ninguna dosis como referencia) contra el VPH entre los 14 a 17 años. No se halló asociación significativa entre una única dosis de vacunación (vs. Ninguna dosis como referencia) y la detección de VPH.

Tabla 10. Razón de oportunidad de la presencia de VPH-16 en mucosa oral por dosis recibidas de la vacuna contra el VPH.

Variables	VPH-16		OR (95% IC)
	Positivo (n = 7)	Negativo (n = 1025)	
	<i>número (porcentaje)</i>		
Dosis de vacuna aplicada			
Ninguna dosis	3 (3,33)	87 (96,67)	1
Una dosis	2 (0,90)	221 (99,10)	0,26 (0,02 – 2,34)
Dos dosis	2 (0,28)	717 (99,31)	0,08 (0,01 – 0,72)

DISCUSIÓN

Como se ha venido mencionando el VPH se ha visto implicado en el desarrollo de un subgrupo de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, especialmente aquellos ubicados en la región orofaríngea. Si bien hasta la fecha los mecanismos etiológicos no se conocen por completo, la explicación más plausible del origen de estos tipos de cáncer, es una infección oral adquirida por vía sexual que no se elimina, persiste y evoluciona a cáncer invasivo^{110,111}

A nivel mundial se estima que cada año se presentan aproximadamente 38.000 nuevos casos de cáncer de cabeza y cuello relacionados con el VPH. De los cuales el 78% son carcinomas orofaríngeo, y el 12% se presentan en cavidad oral¹⁶. Dado que actualmente no existe un método de tamizaje que permita la detección temprana de lesiones premalignas en estas localizaciones anatómicas, la vacunación profiláctica contra el VPH, podría potencialmente ser hasta el momento la única herramienta en la prevención del cáncer de cabeza y cuello, relacionado con esta infección viral¹⁶⁴, sin embargo este ha sido un aspecto poco explorado en los ensayos clínicos conducidos sobre efectividad de la vacuna.

En el presente estudio fueron analizadas 1.034 muestras de ADN obtenidas a partir de un enjuague bucal de un grupo de mujeres entre los 14 a 17 años, vacunadas y no vacunadas contra el VPH, de la ciudad de Cali, Colombia, con el fin de establecer el efecto de la vacunación sobre las frecuencias relativas de detección del VPH.

La tasa de detección de ADN del VPH en la población analizada fue del 0,87% (9/1034). Considerando el estado de vacunación, el porcentaje de detección se elevó significativamente en el grupo no vacunado (3,33%). Resultados, que concuerdan con estudios previos realizados en Estados Unidos y Perú donde encontraron porcentajes de detección entre el 1,7% y 5,1% en hombres y mujeres entre los 14 a 20 años, no vacunados^{93,96,91}. En países europeos, estudios adicionales realizados en escolares entre los 10 a 21 años reportaron tasas de detección entre el 1,08% y 3,1%, resultados también concordantes^{114,165}. No se encontraron en la literatura estudios que evalúen solo población femenina en el rango de edad, del presente estudio, lo cual evidencia la importancia del mismo.

Los genotipos identificados en las muestras positivas fueron el VPH 16, 32 y 66, siendo el VPH 16 el tipo viral detectado con mayor frecuencia tanto en el grupo vacunado como en el no vacunado, en 7 de los 9 casos positivos, evidenciando la circulación en mucosa oral de VPH-AR en niños y adolescentes, situación que llama la atención de forma preocupante, teniendo en cuenta que en ninguno de los estudios mencionados el VPH 16 fue el genotipo más prevalente. Así mismo, siendo este tipo viral identificado en aproximadamente el 50% de los cánceres cervico-uterinos y entre el 20 al 90% de los cánceres orales y orofaríngeos¹⁶⁶, el desarrollo de estrategias de seguimiento y por supuesto la vacunación profiláctica contra el VPH deben ser implementados de forma consistente con el fin de prevenir las enfermedades ano-genitales y orales relacionadas con el VPH¹⁶⁷.

Comparando la frecuencia relativa del VPH en mucosa oral de acuerdo al estado de vacunación se encontraron diferencias significativas entre los grupos, siendo mucho mayor la detección de VPH en el grupo no vacunado ($p=0,036$). Analizando específicamente la presencia de VPH 16 de acuerdo a las dosis recibidas de la vacuna, se observó que el recibir al menos 2 dosis de la misma, se reducía en un 92% el riesgo de presentar este tipo viral en mucosa oral. En este aspecto, solo un estudio realizado en Guanacaste y Puntarenas, Costa Rica, ha demostrado la reducción de la prevalencia de

VPH en mucosa oral en mujeres vacunadas entre los 18 a 26 años. En este estudio se encontró una efectividad del 93,3% de la vacuna en la prevención de infección oral por el VPH¹¹⁷. Un estudio adicional, realizado en los Estados Unidos, esta vez en ambos sexos, reportó una asociación entre la vacunación contra el VPH con una reducción del 88% de la prevalencia oral de los VPH 6, 11, 16, 18 en adultos entre los 18 a 33 años¹¹⁶.

Se debe tener en cuenta adicionalmente en la interpretación de estos resultados que ninguna de las vacunas contra el VPH licenciadas hasta el momento ha mostrado efectividad frente a infecciones establecidas, por tanto, la tasa de detección de VPH16 encontrada en el grupo vacunado podría estar relacionada con infecciones preexistentes al momento de la inmunización^{119,120,168}.

Sobre los datos sociodemográficos y de comportamiento analizado, no se observaron diferencias significativas entre los grupos vacunado y no vacunado, siendo estos comparables.

En conclusión, de acuerdo a estos resultados la vacuna tetravalente (Gardasil) incorporada al Plan Nacional de Vacunación en nuestro país muestra evidencia de un efecto protector frente a infección oral por el VPH 16, sin embargo, este efecto parece estar directamente relacionado con el número de dosis recibidas de la vacuna. No obstante, dado el limitado conocimiento con el que se cuenta acerca de su relación del VPH con el desarrollo posterior de cáncer orofaríngeo, es imposible saber si estos resultados podrían impactar a largo plazo la incidencia de este tipo de malignidad. No obstante, los presentes resultados son alentadores.

FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio permitió un acercamiento a la determinación de la efectividad de la estrategia de vacunación contra el VPH adoptadas por nuestro país, sobre la infección oral por VPH, agente etiológico en un subgrupo de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello. Adicionalmente, este es uno de los escasos estudios conducidos en población femenina que abordan el tema de la efectividad de la vacunación sobre la infección oral por VPH, siendo pionero en este campo de investigación.

CAPÍTULO V

IMPLEMENTACIÓN DE LA NUEVA GUÍA PRÁCTICA CLÍNICA PARA LA DETECCIÓN Y MANEJO DE LESIONES PRECANCEROSAS DE CUELLO UTERINO EN MUJERES DE LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar asociaciones entre lesiones precancerosas de cuello uterino y genotipos de VPH detectados en un grupo de mujeres diagnosticadas según la Guía Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino del Ministerio de Salud y Protección Social.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las proporciones de lesiones precancerosas de cuello uterino diagnosticadas según la Guía Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino del Ministerio de Salud y Protección Social.
2. Establecer las proporciones de genotipos de VPH detectados según la Guía Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino del Ministerio de Salud y Protección Social.
3. Relacionar las proporciones de lesiones precancerosas y genotipos detectados de VPH en un grupo de mujeres diagnosticadas según la Guía Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino del Ministerio de Salud y Protección Social.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio, población y muestra

El presente estudio es un análisis exploratorio descriptivo transversal de una base de datos de la Unidad de Patología Cervical de la Red de Salud Ladera E.S.E. de la Secretaría de Salud del Municipio de Santiago de Cali, Colombia; con información sobre los resultados de las pruebas de ADN-VPH (genotipo y tipo de infección), citología y colposcopia, de 58 mujeres de 30 años, o más, no vacunadas, en el periodo comprendido entre octubre del 2.018 a febrero del 2.019. Para el análisis solo fueron incluidos los registros de las mujeres con resultados positivos para la detección molecular de VPH que habían autorizado el uso de sus resultados clínicos mediante lectura y firma de un consentimiento informado, el cual explicaba la finalidad del estudio.

Las pruebas de ADN-VPH, citología cervical, y colposcopia fueron realizadas siguiendo el algoritmo propuesto en la guía de práctica clínica para la prevención secundaria del cáncer de cuello uterino para mujeres de 30 años o más (figura 7). Personal asistencial y el medico patólogo de la red Ladera tomaron las muestras cervicales según los resultados obtenidos en cada prueba.

Las muestras fueron enviadas a laboratorios clínicos autorizados por la Secretaria de Salud del municipio del Santiago de Cali mediante convenios para la realización de la prueba ADN-VPH; y las lecturas citológicas e histopatológicas.

Detección y genotipificación del VPH

La prueba de ADN-VPH fue realizada utilizando el sistema BD Onclarity™ HPV Assay y la plataforma BD Viper™ LT system (Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, Estados Unidos). El BD Viper™ LT system integra los procesos de extracción, amplificación y detección automatizada de material genético de VPH utilizando el BD Onclarity™ HPV Assay, que permite la detección cualitativa de 14 genotipos de AR y de posible riesgo oncológico a partir de muestras cervicales de forma simultánea, mediante la amplificación de la región E6/E7 del genoma viral y posterior hibridación con sondas específicas. Esta prueba informa a cerca de la presencia de seis genotipos de forma individual (VPH 16, 18, 31, 45, 51 y 52) y los ocho genotipos restantes en tres pequeños grupos: (VPH 33, 58), (VPH

35, 38, 68) y (VPH 56, 59, 66). Para verificar la calidad de las muestras, el ensayo realiza la amplificación de una región del gen de β -globina humana como control interno.

