



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO

***“PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS PAPILOMA
HUMANO (VPH) EN LA CAVIDAD FARÍNGEA DE UNA
POBLACIÓN DE LACTANTES CHILENOS CON INFECCIÓN
RESPIRATORIA AGUDA, DEL ÁREA NORTE DE
SANTIAGO”***

DRA. DANIELA GUTIÉRREZ CÉLÈRY

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCION MICROBIOLOGÍA**

**Directora de Tesis
Prof. Dra. Sandra Ampuero Llanos**

2011

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

DANIELA GUTIÉRREZ CÉLÈRY

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas y Médicas con mención en Microbiología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 10 de Mayo, año 2011.

Prof. Dra. Sandra Ampuero LLanos

Director(a) de Tesis

Laboratorio de Virología ICBM

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Eugenio Ramírez

Prof. Dra. María José Matínez

Prof. Juan Pablo Torres

Prof. Dr. Sergio Vargas

Presidente Comisión

Dedico todo este esfuerzo,
a la persona que me enseñó a trabajar en el laboratorio,
que me enseñó cómo hacer investigación científica,
que me enseñó desde las cosas más básicas a las más complejas,
que me brindó su apoyo incondicional durante 2 años,
y la que me sigue motivando a permanecer en esta línea...

a la Dra. Sandra Ampuero.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer la paciencia y buena voluntad de todos los integrantes del equipo de virología, y en especial a Rosita, Dina y Cristian por todas aquellas ocasiones en las que les pedí su ayuda y me la brindaron amablemente durante estos 2 años.

A la Dra. Carmen Larrañaga y Dra. María José Martínez por sus distintos aportes en el estudio y por el apoyo entregado durante la realización de la tesis.

A Mónica Peña por su incondicionalidad y buenísima acogida de siempre.

A mis padres y amigas por creer en lo que hago y por estar conmigo en los momentos más difíciles.

Al Sr. y amigo Rodrigo Arancibia por ayudarme y apoyarme en el inicio de esta etapa que hoy termina.

Al Roche Chile Limitada por sus aportes, que fueron fundamentales para el desarrollo de la Tesis.

Finalmente, agradezco a mi tutora, Dra. Sandra Ampuero, por hacer de esta estadía una gran experiencia, llena de cariño, y de la cual me siento muy feliz de haber participado...muchas gracias!!

ÍNDICE

	Página
Glosario de abreviaturas.....	7
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tablas.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	11
Introducción.....	13
- Aspectos generales del virus papiloma humano.....	13
- Genoma viral y ciclo replicativo.....	14
- Infección por VPH mucoso.....	17
- Infección por VPH en niños.....	19
- VPH y cáncer.....	22
- Mecanismo oncogénico.....	25
- VPH e inmunidad.....	25
- Vacunas.....	26
Hipótesis.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
Materiales y métodos.....	29
- Cálculo estadístico.....	29
- Muestras clínicas y recopilación de datos.....	29
- Obtención del material genético.....	29
- Detección del gen de la β -globina humana mediante PCR convencional...	30
- Reextracción de material genómico y nueva PCR para las muestras con β -globina negativa por PCR convencional.....	31
- Detección del gen TLR4 humano mediante PCR convencional.....	31
- Detección de VPH mediante PCR convencional.....	32

	Página
- Sensibilidad de la detección de VPH mediante PCR convencional con partidores genéricos GP5 ⁺ /GP6 ⁺	33
- Sensibilidad del método Fenol cloroformo:alcohol-isoamílico para la extracción de ADN.....	35
- Genotipificación de VPH mediante ensayo de Linear Array.....	36
- Detección de VPH mediante PCR convencional a partir de extracciones de ADN realizadas por Linear Array.....	37
Resultados.....	38
- Datos Epidemiológicos de la población en estudio.....	38
- Determinación de Calidad de las muestras de ANF.....	38
- Detección de VPH por PCR convencional.....	40
- Determinación de genotipos de VPH mediante el ensayo de Linear Array	41
- Detección de VPH por PCR convencional a partir de extracciones de ADN realizadas con el ensayo de Linear Array.....	43
Discusión.....	45
Conclusiones.....	54
Anexos.....	55
Referencias.....	60