Bases de datos

La información de los resultados de las pruebas fue entregada en un archivo digital Excel, el cual contenía información acerca de la edad, los resultados de la prueba ADN-VPH (genotipo y tipo de infección), el resultado de la citología cérvico-uterina, y biopsia guiada por colposcopia.

Análisis estadístico

A las variables de estudio se les evaluó su distribución. Se elaboraron tablas y gráficos de frecuencias para las variables categóricas, y se calcularon medidas de tendencia central para las variables continua (medias y desviación estándar, y mediana y su rango). La comparación de proporciones (variables categóricas) por grupos se llevó a cabo usando la prueba exacta de Fisher y chi cuadrado. Los grupos de comparación fueron los resultados positivo y negativo de la citología cérvico-uterina y colposcopia; y las variables categóricas fueron la presencia de genotipos de VPH-AR que cubren las vacunas cuadrivalente y nonavalente. Se consideraron estadísticamente significativos solo los hallazgos con valores de p menores a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA14 (Copyright 1985-2015 StataCorp LP).

Para el análisis, los resultados de la prueba de citología cervical fueron clasificados en positivos y negativos, y los resultados de la colposcopia en negativo, LEI-BG y LEI-AG. Para la clasificación del tipo de infección, los grupos de genotipos (VPH 33, 58), (VPH 35, 38, 68) y (VPH 56, 59, 66), fueron clasificados como una infección múltiple sólo cuando se acompañaron de un genotipo o grupo de genotipos adicional, si se presentaban solos, la clasificación era indeterminada.

RESULTADOS

En la figura 13, se muestran los porcentajes de los resultados de las pruebas de citología y colposcopia. De las 58 mujeres positivas para la prueba ADN-VPH, 33 fueron positivas para la prueba citológica cervical, para un 57%. De este grupo de mujeres, el examen colposcópico fue negativo en un 21% de los casos; LEI-BG fueron identificadas en un 33%; y LEI-AG en un 45%.

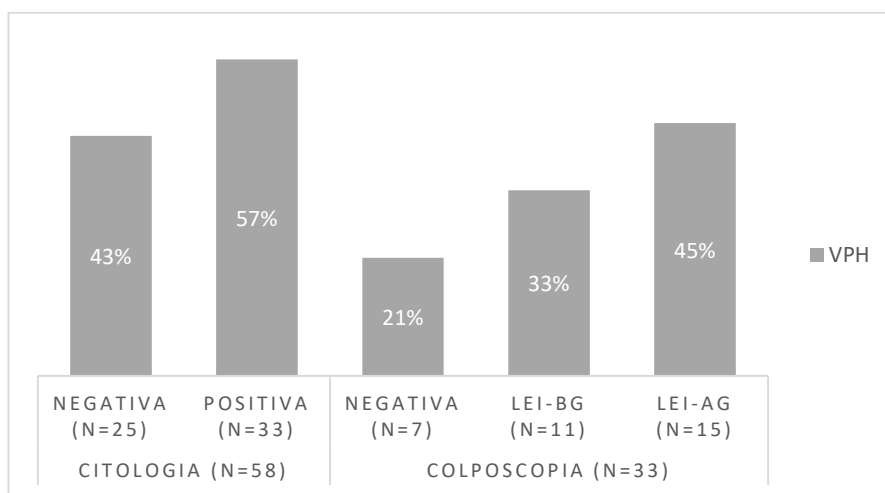


Figura 13. Porcentaje de detección del ADN del VPH-AR según los resultados de la citología y colposcopia en mujeres de la ciudad de Cali, Colombia. (LEI-BG, Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado; LEI-AG, Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado).

En la tabla 11, se observan los resultados de la prueba de ADN-VPH, y el tipo de infección viral según el diagnóstico citológico. En un 25,9% ($n = 15$) se detectó el grupo de genotipos compuesto por VPH 56, 59, y 66, siendo este porcentaje el mayor encontrado, seguido por el VPH 16 en un 19% ($n = 11$). Con relación al tipo de infección del VPH, el 38% ($n = 22$) de las mujeres presentaron infecciones únicas; el 20% ($n = 12$) presentaron infecciones múltiples; y en 24 mujeres no fue posible determinar el tipo de infección. En las muestras con diagnóstico citológico negativo, los genotipos identificados con mayor frecuencia fueron los grupos VPH 35, 38 y 58, y VPH 56, 59, y 66, con tasas de detección del 20% ($n = 5$) y 28% ($n = 7$) respectivamente. En contraste, el VPH-16 fue el genotipo predominante en muestras con diagnóstico citológico de LEI-AG.

Tabla 11. Genotipos de los VPH de AR detectados en mujeres de la ciudad de Cali-Colombia, según el tipo de infección y el diagnóstico histopatológico, entre octubre de 2018 y febrero de 2019.

Genotipo de VPH	Frecuencia (%)	Tipo de Infección del VPH	Diagnóstico Citológico			
			Negativo (%)	ASC-US † (%)	LEI-BG ‡ (%)	LEI-AG § (%)
16	11 (19,0)	Única	1 (4,0)	2 (28,6)	1 (9,1)	7 (46,7)
18*	2 (3,5)	Única	1 (4,0)	-	1 (9,1)	-
31	4 (6,9)	Única	2 (8,0)	-	2 (18,2)	-
45	1 (1,7)	Única	1 (4,0)	-	-	-
51	1 (1,7)	Única	-	-	-	1 (6,7)
52	3 (5,2)	Única	1 (4,0)	1 (14,3)	1 (9,1)	-
16*; 18*	1 (1,7)	Múltiple	-	-	-	1 (6,7)
16*; 31	2 (3,5)	Múltiple	-	-	-	2 (13,3)
31; (56, 59, 66)	1 (1,7)	Múltiple	1 (4,0)	-	-	-
(33, 58); (35, 38, 68)	1 (1,7)	Múltiple	-	-	1 (9,1)	-
(35, 38, 68); (56, 59, 66)	1 (1,7)	Múltiple	1 (4,0)	-	-	-
45; (35, 38, 68)	1 (1,7)	Múltiple	1 (4,0)	-	-	-
45; (56, 59, 66)	1 (1,7)	Múltiple	1 (4,0)	-	-	-
52; (35, 38, 68); (56, 59, 66)	1 (1,7)	Múltiple	-	-	-	1 (6,7)
52; (56, 59, 66)	3 (5,2)	Múltiple	2 (8,0)	-	-	1 (6,7)
(33, 58)	4 (6,9)	-	1 (4,0)	2 (28,6)	1 (9,1)	-
(35, 38, 68)	5 (8,6)	-	5 (20,0)	-	-	-
(56, 59, 66)	15 (25,9)	-	7 (28,0)	2 (28,6)	4 (36,4)	2 (13,3)
Total	58 (100)		25 (100)	7 (100)	11 (100)	15 (100)

Los genotipos de VPH en negrita corresponden a los que actualmente protegen las vacunas comerciales de Gardasil.

* Genotipos de VPH que protege solo la vacuna Gardasil 4.
† atipias en células escamosas de significado indeterminado
‡ Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado
§ Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado

En la Tabla 12, se compara la distribución de los genotipos de VPH de AR para los cuales las vacunas comerciales de Gardasil-4 y -9 protegen, según los resultados de la prueba de citología cérvico-uterina. Al respecto, se presentó un bajo porcentaje de detección de los genotipos de VPH-AR para los cuales la vacuna Gardasil-4 protege en mujeres con resultados negativos de citología (8%) en comparación con las mujeres con citología positiva (42,4%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa, valor de $p = 0,004$.

Tabla 12. Distribución de los genotipos de VPH-AR para los cuales las vacunas Gardasil protegen, según los resultados de la prueba de citología cérvico-uterina.

Presencia de genotipos de VPH-AR	Resultado de la Citología		Valor de <i>p</i>
	Negativa	Positiva	
n (%)			
De la vacuna Gardasil-4			0,004
Ninguno	23 (92,0)	19 (57,6)	
Al menos uno	2 (8,0)	14 (42,4)	
De la vacuna Gardasil-9			0,951
Ninguno	7 (28,0)	9 (27,3)	
Al menos uno	18 (72,0)	24 (72,7)	
Total	25 (100)	33 (100)	

Con relación a los genotipos de VPH de AR para los cuales la vacuna Gardasil-9 protege, mujeres con citología negativa y positiva, mostraron porcentajes similares y mayores al 70%.

En la Tabla 13, se observa la distribución de los genotipos de VPH-AR que las vacunas comerciales de Gardasil-4 y -9 protege según los resultados de la colposcopia. Al respecto, se presentó un alto porcentaje de detección de genotipos de VPH de AR para los cuales la vacuna Gardasil-4 brinda protección en mujeres con resultados de LEI-AG en un 66,7%, en comparación con las mujeres con resultado negativo o con LEI-BG, 28,6% y 18,9%, respectivamente. Esta diferencia fue estadísticamente significativa, valor de $p = 0,033$. Con relación a los genotipos de VPH de AR para los cuales la vacuna Gardasil-9 protege, las mujeres mostraron porcentajes similares en los resultados de colposcopia, negativa, LEI-BG, LEI-AG.

Tabla 13. Distribución de los genotipos de VPH-AR para los cuales las vacunas de Gardasil protegen, según los resultados de la prueba de colposcopia.

Presencia de genotipos de VPH-AR	Resultado de la Colposcopia			Valor de p
	Negativa	LEI-BG	LEI-AG	
n (%)				
De la vacuna Gardasil_4				0,052
Ninguno	5 (71,4)	9 (81,8)	5 (33,3)	
Al menos uno	2 (28,6)	2 (18,9)	10 (66,7)	
De la vacuna Gardasil_9				0,697
Ninguno	2 (28,6)	4 (36,4)	3 (20,0)	
Al menos uno	5 (71,4)	7 (63,6)	12 (80,0)	
Total	7 (100)	11 (100)	15 (100)	

LEI-BG, Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado; LEI-AG, Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado

DISCUSIÓN

Desde 1999 se identificó la infección por el VPH como una causa necesaria para el desarrollo de cáncer cervical y lesiones precancerosas¹²⁹. Actualmente, se sabe que aproximadamente el 80% de las mujeres sexualmente activas adquirirán una infección por VPH durante su vida; pero solo una pequeña proporción progresará y desarrollará LEI -BG y LEI-AG y finalmente cáncer invasivo¹⁶⁹. Una serie de genotipos han sido detectados de forma más prevalente en todos los estadios de lesión cervical¹³⁰, algunos de los cuales han sido cubiertos por algunas de las vacunas profilácticas contra el VPH licenciadas a la fecha, con lo cual se espera disminuir a mediano y largo plazo la incidencia de cáncer cervical a nivel mundial¹¹⁸.

En este estudio fue llevado a cabo un análisis de los resultados de la genotipificación molecular de VPH, citología cérvico-uterina y colposcopias de 58 mujeres de 30 años, o más, conforme el algoritmo de prevención de CC propuesto por el ministerio de Salud y Protección Social de Colombia en el 2014. Este grupo de mujeres fue atendidas en la Red de Salud de Ladera – E.S.E con un área

de influencia en las comunas: 1, 3, 17, 18, 19 y 20, lo que corresponde a un aproximado 636.177 habitantes.

En este grupo de mujeres, los porcentajes de detección de VPH en citologías positivas o anormales y lesiones histopatológicas de bajo y alto grado fueron similares, lo que evidencia la utilidad de las muestras obtenidas mediante ambos procedimientos para la detección molecular de VPH, y además apoya estrategia de la detección molecular de VPH a partir de muestras citológicas como primera estrategia de tamizaje tal como lo plantea el algoritmo empleado¹⁴⁰.

Respecto a los genotipos identificados, se observó alta frecuencia de VPH 16 y el grupo VPH 56, 59, 66; lo que en parte concuerda con estudios a nivel mundial que han reportado al VPH 16 como el genotipo más prevalente en todos los estadios de displasia cervical con tasas de detección que varían entre el 19,3% a 45,1%^{170,166}. A nivel nacional, según el reporte sobre el VPH y enfermedades relacionadas para Colombia del Centro de Información sobre VPH y Cáncer ICO/IARC, el VPH 16 sigue siendo el genotipo más prevalente (41-43%) en LEI-BG y LEI-AG; mientras que los VPH 56 y 66 muestran una prevalencia acumulada de 25% y 6% en LEI-BG y LEI-AG respectivamente¹⁷¹. Resultados similares fueron publicados por Trujillo y col., tras el análisis de muestras de colposcopia de pacientes con anormalidad citológica en la ciudad de Bogotá. En este estudio, el grupo VPH 56, 59, y 66 tuvo una tasa de detección del 24%¹⁷², confirmando su circulación en población colombiana con lesión cervical. No obstante los resultados de este estudio muestran una detección frecuente del grupo VPH 56, 59 y 66, mayoritariamente en citologías negativas, con ASC-US y lesiones de bajo grado, razón por la cual su significancia clínica debe ser analizada con el fin de definir las estrategias de manejo médico más adecuadas en estos casos, toda vez que estos genotipos han sido clasificados por la IARC en el grupo 1 de riesgo oncológico¹⁰⁹.

Infecciones múltiples por VPH han sido documentadas en una serie de estudios epidemiológicos, aunque su frecuencia varía ampliamente de acuerdo a la población estudiada^{173,174}. Si bien el significado de las infecciones múltiples no ha sido bien establecido, se ha planteado una asociación con el desarrollo y progresión de neoplasia cervical, sugiriendo una interacción sinérgica entre los genotipos co-infectantes. En nuestro estudio, fueron identificadas infecciones múltiples en el 20%

de las muestras analizadas, resultados que concuerdan con estudios previos realizados en mujeres con anormalidad citológica cuya frecuencia fue reportada entre el 19 al 49,8%^{172,175,176}.

La prevención primaria del CC es realizada mediante la vacunación profiláctica, la cual brinda protección frente a la infección por genotipos específicos. En Colombia es distribuida de forma gratuita la vacuna 4-valente, que ofrece protección frente a los genotipos VPH 6, 11, 16 y 18, a niñas y adolescentes entre los 9 a 18 años de edad. Una nueva vacuna, licenciada por la FDA desde el año 2.014, incluye cinco genotipos adicionales asociados al CC, sin embargo, hasta la fecha no han sido realizados estudios de costo-efectividad para su implementación en los programas locales de vacunación. Nuestro estudio encontró una alta tasa de detección de genotipos cubiertos por la vacuna 4-valente en muestras de citologías anormales y por colposcopia en comparación con los genotipos incluidos en la vacuna 9-valente, siendo ésta diferencia estadísticamente significativa. Lo que sugiere que, a nivel nacional, las mujeres con lesiones cervicales presentan con mayor frecuencia infecciones por los VPH 16 y 18, cubiertos por la vacunación actual.

Una limitante del estudio es que los resultados son producto de un análisis exploratorio con un escaso tamaño muestral, por lo que se hace necesario realizar estudios con un mayor tamaño poblacional que permitan una mejor evaluación del programa de detección temprana de cáncer cervical implementado por el Gobierno Nacional y adicionalmente obtener evidencia concluyente que permita estimar la necesidad de introducir en el esquema de vacunación actual la vacuna Gardasil-9, de acuerdo a los genotipos circulantes en la población colombiana.

En conclusión, la alta frecuencia del VPH 16 detectada en el presente estudio en mujeres que posteriormente fueron diagnosticadas con LEI-AG, resalta la validez clínica así como la utilidad de la implementación de la prueba de ADN-VPH como primera prueba de tamización en mujeres de 30 años o más, en la Guía de Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino; así como evidencia la importancia de continuar y fortalecer el programa de vacunación contra el VPH como estrategia de prevención primaria para la prevención de lesiones precancerosas de cuello uterino.

CONCLUSIONES GENERALES

La presente tesis doctoral abarcó el planteamiento y ejecución de cuatro proyectos de investigación que permitieron el abordaje del VPH desde diferentes focos. A continuación se exponen las conclusiones a partir de los resultados obtenidos en cada uno de ellos. Los resultados generales son expuestos en la figura 14.

Vías de transmisión no sexual del VPH

→ Durante el embarazo tejidos propios del proceso de gestación son expuestos al VPH, y como consecuencia se produce la detección del genoma viral de una variedad de genotipos de alto y bajo riesgo oncológico, aun en mujeres gestantes aparentemente sanas y sin antecedentes de lesión cervical, sugiriendo que ésta exposición puede presentarse bajo infecciones silentes aunque de forma muy poco frecuente y sin una afectación aparente sobre la salud materno- fetal. Sin embargo, no se puede obviar la posibilidad de que la detección de este virus pueda presentarse como consecuencia de una contaminación transitoria durante el parto mediante el paso a través del canal vaginal infectado de la madre o a través de su manipulación durante el alumbramiento.

→ Durante el crecimiento, los bebés y niños pequeños experimentan un contacto muy cercanos especialmente con sus madres, cercanía que podría facilitar la transmisión de agentes infecciosos, entre ellos el VPH, presente en tejido como piel y mucosas, no obstante, la transmisión horizontal de este virus entre la mucosa oral de madres y sus hijos menores de dos años, puede ser muy poco frecuente o incluso inexistente. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de contagio de los menores tras el contacto con otros familiares y cuidadores.

Por otro lado, genotipos de bajo riesgo fueron los más comúnmente detectados en mucosa oral de poblaciones aparentemente sanas, no obstante, genotipos de alto riesgo podrían acceder a esta localización anatómica desde edades tempranas, casos en los que deberían ser evaluadas las implicaciones de estas infecciones a corto y largo plazo, dado el potencial oncogénico de VPH-AR.

Detección de VPH en mucosa oral

- La detección del VPH en mucosa oral en una variedad de grupos poblacionales, sugiere una exposición constante a este virus durante diferentes etapas de la vida. Evidenciando además un patrón creciente conforme incrementa la edad, de esta forma a edades tempranas como en la niñez, se encuentran bajas tasas de detección (1,3%), que van incrementando paulatinamente en la adolescencia (3,3%) y adultez (6,6%), comportamiento que podría ser explicado por la dinámica de transmisión de este virus. De esta forma, vías de transmisión no sexuales mediarían la exposición viral a edades tempranas pero de forma poco frecuente, sin embargo, una vez se inician las relaciones sexuales, esta exposición incrementa, ocasionando una mayor detección viral. Factores comportamentales podrían mediar esta exposición, siendo uno de ellos el uso de anticonceptivos de barrera como el condón, lo cual mediaría la protección de los individuos frente a la adquisición de infecciones por VPH.

Efecto de la vacunación profiláctica sobre la detección de VPH en mucosa oral

- Actualmente son comercializadas tres tipos de vacunas profilácticas contra el VPH, las cuales han demostrado en una serie de ensayos clínicos una alta efectividad en la prevención de infección cervical. En Colombia, la vacuna tetravalente (Gardasil-4), incorporada en el esquema gratuito de vacunación desde el año 2012, se asoció con una disminución del riesgo de detección de VPH 16 en mucosa oral. Protección que parece ser dependiente del número de dosis recibidas.