GLOSARIO DE ABREVIACIONES

ADN = Ácido desoxirribonucleico
ADV = Adenovirus
ANF = Aspirado nasofaríngeo
BrEt = Bromuro de etidio
CPPA = Célula presentadora de antígeno
dNTPs = desoxirribonucleótido trifosfatos
E2F = Factor de transcripción
EDTA = Acido etilendiaminotetraacético
IgA = Inmunoglobulina A
IRA = Infección respiratoria aguda
KDa = Kilodalton
MgCl₂ = Cloruro de magnesio
min = minuto
ng = nanogramo
°C = grado Celsius
p = Proteína
pb = Pares de bases
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
pRb = Proteína retinoblastoma
s = segundo
SDS = Dodecil sulfato de sodio
TBE = Tris-borato EDTA
Tris-HCl = Tris-Borato / ácido clorhídrico
ul = microlitro
uM = microMolar
URR = Unidad regulatoria no codificante
USA = Estados Unidos de América
V = Voltios
VLP`s = Partículas similares a virus

VP = Virus papiloma

VPH = Virus papiloma Humano

VPH-AR = Virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico

VPH-BR = Virus papiloma humano de bajo riesgo oncogénico

VRS = Virus respiratorio sincicial

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organización del genoma del VPH.....	14
Figura 2. Patrón normal de expresión durante una infección viral con VPH.....	17
Figura 3. Prueba de concentraciones de magnesio (2mM, 3mM, 4mM) y de partidores (0,2uM, 0,3uM, 0,4uM) para la detección de VPH mediante PCR utilizando plasmidio VPH 16.....	33
Figura 4. Detección de la sensibilidad de la PCR convencional para VPH con partidores genéricos GP5 ⁺ /GP6 ⁺	34
Figura 5. Detección del gen de β-globina (106pb) en muestras de ANF.....	39
Figura 6. Detección del gen TLR4 (167pb) en muestras de ANF.....	40
Figura 7. Detección de VPH (150p) en muestras de ANF.....	41
Figura 8. Detección del gen TLR4 (167pb) de aquellas muestras VPH positivas mediante PCR convencional.....	41
Figura 9. Tiras reactivas obtenidas mediante el ensayo de Linear Array.....	43
Figura 10. Detección de VPH (150pb) por PCR convencional con partidores GP5 ⁺ /GP6 ⁺ de las 49 muestras de ANF sometidas al ensayo de Linear array.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación del gen de β -globina humana, del gen TLR4 humano y de VPH genérico.....	35
Tabla 2. Resultados obtenidos en la detección del gen β -globina en las muestras de ANP mediante PCR.....	38
Tabla 3. Resultados obtenidos en la detección del gen TLR4 en las muestras de ANF mediante PCR	39
Tabla 4. Resultados obtenidos en la detección de VPH utilizando los Partidores universales GP5 ⁺ /GP6 ⁺ en las muestras TLR4 positivas.....	40
Tabla 5. Genotipificación de VPH mediante ensayo de Linear Array.....	42
Tabla 6. Genotipos de VPH encontrados en las muestras analizadas por Linear Array.....	42
Tabla 7. Detección de VPH por PCR convencional con partidores GP5 ⁺ /GP6 ⁺ , en muestras ANF sometidas al ensayo de Linear array.....	43