Evaluación del programa de diagnóstico temprano de lesiones precancerosas en cuello uterino

- Mujeres residentes de la ciudad de Cali, mayores de 30 años de edad no vacunadas, VPH-positivas muestran, una alta circulación de una variedad de genotipos oncogénicos, especialmente el grupo VPH 56, 59 y 66, y VPH 16, todos ellos de alto riesgo oncológico y frecuentemente asociados a cáncer cervical. Adicionalmente, infecciones simultáneas por

más de un genotipo de VPH fueron también identificadas de forma frecuente, sin embargo su significado clínico no pudo ser establecido en el presente estudio.

- La implementación de la nueva guía de práctica clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas y cáncer cervical que incorporó la detección y genotipificación moléculas del VPH, muestra resultados alentadores y de gran utilidad, ya que no solamente fue evidente la utilidad de la detección de VPH a partir de muestras citológicas como primera estrategia de tamizaje, sino que además, la identificación de tal cantidad de genotipos facilita adicionalmente una evaluación inicial de las estrategias de vacunación empleadas actualmente en relación a los genotipos circulantes en población no vacunada.

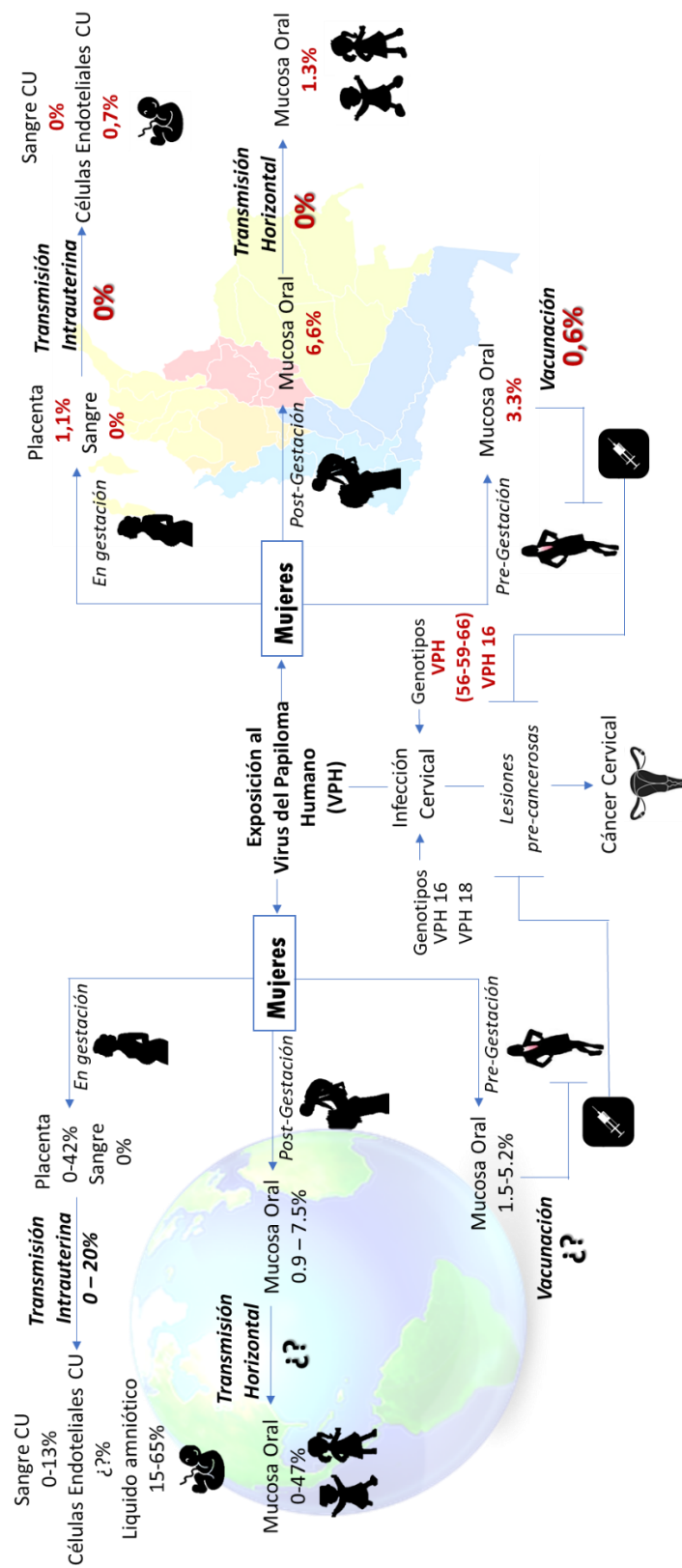


Figura 14. Resultados generales de la tesis doctoral.

REFERENCIAS

1. Bravo IG, Félez-Sánchez M. Papillomaviruses. *Evol Med Public Heal*. 2015;2015(1):32-51.
2. John Doorbar, Nagayasu Egawa, Heather Griffin CK and IM. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25(1):2-23.
3. Schwartz S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*. 2013;445:187-196.
4. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2:1-20.
5. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006;110(5):525-541.
6. International Agency for Research on Cancer. *Human Papillomaviruses*. Vol 90. Lyon, France; 2007.
7. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30(SUPPL.5):F55-F70.
8. Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat Publ Gr*. 2013;11(4):239-251.
9. Graham S V, Faizo AAA. Control of human papillomavirus gene expression by alternative splicing. *Virus Res*. 2017;231:83-95.
10. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32S:S7-S15.
11. Olivero C, Lanfredini S, Borgogna C, Gariglio M, Patel GK. HPV-Induced Field Cancerisation : Transformation of Adult Tissue Stem Cell Into Cancer Stem Cell. *Front Microbiol*. 2018;9(March):546.
12. Kranjec C, Doorbar J. Human papillomavirus infection and induction of neoplasia: a matter of fitness. *Curr Opin Virol*. 2016;20:129-136.
13. Wilting SM, Steenbergen RDM. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia. *Papillomavirus Res*. 2016;2:85-88.
14. Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larraín A. Mecanismo de Infección y Transformación Neoplásica en el Epitelio Cervical. *REV CHIL Obs GINECOL*. 2006;71(2):135-140.
15. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res*. 2017;231:119-127.

16. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017;141(4):664-670.
17. Formana D, de Martel C, Lacey CJ, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012;30(SUPPL.5):F12-F23.
18. Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-265.
19. Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *Apmis*. 2010;118(6-7):494-509.
20. Pfister H, Hausen H Zur. Seroepidemiological studies of human papilloma virus (HPV-1) infections. *Int J Cancer*. 1978;21(2):161-165.
21. Mounts P, Shah K V, Kashimat H. Viral etiology of juvenile-and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Med Sci*. 1982;79(10):5425-5429.
22. Braun L, Kashima H, Eggleston J, Shah K. Demonstration of papillomavirus antigen in paraffin sections of laryngeal papillomas. *Laryngoscope*. 1982;92(6):640-643.
23. Costa J, Howley PM, Bowling MC, Howard R, Bauer WC. Presence of human papilloma viral antigens in juvenile multiple laryngeal papilloma. *Am J Clin Pathol*. 1981;75(2):194-197.
24. Roman A, Fife K. Human papillomavirus DNA associated with foreskins of normal newborns. *J Infect Dis*. 1986;153(5):855-861.
25. STEINBERG BM. Papillomavirus: Effects upon Mother and Child. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;549(1):118-128.
26. Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. The paediatric story of human papillomavirus. *Oncol Lett*. 2014;8(2):502-506.
27. Merckx M, Liesbeth WW, Arbyn M, et al. Transmission of carcinogenic human papillomavirus types from mother to child: A meta-analysis of published studies. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(3):277-285.
28. Sabeena S, Bhat P, Kamath V, Arunkumar G. Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017;43(3):429-435.
29. Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Pal G, Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril*. 2010;94:1723-1727.
30. Sarkola M. HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) IN MOTHERS BEFORE AND AFTER DELIVERY.

2009.

31. Lee SM, Park JS, Norwitz ER, et al. Risk of Vertical Transmission of Human Papillomavirus throughout Pregnancy: A Prospective Study. *PLoS One*. 2013;8(6):4-9.
32. Bauman NM, Smith RJH. RECURRENT RESPIRATORY PAPILLOMATOSIS. *Pediatr Clin North Am*. 1996;43(6):1385-1401.
33. Marcoux D, Nadeau K, McCuaig C, Powell J, Oligny LL. Pediatric Anogenital Warts: A 7-Year Review of Children Referred to a Tertiary-Care Hospital in Montreal, Canada. *Pediatr Dermatol*. 2006;23(3):199-207.
34. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, et al. Incidence, Prevalence, and Clearance of Type-Specific Human Papillomavirus Infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis*. 2002;186(4):462-469.
35. Ambühl LMM, Leonhard AK, Widen Zakhary C, Jørgensen A, Blaakaer J, Dybkaer K, Baandrup U, Uldbjerg N SS. Human papillomavirus infects placental trophoblast and Hofbauer cells, but appears not to play a causal role in miscarriage and preterm labor. *Acta Obs Gynecol Scand*. 2017;96(10):1188-1196.
36. Weyn C, Thomas D, Jani J, et al. Evidence of human papillomavirus in the placenta. *J Infect Dis*. 2011;203(3):341-343.
37. Teixeira LO, Amaral SC, Finger-Jardim F, et al. Frequência do Papilomavírus Humano na placenta, no colostro e no sangue do cordão umbilical. *Rev Bras Ginecol e Obs*. 2015;37(5):203-207.
38. Chatzistamatiou K, Sotiriadis A, Agorastos T. Effect of mode of delivery on vertical human papillomavirus transmission - A meta-analysis. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2016;36(1):10-14.
39. Slatter TL, Hung NGLY, Clow WM, Royds JA, Devenish CJ, Hung NA. A clinicopathological study of episomal papillomavirus infection of the human placenta and pregnancy complications. *Mod Pathol*. 2015;28(10):1369-1382.
40. You H, Liu Y, Agrawal N, et al. Multiple human papillomavirus types replicate in 3A trophoblasts. *Placenta*. 2008;29(1):30-38.
41. Boulenouar S, Weyn C, van Noppen M, et al. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):473-480.
42. Freitas AC, Mariz FC, Silva MAR, Jesus ALS. Human papillomavirus vertical transmission:

Review of current data. *Clin Infect Dis*. 2013;56(10):1451-1456.

43. Zouridis A, Kalampokas T, Panoulis K, Salakos N, Deligeoroglou E. Intrauterine HPV transmission: a systematic review of the literature. *Arch Gynecol Obstet*. 2018;298(1):35-44.
44. Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol*. 2013;3(4):416-421.
45. LaCour DE, Trimble C. Human Papillomavirus in Infants: Transmission, Prevalence, and Persistence. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2012;25(2):93-97.
46. Sarkola ME, Grénman SE, Rintala MAM, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(11):1181-1188.
47. de Freitas LB, Pereira CC, Merçon-de-Vargas PR, Spano LC. Human papillomavirus in foetal and maternal tissues from miscarriage cases. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2018;38(8):1083-1087.
48. Sabeena S, Bhat P, Kamath V, Arunkumar G. Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017;43(3):429-435.
49. Tseng CJ, Lin CY, Wang RL, et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(1 Pt 1):35-40.
50. Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Hsieh TT. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Pathol*. 1991;95(4):540-546.
51. Hahn HS, Kee MK, Kim HJ, et al. Distribution of maternal and infant human papillomavirus: Risk factors associated with vertical transmission. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;169(2):202-206.
52. Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(6):347-356.
53. Freitas LB, Pereira CC, Checon R, Leite JPG, Nascimento JP, Spano LC. Adeno-associated virus and human papillomavirus types in cervical samples of pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;145(1):41-44.
54. Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, et al. Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis*. 2009;9(74):1-12.
55. Banura C, Franceschi S, Van Doorn LJ, et al. Prevalence, incidence and clearance of human papillomavirus infection among young primiparous pregnant women in Kampala, Uganda.

Int J Cancer. 2008;123(9):2180-2187.

56. Salcedo MMBP, Damin APS, Agnes G, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in pregnant versus non-pregnant women in Brazil. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292(6):1273-1278.
57. McDonnold M, Dunn H, Hester A, et al. High risk human papillomavirus at entry to prenatal care and risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(2):138.e1-138.e5.
58. Ambühl LMM, Baandrup U, Dybkær K, Blaakær J, Uldbjerg N, Sørensen S. Human Papillomavirus Infection as a Possible Cause of Spontaneous Abortion and Spontaneous Preterm Delivery. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2016;2016:1-19.
59. Jim B, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications. *Semin Nephrol*. 2017;37(4):386-397.
60. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180(2 Pt 1):499-506.
61. Arechavaleta-Velasco F, Ma Y, Zhang J, McGrath CM, Parry S. Adeno-associated virus-2 (AAV-2) causes trophoblast dysfunction, and placental AAV-2 infection is associated with preeclampsia. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1951-1959.
62. Nouroollahpour Shiadeh M, Behboodi Moghadam Z, Adam I, Saber V, Bagheri M, Rostami A. Human infectious diseases and risk of preeclampsia: an updated review of the literature. *Infection*. 2017;45(5):589-600.
63. Moser G, Windsperger K, Pollheimer J, de Sousa Lopes SC, Huppertz B. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. *Histochem Cell Biol*. 2018;150(4):361-370.
64. Cardenas I, Means RE, Aldo P, et al. Viral infection of the placenta leads to fetal inflammation and sensitization to bacterial products predisposing to preterm labor. *J Immunol*. 2010;185(2):1248-1257.
65. Cardenas I, Mor G, Aldo P, et al. Placental viral infection sensitizes to endotoxin-induced preterm labor: a double hit hypothesis. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65(2):110-117.
66. Hermonat PL, Kechelava S, Lowery CL, Korourian S. Trophoblasts are the preferential target for human papilloma virus infection in spontaneously aborted products of conception. *Hum Pathol*. 1998;29(2):170-174.
67. Weyn C, Vanderwinden JM, Rasschaert J, Englert Y, Fontaine V. Regulation of human

- papillomavirus type 16 early gene expression in trophoblastic and cervical cells. *Virology*. 2011;412(1):146-155.
68. Gomez LM, Ma Y, Ho C, McGrath CM, Nelson DB, Parry S. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Hum Reprod*. 2008;23(3):709-715.
 69. Kwon JY, Romero R, Mor G. New insights into the relationship between viral infection and pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71(5):387-390.
 70. Skoczyński M, Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A. Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90(12):1402-1405.
 71. Niyibizi J, Zanré N, Mayrand MH, Trottier H. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal human papillomavirus infection: A systematic review protocol. *Syst Rev*. 2017;6(1):1-11.
 72. Chung CH, Bagheri A, D'Souza G. Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral Oncol*. 2014;50(5):364-369.
 73. Howard JD, Chung CH. Biology of Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2012;22(3):187-193.
 74. Westra W. The pathology of HPV-related head and neck Cancer: Implications for the diagnostic pathologist. *Semin Diagnostic Pathol*. 2015;32(1):42-53.
 75. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015;7(7):3863-3890.
 76. Patel K, Ariyaratnam S, Sloan P, Pemberton MN. Oral tonsils (ectopic oral tonsillar tissue). *Dent Update*. 2004;31(June):291-292.
 77. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: Its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6758-6762.
 78. Beachler DC, Sugar EA, Margolick JB, et al. Risk factors for acquisition and clearance of oral human papillomavirus infection among HIV-infected and HIV-uninfected adults. *Am J Epidemiol*. 2015;181(1):40-53. doi:10.1093/aje/kwu247
 79. D'Souza G, Cullen K, Bowie J, Thorpe R, Fakhry C. Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2014;9(1):19-21.

80. Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. *J Am Dent Assoc.* 2011;142(8):905-914.
81. Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin H-Y, et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet (London, England).* 2013;382(9895):877-887.
82. Candotto V, Lauritano D, Nardone M, et al. HPV infection in the oral cavity: Epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *ORAL Implantol.* 2017;10(3):209-220.
83. Rintala MAM, Grenman SE, Jarvenkyla ME, Syrjanen KJ, Syrjanen 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):1728-1733.
84. Rintala M a M, Grénman SE, Puranen MH, 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):376-381.
85. 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):837-843.
86. Liu Z, Rashid T, Nyitray AG. Penises not required: A systematic review of the potential for human papillomavirus horizontal transmission that is non-sexual or does not include penile penetration. *Sex Health.* 2016;13(1):10-21.
87. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, CMP Campbell, Goodman MT, Sudenga SL, Monsonego J FS. EUROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer.* 2014;136:2752–2760.
88. Kreimer AR, Campbell CMP, Lin H, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Hildesheim A, Villa LL, Salmerón JJ, Lazcano-Ponce E GA. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet.* 2013;382(9895):877-887.
89. Beachler DC, Lang Kuhs KA, Struijk L, et al. The natural history of oral human papillomavirus in young costa rican women. *Sex Transm Dis.* 2017;44(7):442-449.
90. Wood ZC, Bain CJ, Smith DD, Whiteman DC, Antonsson A. Oral human papillomavirus

- infection incidence and clearance : a systematic review of the literature. *J Gen Virol*. 2017;98:519-526.
91. Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(9):836-840.
 92. Pickard RKL, Xiao W, Broutian TR. The Prevalence and Incidence of Oral Human Papillomavirus Infection Among Young Men and Women , Aged 18 – 30 Years. *Sex Transm Dis*. 2012;39(7):559-566.
 93. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, et al. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *Jama*. 2012;307(7):693.
 94. Wichmann G. Variation of HPV Subtypes with Focus on HPV-Infection and Cancer in the Head and Neck Region. In: Golusinski W, ed. *HPV Infection in Head and Neck Cancer*. Vol 206. ; 2017:113-122.
 95. Sonawane K, Suk R, Chiao EY, Chhatwal J, Qiu P. Oral Human Papillomavirus Infection : Differences in Prevalence Between Sexes and Concordance With Genital Human Papillomavirus. *Ann Intern Med*. 2017;167(10):714-724.
 96. Rosen BJ, Walter L, Gilman RH, Cabrerra L, Gravitt PE, Marks MA. Prevalence and correlates of oral human papillomavirus infection among healthy males and females in Lima, Peru. *Sex Transm Infect*. 2016;92(2):149-154.
 97. Cab-Sánchez B, Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Conde-Ferrández L, Gómez-Carballo JG G-LM. Epidemiología de la infección oral por VPH en sujetos jóvenes sanos. *Rev Chil Infectol*. 2017;34(6):557-562.
 98. Oliveira LHS, Santos LS, Silva CO, Augusto EF, Neves FPG. Papillomavirus infections in the oral and genital mucosa of asymptomatic women. *Brazilian J Infect Dis*. 2017;21(1):88-91.
 99. H V, DM R, SL G, LP D, J S, CD G. Identification of Human Papilloma Virus (HPV) in the Oral Cavity of Asymptomatic Colombian Men. *Mol Biol*. 2015;04(04):1-5.
 100. Mancilla LI, Aristizabal D, Acevedo SM. Infección con papilomavirus humano tipo 16 en mucosa normal de cavidad oral en una población de la ciudad de Cali en 2011. *Cienc Salud*. 2012;1(2):11-20.
 101. dos Santos R, Tenorio T, de Carvalho D, Beder C, Carneiro J, Castro G. Human papillomavirus in the oral cavity of children. *J Oral Pathol Med*. 2011;40:121-126.