RESUMEN

Introducción: La infección por el virus papiloma humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual más prevalentes en el mundo, se ha asociado con lesiones epiteliales benignas hiperplásicas, papilomatosas, verrucosa y a carcinomas, siendo el agente etiológico del cáncer cervicouterino. La única localización no genital para la cual se ha evidenciado una asociación igualmente sólida a favor de un papel etiológico del VPH corresponde a un grupo de cánceres de cabeza y cuello, especialmente en la orofaringe. En niños existen estudios que han confirmado la detección de VPH en piel y mucosas, pero su mecanismo de transmisión es controversial. Las lesiones más típicas en niños son las verrugas de piel y las infecciones por VPH en la laringe como la papilomatosis laríngea recurrente. Hay pocos estudios en el mundo relacionados con la infección oral por VPH en niños, por lo que la prevalencia certera de dicha infección no es conocida. En recién nacidos sin lesiones orofaríngeas, se ha encontrado una prevalencia desde 4% hasta 87% de VPH en hisopados orales. En Chile no existen estudios de portación de VPH en cavidad orofaríngea en niños ni en adultos. **Objetivos:** El propósito de este trabajo fue determinar la portación del VPH en cavidad faríngea de una población de lactantes menores de dos años en Chile. **Materiales y Métodos:** se usaron muestras de aspirados nasofaríngeos de 291 lactantes, con infección respiratoria aguda, de 5 días a 24 meses de vida, de Santiago, Chile, recolectadas previamente para estudios de infecciones virales (Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). En estas muestras se determinó la presencia de VPH mediante PCR convencional con partidores GP5⁺/GP6⁺. Las muestras VPH positivas se genotipificaron mediante el ensayo de Linear Arrays. La calidad de la muestra y la presencia de inhibidores de PCR se evaluaron mediante la detección del gen celular TLR4 por PCR. **Resultados:** debido a la degradación del ADN de las muestras, se incluyeron sólo 160 muestras en este estudio, de las cuales se obtuvo una prevalencia de VPH en faringe de estos lactantes de 30,6% mediante PCR convencional. De las 49 muestras positivas sólo 8 (16,3%) pudieron ser genotipificadas. Los genotipos detectados fueron: VPH-58 (2 muestras), VPH-16 (4 muestras), VPH-18 (una muestra), VPH-11(una muestra) y una muestra con infección múltiple para genotipos VPH-16 y 18. **Conclusiones:** La prevalencia de VPH que obtuvimos en cavidad faríngea en esta población de niños chilenos, está dentro de lo descrito internacionalmente, siendo una prevalencia alta. Sin embargo, nuestro estudio tuvo limitaciones en cuanto a la calidad de las muestras y a la población analizada, lactantes hospitalizados, por lo cual se requieren otros estudios que nos permitan corroborar si esta prevalencia es representativa de la infección por VPH en cavidad faríngea de lactantes chilenos. A pesar de ello, este es el primer estudio que detecta genoma viral en faringe de lactantes chilenos.

ABSTRACT

Introduction: Infection with human papillomavirus (HPV) is the most prevalent sexually transmitted infection in the world. It has been associated with benign epithelial hyperplastic, papillomatous, verrucous lesions and carcinomas, and is the etiologic agent of cervical cancer. The only non-genital location for which there has been an equally strong association in favor of an etiological role of HPV is a group of head and neck cancers, especially in the oropharynx. In children, studies have confirmed the detection of HPV in skin and mucous membranes, but its mechanism of transmission is controversial. The typical lesions in children are skin warts and HPV infection in the larynx such as recurrent laryngeal papillomatosis. There are few studies in the world related to oral HPV infection in children, so the accurate prevalence of HPV infection is not known. In infants without oropharyngeal lesions, there have been found a prevalence of 4-87% of HPV in oral swabs. In Chile there are no studies bearing of HPV in oropharyngeal cavity in children and adults.