102. Gillison M, Broutian T, Pickard R, et al. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012;307(7):693-703.
103. Cook RL, Thompson EL, Kelso NE, et al. Sexual Behaviors and Other Risk Factors for Oral Human Papillomavirus Infections in Young Women. *Sex Transm Dis*. 2016;137(32):10160-10163.
104. D'Souza G, Wentz A, Kluz N, et al. Sex Differences in Risk Factors and Natural History of Oral Human Papillomavirus Infection. *J Infect Dis*. 2016;213(12):1893-1896.
105. Orosco RK, Kedarisetty S, Hecht AS, Chang DC, Coffey CS, Weissbrod PA. Predictors of high-risk and low-risk oral HPV infection in the United States. *Laryngoscope*. 2016;126(6):1365-1372.
106. Trottier H, Mayrand MH, Coutlée F, et al. Human papillomavirus (HPV) perinatal transmission and risk of HPV persistence among children: Design, methods and preliminary results of the HERITAGE study. *Papillomavirus Res*. 2016;2:145-152.
107. Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. The 'Trojan horse' oncogenic strategy of HPVs in childhood. *Futur Virol*. 2013;8(8):801-808.
108. Gooi Z, Chan JYK, Fakhry C. The epidemiology of the human papillomavirus related to oropharyngeal head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2016;126(4):894-900.
109. International Agency for Research on Cancer. A Review of Human Carcinogens: Human Papillomavirus. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans*. 2012;100(B):255-296.
110. Adelstein D, Ridge J, Gillison M, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: Summary of a national cancer institute state of the science meeting, november 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck*. 2009;31:1393-1422.
111. Radosevich J, Pestle W, Colvard M, et al. *Head & Neck Cancer : Current Perspectives , Advances , and Challenges*. (Radosevich JA, ed.). Chicago: Springer; 2013.
112. Smith TJ, Mendez A, Donald C, Nagel TH. HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Am Acad Physician Assist*. 2017;30(1):14-19.
113. Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(1):62-69.
114. Nordfors C, Grün N, Haeggbloom L, et al. Oral human papillomavirus prevalence in high school students of one municipality in Sweden. *Scand J Infect Dis*. 2013;45(11):878-881.

115. Lehtinen T, Söderlund-Strand A, Petäjä T, et al. Human Papillomavirus (HPV) Prevalence in Male Adolescents 4 Years after HPV-16/18 Vaccination. *J Infect Dis.* 2017;216(8):966-968.
116. Chaturvedi AK, Graubard BI, Broutian T, et al. Effect of prophylactic human papillomavirus (HPV) vaccination on oral HPV infections among young adults in the United States. *J Clin Oncol.* 2018;36(3):262-267.
117. Herrero R, Quint W, Hildesheim A, et al. Reduced Prevalence of Oral Human Papillomavirus (HPV) 4 Years after Bivalent HPV Vaccination in a Randomized Clinical Trial in Costa Rica. *PLoS One.* 2013;8(7):1-9.
118. Valentino K, Poronsky CB. Human Papillomavirus Infection and Vaccination. *J Pediatr Nurs.* 2016;31(2):e155-e166.
119. Petrosky E, Bocchini JAJ, Hariri S, et al. Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(11):300-304.
120. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, et al. Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2014;63(RR-05):1-30.
121. Nicol AF, De Andrade C V., Russomano FB, et al. HPV vaccines: Their pathology-based discovery, benefits, and adverse effects. *Ann Diagn Pathol.* 2015;19(6):418-422.
122. ACOG. Committee Opinion No. 641: Human Papillomavirus Vaccination. *Am Coll Obstet Gynecol.* 2015;126(3):e.38-e.43.
123. Guo T, Eisele DW, Fakhry C. The potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination on oropharyngeal cancer. *Cancer.* 2016:1-11.
124. Beachler DC, Kreimer AR, Schiffman M, et al. Multisite HPV16/18 Vaccine Efficacy Against Cervical, Anal, and Oral HPV Infection. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(1):1-8.
125. Murillo R. Vacunación contra el virus del papiloma humano en Colombia. *Rev Colomb Cancerol.* 2006;10(2):85-97.
126. Ministerio de Salud y protección social. Colombia cuenta con las mejores coberturas de vacunación contra VPH del mundo. Boletín de prensa No. 005 de 2014.
127. Benavides M, Salazar L. Razones que pueden explicar la reducción en la cobertura de vacunación contra VPH en Colombia Reasons to explain the reduction in coverage of HPV vaccine in. *Rev CES Salud Pública.* 2017;8(1):82-93.

128. Salud. Piden incentivar la vacunación contra el virus del papiloma humano. El Tiempo.
129. Walboomers JMM, Jacobs M V., Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-19.
130. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-527.
131. Spinillo A, Gardella B, Iacobone AD, Cesari S, Alberizzi P, Silini EM. Multiple Papillomavirus Infection and Size of Colposcopic Lesions among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Low Genit Tract Dis.* 2016;20(1):22-25.
132. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol.* 2004;57(1):68-72.
133. Campos NG, Rodriguez AC, Castle PE, et al. Persistence of concurrent infections with multiple human papillomavirus types: A population-based Cohort Study. *J Infect Dis.* 2011;203(6):823-827.
134. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 394 CA: A Cancer Journal for Clinicians Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN.* 2018;68:394-424.
135. Sellors, John. Sankaranarayanan R. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical - Manual para principiantes. Capítulo 3: "Introducción al cáncer invasor del cuello uterino". *World Heal Organ.* 2003:19-27.
136. IARC. *IARC Handbooks of Cancer Prevention: Cervix Cancer Screening.* Lyon, France; 2005.
137. Bergeron C. The 2001 Bethesda system. *Salud Publica Mex.* 2003;45 Suppl 3:S340-4.
138. Gómez Muñoz JM, Gómez Rincón JC, Alí Munive A, et al. Guías para la inmunización del adolescente y adulto en Colombia. Documento de actualización, 2016. *Infectio.* 2016;20(4):192-210.
139. INS. *Vacunación Contra El Virus Papiloma Humano - VPH En Colombia, Para La Prevención Del Cáncer de Cuello Uterino y Verrugas Genitales.* Bogotá; 2012.
140. Colombia Ministerio de Salud y Protección Social. *Guía de Práctica Clínica Para La Detección y Manejo de Lesiones Precancerosas de Cuello Uterino.* Colombia; 2014.
141. Ishmael FT, Stellato C. Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2008;101(4):437-443.

142. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*. 2012;(63):1-15.
143. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(2):175-179.
144. Shikova E, Todorova I, Ganchev G, Kouseva-Dragneva V. Detection and typing of human papillomaviruses by pcr. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2009;23:877-880.
145. Gravitt PE, Hildesheim A, Peyton CL, et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-361.
146. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*. 2000;88(2):125-134.
147. Evander M, Edlund K, Boden E, et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol*. 1992;30(4):987-992.
148. Silveira MF da, Seixas F, Entiauspe L, Collares T, Nunes E. Comparison between two methods for moleCular CharaCterization of human papillomavirus. *J Bras Doenças Sex Transm*. 2013;25(1):13-15.
149. van Doorn L-J, Kleter B, Quint W. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn*. 2001;1(4):394-402.
150. Zborowski T, Sc M. *Automation of XMAP® Technology-Based Multiplex Assays*.; 2016.
151. Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP™ system. *J Microbiol Methods*. 2003;53(2):245-252.
152. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Viol J*. 2008;5(106):1-14.
153. Xiong YQ, Mo Y, Luo QM, Huo ST, He WQ, Chen Q. The risk of human papillomavirus infection for spontaneous abortion, spontaneous preterm birth, and pregnancy rate of assisted reproductive technologies: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Obstet Invest*. 2018;83(5):417-427.
154. Fuessel AL, He Q, Rady PL, et al. Nested PCR with the PGMY09 / 11 and GP5 + / 6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J ofVirological Methods*.