Objectives: The purpose of this study was to determine the carrying HPV pharyngeal cavity of a population of infants under two years in Chile. **Materials and Methods:** We used samples from nasopharyngeal aspirates from 291 infants with acute respiratory infection, aged 5 days to 24 months of life, Santiago, Chile, previously collected for studies of viral infections (Laboratory of Virology, Faculty of Medicine, University of Chile). These samples were tested for HPV by conventional PCR with primers GP5 + / GP6 +. HPV-positive samples were genotyped by testing Linear Arrays. The quality of the sample and the presence of PCR inhibitors were assessed by TLR4 cell gene detection by PCR. **Results:** Due to the degradation of DNA samples, only 160 samples were included in this study, in which we obtained a prevalence of 30.6% of HPV in the pharynx of these infants by conventional PCR. Of the 49 positive samples only 8 (16.3%) could be genotyped. The genotypes detected were HPV-58 (2 samples), HPV-16 (4 samples), HPV-18 (one sample), HPV-11 (one sample) and a sample with multiple infections to genotypes HPV-16 and 18. **Conclusions:** The prevalence of HPV found from pharyngeal cavity in this population of Chilean children, is within that described internationally, with a high prevalence. However, our study had limitations regarding the quality of the samples and the population sampled, hospitalized infants, that's why other studies are required to confirm whether this prevalence is representative of HPV infection in Chilean infants pharyngeal cavity. However, this is the first study to detect viral genome in the pharynx of Chilean infants.

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus papiloma humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual más prevalentes en el mundo. Se describen en USA cerca de 5,5 millones de casos nuevos anuales, con una prevalencia estimada de 20 millones y se presume que 20-40% de las mujeres sexualmente activas estarían infectadas con VPH¹. Cabe destacar que la prevalencia es probablemente mucho mayor que la documentada, debido a las infecciones subclínicas².

Se ha asociado con lesiones epiteliales benignas hiperplásicas, papilomatosas, verrucosa y a carcinomas, siendo el agente etiológico del cáncer cervicouterino^{3,4}. El VPH está distribuido ampliamente en el ambiente, presenta un tropismo epitelial, tanto cutáneo como mucoso, e infecta a ambos géneros y a todo grupo etario. La relación hombre:mujer sería de 1,4:1⁵.

Aspectos generales del virus papiloma humano

El virus papiloma (VP) ha sido encontrado en más de 20 especies diferentes de mamíferos, aves y reptiles, sin embargo, debido a su importancia clínica los VP que infectan a los humanos (VPH) han sido los más extensamente estudiados (7). Los VP pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, presentan ADN de doble hebra circular, son virus pequeños de 52-55 nm de diámetro, sin envoltura y con cápside icosaédrica³.

La clasificación vigente del VPH se basa en forma exclusiva en la caracterización del genoma; se considera que se trata de un nuevo genotipo si la región L1, la parte menos variable del genoma del VPH que codifica para una proteína de la cápside viral, presenta una homología menor de 90% con otros genotipos conocidos de VPH. Cuando la homología se sitúa en el rango de 90 a 98% indica un subtipo, y cuando es mayor de 98%, se considera que es una variante. Los genotipos son designados por números y los subtipos con letras, siguiendo un orden cronológico con respecto a su descripción⁶. De esta manera han sido identificados más de 200 genotipos⁴, siendo los más importantes aquellos que infectan las

El VPH infecta a los queratinocitos que se encuentran en la capa basal del epitelio escamoso estratificado. Su ciclo replicativo está directamente relacionado con la diferenciación del epitelio que infecta, tanto temporal como espacialmente, y puede inducir infecciones persistentes y transformantes. La infección ocurre a través de microtraumas en el epitelio, que expone la capa celular basal a la entrada del virus. Se cree que esta entrada es iniciada por la unión de las partículas virales a receptores tanto de la matriz extracelular como de la superficie de la célula, probablemente proteoglicanos con heparán Sulfato o alfa-6-integrinas. Una vez dentro de la célula basal, se genera una población viral no productiva, con un número bajo de copias de ADN viral (30-50 copias por célula infectada), donde el genoma viral se mantiene en forma extracromosómica o episomal en el núcleo de las células infectadas. Después de la división celular, las células hijas infectadas abandonan la capa basal, migran hacia las regiones suprabasales y se diferencian, donde se activa la expresión de genes virales tempranos para la replicación del genoma viral, conocida como fase productiva o vegetativa del ciclo viral (figura 2). Las proteínas codificadas por los genes tempranos, E1 y E2 están involucradas en la replicación actuando como factores que reconocen el origen de replicación viral. La proteína E2 actúa como modulador de la transcripción regulando la expresión de otros genes tempranos y favoreciendo el reclutamiento de E1 (que presenta una actividad helicasa) al origen de replicación. La formación del complejo de iniciación E1/E2 permitiría la replicación viral. El gen E5 codificaría para una proteína con actividad transformante no bien definida para todos los VPH-AR¹⁰.