- 2004;122:87-93.
155. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: Head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*. 2012;30(SUPPL.5):F34-F54.
 156. Louvanto K, Rintala MA, Syrjänen KJ, Grénman SE, Syrjänen SM. Incident cervical infections with high- and low-risk human papillomavirus (HPV) infections among mothers in the prospective Finnish Family HPV Study. *BMC Infect Dis*. 2011;11(1):179.
 157. Fu T, Hughes JP, Feng Q, Hulbert A, Hawes SE, X Li, Schwartz SM, Stern JE, Koutsky LA WR. Epidemiology of Human Papillomavirus (HPV) Detected in the Oral Cavity and Fingernails of Mid-Adult Women. *Sex Transm Dis*. 2015;42(12):677-685.
 158. Dalla Torre D, Burtcher D, Sölder E, Widschwendter A, Rasse M, Puelacher W. The impact of sexual behavior on oral HPV infections in young unvaccinated adults. *Clin Oral Investig*. 2016;20(7):1551-1557.
 159. Gómez CO, Champion JD, Monsiváis MGM. Factors Protecting Male and Female Adolescents in Mexico From Human Papillomavirus Infection. *Hisp Heal Care Int*. 2018;16(1):20-28.
 160. Wine R, Hughes J, Feng Q. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med*. 2006;354:2645-2654.
 161. Ministerio de Salud y Protección Social - Profamilia. Encuesta Nacional de Demografía y Salud - Tomo I. 2016:430.
 162. Ministerio de Salud y Protección Social -, Profamilia. Encuesta Nacional de Demografía y Salud - Tomo II. 2016:833.
 163. Castillo A, Koriyama C, Higashi M, et al. Human papillomavirus in upper digestive tract tumors from three countries. *World J Gastroenterol*. 2011;17(48):5295-5304.
 164. Villa A, Hanna GJ. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *Curr Probl Cancer*. 2018;42(5):466-475.
 165. Durzyńska J, Pacholska-Bogalska J, Kaczmarek 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):757-761.
 166. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:14-26.
 167. Gillison ML. Human papillomavirus-related Diseases: Oropharynx Cancers and Potential

- Implications for Adolescent HPV Vaccination. *J Adolesc Heal*. 2008;43 (4 Supp:S52-S60.
168. Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, Schiller JT, Gonzalez P, Dubin G, Porras C, Jimenez SE LD. Effect of Human Papillomavirus 16/18 L1 Viruslike Particle Vaccine Among Young Women With Preexisting Infection: A Randomized Trial. *JAMA*. 2007;298(7):743-753.
 169. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342-350.
 170. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:453-459.
 171. Bruni L, Albero G, Serrano B, et al. *Human Papillomavirus and Related Diseases in Colombia*.; 2018.
 172. Bravo MM, Buitrago O, Morales N, Trujillo E, Posso H. Distribución de los genotipos del virus del papiloma humano en mujeres de Bogotá con anomalías en la citología cervicouterina. *Rev Colomb Cancerol*. 2016;20(1):3-9.
 173. Oliveira, Danielle Bruna Leal Edi Durigon EL, Carvalho ACL, Leal AL, et al. Epidemiology and Genetic Variability of Human Metapneumovirus During a 4-Year-Long Study in Southeastern Brazil. *J Med Virol*. 2009;81(7):915-921.
 174. Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, Downs LS. Multiple-type HPV infections: a cross-sectional analysis of the prevalence of specific types in 309,000 women referred for HPV testing at the time of cervical cytology. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(7):1-15.
 175. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(7):1274-1280.
 176. Otero-Motta AP, Ordóñez J luis, González-Celador R, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *Apmis*. 2011;119(3):204-215.

ANEXOS

ANEXO 1

PRODUCTOS DE LA TESIS DOCTORAL

Como productos de la tesis doctoral se enumeran a continuación artículos científicos publicados y en proceso de publicación, así como ponencias en congresos científicos.

1. Ponencia (Poster): “Detection of Human Papillomavirus in Placenta”. Eurogin 2013. “HPV at a Crossroads: 30 Years of Research and Practice”. Florencia, Italia, noviembre 3 al 6 de 2013.
2. Ponencia (Poster): “Detección de Virus del Papiloma humano en Placenta”. Simposio de Investigación en Salud XV: Discapacidad y Ciclo Vital. Cali, Colombia, octubre 23 al 24 de 2013.
3. Publicación (Resumen): Alejandra Arbeláez Vásquez, Stephania Góngora, Diana Carolina Zambrano, Fabián Fernández, Cecilia Aguilar de Plata, Andrés Castillo. Detección del Virus del Papiloma Humano en Placenta. Rev Gastrohnp. 2013; 15(3): 155-170.
4. Ponencia (Oral): “Detección del Virus del Papiloma Humano en Placenta y Sangre de Cordón Umbilical”. V Simposio Nacional y I Congreso Latinoamericano de Virología. Bogotá, Colombia, noviembre 19 al 21 de 2013.
5. Publicación (Resumen): Alejandra Arbeláez, Stephania Góngora, Diana Zambrano, Fabian Fernández, Cecilia Aguilar de Plata, Andrés Castillo. Detección del Virus del Papiloma Humano en placenta y sangre de cordón umbilical. Hechos Microbiol. 2013; 4(2 Suppl 1): 53.
6. Ponencia (Oral): “Detección de Virus del Papiloma Humano en Placenta y Sangre de Cordón Umbilical”. I Encuentro Sudamericano del Virus del Papiloma Humano. Santiago de Chile, Chile, 31 de marzo al 2 de abril de 2014.

7. Ponencia (Poster): “Detección del Virus del Papiloma Humano (VPH) en Sangre y Células endoteliales de cordón umbilical”. Simposio de Investigación en Salud XVI: Ciudades Saludables. Cali, Colombia, Octubre 22 al 23 de 2014.
8. Publicación (Resumen): Alejandra Arbeláez Vásquez, Stephania Góngora, Isabella Echeverry, Cecilia Aguilar de Plata, Andrés Castillo. Detección del virus del papiloma humano (VPH) en sangre y células endoteliales de cordón umbilical. Rev Gastrohnp. 2014; 16(3): 138-161
9. Ponencia (Poster): “DNA Human Papillomavirus Detection in Endothelial Cells of Umbilical Cord”. 30th International Papillomavirus Conference and Clinical and Public Health Workshops. Lisboa, Portugal, septiembre 17 al 21 de 2015.
10. Ponencia (poster): “Detección de ADN del Virus del Papiloma Humano en Células Endoteliales de Cordón Umbilical”. LI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Armenia, Quindío, octubre 18 al 21 de 2016.
11. Ponencia (poster): “Effect of Vaccination Against Oral HPV Infection in Women in High Schools from Cali, Colombia”. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017). Valencia, España, Julio 9 al 13 de 2017.
12. Artículo publicado: Diana Zambrano-Ríos, Fernández Fabián, Andrés Matta-Miramar, Alejandra Arbeláez, Enrique Herrera-Castañeda, Andrés Castillo. Detección del Virus del Papiloma Humano en Mucosa Oral de Mujeres de Cali, Colombia. Infectio. 2019; 23 (3). 266 – 270.
13. Artículo aceptado para publicación, revista Infectio: Alejandra Arbeláez-Vásquez, Claudia Carreño, Lilyan Coñazos-Ramírez, Andrés Castillo. Implementación de la Nueva Guía Práctica Clínica para la Detección y Manejo de Lesiones Precancerosas de Cuello Uterino en Mujeres de la Ciudad de Cali, Colombia.

ANEXO 2

CUESTIONARIO APLICADO A LAS PARTICIPANTES DE PROYECTO “DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN MUCOSA ORAL DE NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS Y SUS MADRES” (CAPÍTULO III).



CÓDIGO

**FORMULARIO DE ENCUESTA
PROYECTO
“DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUCOSA ORAL DE MUJERES Y SUS HIJOS
MENORES DE 2 AÑOS”**

Fecha de la encuesta (dd/mm/aa): _____

DATOS GENERALES DE LA MADRE

1. Nombre: _____
2. Fecha y lugar de nacimiento (dd/mm/aa): _____
3. Estrato Socioeconómico: _____
4. Dirección de residencia: _____
- Número Telefónico: _____

5. Estado Civil:

- Soltera
- Casada
- Unión libre
- Separada
- Viuda

☐
☐
☐
☐
☐

6. Escolaridad:

- No sabe leer ni escribir
- Primaria incompleta

☐
☐

- Primaria completa
- Secundaria incompleta
- Secundaria completa
- Técnico
- Universitario
- Postgrado

7. Ocupación: _____

8. Régimen de Seguridad Social al que pertenece:

- Medicina prepagada
- Régimen contributivo
- Régimen subsidiado
- Régimen especial
- No tiene seguridad social
- Técnico
- Universitario
- Postgrado

9. Hábito de cigarrillo:

- Nunca ha fumado
- Exfumadora
- Fumadora actual

Numero de cigarrillos que fuma al día _____

10. Ingesta de alcohol

- Si
- No
- Frecuencia de consumo

11. Consumo de sustancias psicoactivas

- Si
- No
- Cual (s) _____
- Frecuencia de consumo _____

HISTORIA GINECO-OBSTETRICA

12. Edad de Menarquia: _____

13. Número de Embarazos: _____

14. Actualmente está en embarazo: _____

15. Número de Partos: _____

16. Número de Abortos: _____

17. Número de Nacidos Vivos: _____

18. Número de Partos Naturales: _____

19. ¿Qué método de planificación usa actualmente?

- Ninguno
- Anticonceptivos orales
- Anticonceptivos inyectables
- Anticonceptivos Implantables
- Método de barrera (condón)
- Dispositivo intrauterino
- Abstinencia
- Ritmo
- Coitus interruptus (explicar)
- Ungüentos intravaginales
- Esterilización quirúrgica
- Otro

¿Que otro(s) método de planificación ha utilizado?

COMPORTAMIENTO SEXUAL

20. Edad de la primera relación sexual: _____

21. ¿En este momento, usted es activa sexualmente?

- Si ☐
- No ☐

SI LA RESPUESTA ES NO SALTE A LA PREGUNTA 23 DE LO CONTRARIO SIGA CON LA PREGUNTA 22

22. ¿En promedio cuántas relaciones sexuales tiene a la semana? _____

23. ¿Cuántos compañeros sexuales ha tenido usted en su vida? _____

24. ¿Cuántos compañeros sexuales ha tenido usted en el último año? _____

25. ¿Ha sido diagnosticada con alguna enfermedad de transmisión sexual?

- Si ☐
 - No ☐
 - No sabe ☐
 - ¿Cual? ☐
-

26. ¿Alguna vez en su vida ha tenido verrugas en alguna parte del cuerpo, incluidos los genitales?

- Si ☐
- No ☐
- No sabe ☐

Si LA RESPUESTA ES NO SALTAR A PREGUNTA 29

27. Cuál ha sido la ubicación de las verrugas:

- Piel ☐
 - Genitales ☐
 - Ano ☐
 - Cavidad Oral ☐
 - Otro ☐
 - ¿Cual? ☐
-

28. ¿Número aproximado de verrugas que ha presentado? _____

INFORMACIÓN GENERAL DEL MENOR

29. Nombre: _____

30. Lugar y Fecha de Nacimiento: _____ Edad: _____

31. Sexo:

- Femenino ☐
- Masculino ☐

32. Edad gestacional al momento del parto: _____

33. Peso al nacer: _____

34. Tipo de parto:

- Vaginal ☐
- Cesárea ☐

35. ¿Recuerda cuál fue la duración del trabajo de parto? _____

36. ¿Con quién vive el niño?

- Respuesta: _____

37. ¿Quién cuida al niño cuando usted no está presente?

- Respuesta: _____

38. ¿El niño actualmente está inscrito en una guardería?

- Si ☐
- No ☐
- Frecuencia con la cual asiste: _____

39. ¿Alguna vez el niño ha sido diagnosticado con alguna enfermedad?

- Si ☐
- No ☐

40. ¿El niño ha presentado verrugas en alguna parte del cuerpo?

- Si ☐
- No ☐

SI LA RESPUESTA ES NO, FINALICE LA ENCUESTA Y AGRADEZCA LA PARTICIPACIÓN.

41. Ubicación de las verrugas:

- Piel ☐
- Genitales ☐
- Ano ☐
- Cavidad Oral ☐
- Otro ☐
- ¿Cuál? _____

42. Número aproximado de verrugas: _____

**FIN DE LA ENCUESTA
GRACIAS**

ANEXO 3

CUESTIONARIO APLICADO A LAS PARTICIPANTES DE PROYECTO “EFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA EL VPH EN LA FRECUENCIA RELATIVA DE SU DETECCIÓN EN CAVIDAD ORAL DE NIÑAS Y ADOLESCENTES ENTRE 14 A 17 AÑOS DE LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA.” (CAPÍTULO IV).



CÓDIGO

UNIVERSIDAD DEL VALLE

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA VACUNACIÓN CONTRA VPH
EN LA INFECCIÓN ORAL POR VPH16 EN NIÑOS ENTRE LOS 14 Y 17 AÑOS DE EDAD
DE LOS COLEGIOS DE SANTIAGO DE CALI

La información recogida en esta encuesta es completamente confidencial.
Te solicitamos responder las preguntas con total honestidad



No escribas tu nombre en esta encuesta Las respuestas suministradas serán mantenidas en secreto.
Contesta a las preguntas basado en lo que realmente haces.
Asegúrate de leer cada pregunta y selecciona con una X la respuesta que indica tu contestación.

01. La institución educativa es: Pública ☐ Privada ☐

DATOS PERSONALES

02. Sexo: Hombre ☐ Mujer ☐

03. Edad en años: 14 15 16 17

04. Grado en curso: 6 7 8 9 10 11

05. Barrio donde reside: _____

ESTADO DE VACUNACIÓN

La vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH) ha sido aplicada por la Secretaría de Salud Municipal en Instituciones Educativas públicas y privadas a niñas entre 9 y 17 años; además se aplica en Centros de salud o clínicas. Para las siguientes preguntas, marca con una X de acuerdo a tu caso:



06. ¿Te has vacunado contra el virus del papiloma humano?
SI ☐ NO ☐

07. ¿Cuántas dosis has recibido hasta el momento?
No me han vacunado ☐ 1 2 3

HIGIENE ORAL



A continuación realizaremos algunas preguntas respecto al cuidado e higiene que tienes con tus dientes.
Marca con una X según sea tu caso.

08. En los últimos 6 meses, ¿Cuántas veces al día usas enjuague bucal?
Nunca ☐ 1 Vez al día ☐ 2 o más veces al día ☐

09. En los últimos 6 meses, ¿Cuántas veces al día te has cepillado los dientes?
Nunca ☐ 1 Vez al día ☐ 2 o 3 veces al día ☐ Más de 3 veces al día ☐

10. ¿Cuando te cepillas los dientes, sangran tus encías?
Nunca ☐ Algunas veces ☐ Siempre ☐

1

11. En los últimos 6 meses, ¿Has tenido aparatos dentales como frenillos, brackets o retenedores?
SI ☐ NO ☐
12. ¿Te han hecho alguna vez cirugía en la boca?
SI ☐ NO ☐
13. En los últimos 12 meses, ¿Te han sacado algún diente?
SI ☐ NO ☐ No me acuerdo ☐
14. ¿Has tenido lesiones en la boca (heridas, placas, herpes, sapos)?
SI ☐ NO ☐
15. ¿Tienes o has tenido piercing en la boca?
SI ☐ NO ☐
16. ¿Compartes tu cepillo de dientes?
SI ☐ NO ☐

COMPORTAMIENTO SEXUAL



Las preguntas 17 a 25 indagan sobre tus comportamientos sexuales y relacionales con tus amigos-as y/o compañeros-as. Marca con una X según sea tu caso:

17. En los últimos 6 meses, ¿Te has besado en la boca con algún/alguna estudiante de tu institución educativa?
SI ☐ NO ☐
18. ¿Cuántos estudiantes de tu institución educativa has besado?
☐ 0 Personas ☐ 1 Persona ☐ 2 Personas ☐ 3 Personas ☐ 4 Personas ☐ 5 o más Personas
19. Cuando se besan, ¿Hay contacto entre las lenguas?
☐ No he besado ☐ Nunca hay contacto ☐ Algunas veces hay contacto ☐ Siempre hay contacto



Para las siguientes preguntas, las relaciones sexuales se refieren al contacto físico del cuerpo y de los genitales. Además de besos, abrazos y caricias, hay contacto de los genitales (pene-vagina, pene-ano, pene-boca) o penetración con otro tipo de elemento u objetos.

20. ¿Has tenido relaciones sexuales?
SI ☐ NO ☐
21. En los últimos 6 meses, ¿Has tenido relaciones sexuales con algún/alguna estudiante de tu institución educativa?
 No he tenido relaciones sexuales ☐ SI ☐ NO ☐
22. ¿Con cuántos estudiantes de tu institución educativa has tenido relaciones sexuales?
☐ No he tenido relaciones sexuales ☐ No he tenido relaciones sexuales con estudiantes de esta institución ☐ 1 Persona ☐ 2 Personas ☐ 3 Personas ☐ 4 o más Personas
23. El sexo de los estudiantes con que has tenido relaciones sexuales, ha sido:
 No he tenido relaciones sexuales ☐
 Hombre ☐
 Mujer ☐
 Ambos ☐
24. ¿Qué tipo de relación sexual has tenido con los estudiantes de la institución? (Puedes marcar varias opciones)
 No he tenido relaciones sexuales ☐
 Relación sexual oral ☐
 Relación sexual genital ☐
 Relación sexual anal ☐
25. La última vez que tuviste relaciones sexuales, ¿Usaste tú o tu pareja condón o preservativo?
 No he tenido relaciones sexuales ☐ SI ☐ NO ☐ No me acuerdo ☐

CONSUMO DE TABACO Y ALCOHOL

A continuación preguntaremos por tus hábitos de consumo de tabaco y alcohol.
Marca con una X según sea tu caso



26. En los últimos 6 meses, ¿Has fumado cigarrillo?
SI ☐ NO ☐
27. Durante los últimos 30 días, ¿Cuántas veces al día has fumado cigarrillo?
☐ Nunca he fumado ☐ No he fumado los últimos 30 días ☐ Menos de una vez al día ☐ 1 vez al día ☐ Entre 2 a 4 veces al día ☐ Más de 4 veces al día
28. En los últimos 6 meses, ¿Has fumado marihuana?
SI ☐ NO ☐
29. Durante los últimos 30 días, ¿Cuántas veces al día has fumado marihuana?
☐ Nunca he fumado ☐ No he fumado los últimos 30 días ☐ Menos de una vez al día ☐ 1 vez al día ☐ Entre 2 a 4 veces al día ☐ Más de 4 veces al día
30. En los últimos 6 meses, ¿Has bebido licor (aguardiente, cerveza, vino, u otros)?
SI ☐ NO ☐
31. Durante los últimos 30 días, ¿Cuántas veces a la semana has bebido licor?
☐ Nunca he bebido ☐ No he bebido los últimos 30 días ☐ Menos de una vez a la semana ☐ 1 vez a la semana ☐ Entre 2 a 4 veces a la semana ☐ Más de 4 veces a la semana

ENFERMEDADES DE LA BOCA

32. En los últimos 12 meses, ¿Has sufrido de enfermedades en la garganta como amigdalitis o faringo-amigdalitis?
SI ☐ NO ☐

PRESENCIA DE VERRUGAS

33. ¿Alguna vez has tenido verrugas en la piel, boca o genitales, parecidas a las que muestran las imágenes? **Observa el afiche**
SI ☐ NO ☐
34. ¿En qué lugares del cuerpo las has tenido? Marca con una X, varias opciones si es necesario.
☐ No he tenido verrugas en la piel ☐ Manos -dedos- ☐ Boca ☐ Brazos -codos- ☐ Genitales ☐ Otros ¿Cuáles? _____
35. ¿Alguna persona de tu familia ha sido diagnosticada con algún tipo de cáncer?
SI ☐ NO ☐



FIN DE LA ENCUESTA
Gracias por tu honestidad

3