Las proteínas codificadas por los genes tempranos E6 y E7, han sido las más estudiadas por su actividad oncogénica. Durante la infección, ambas proteínas tendrían una interacción con proteínas celulares relacionadas con la proliferación celular como p53 y la del retinoblastoma (Rb), interfiriendo en el control del ciclo celular, apoptosis y senescencia para favorecer la proliferación celular más que la diferenciación terminal del queratinocito. Así, el VPH es capaz de controlar los procesos celulares impidiendo que los queratinocitos entren en una fase terminal de diferenciación promoviendo la entrada a la fase S del ciclo celular^{11,12}.

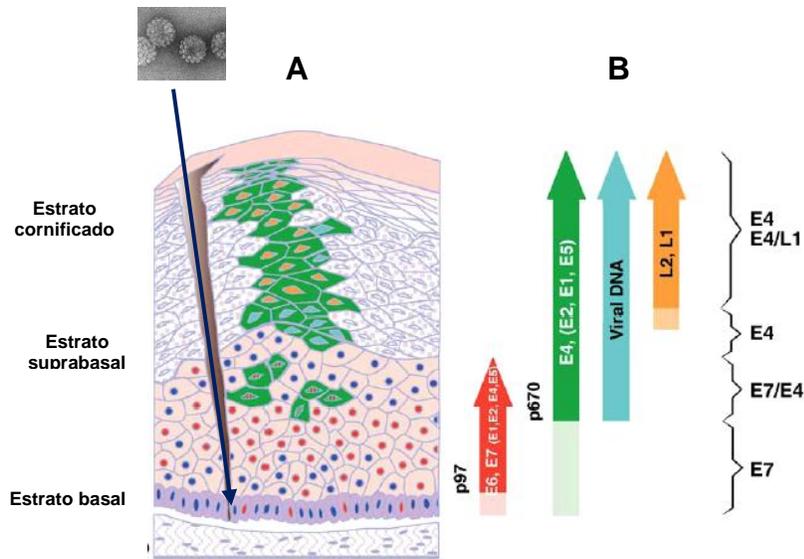


Figura 2. Patrón normal de expresión durante una infección viral con VPH. En la parte A, se esquematiza un epitelio escamoso estratificado que presenta una micro lesión por la cual ingresaría el virus al estrato basal. Las células con puntos azules son células no infectadas, las células con puntos rojos corresponden a células infectadas con VPH que expresan genes tempranos necesarios para la mantención del genoma viral. En los estratos superiores comienza la expresión de los genes involucrados en la liberación de la partícula viral (verde) y los genes necesarios para que ocurra el ensamblaje de la cápside viral (naranja). La parte B de la figura indica la línea temporal y espacial de eventos moleculares durante la infección con VPH¹¹.

La proteína E4 actuaría en etapas tardías del ciclo viral interactuando con moléculas del citoesqueleto celular y permitiendo la liberación de la partícula viral en el epitelio cornificado. Junto con la expresión de E4 en los estratos superiores del epitelio ocurre la expresión de los genes virales tardíos L1 y L2 necesarios para la formación de la cápside viral. Esta cápside está organizada en 72 capsómeros pentaméricos compuestos por 360 copias de la proteína L1, que es la proteína mayor de la cápside con un tamaño de 55 kDa y corresponde aproximadamente a un 80% del total de las proteínas virales, y 12 copias de L2, la proteína menor de la cápside, de 70 kDa, se ubica al centro del vértice del capsómero pentavalente y sería la responsable de la adsorción y penetración de la partícula viral, interactuando con moléculas de la matriz extracelular inicialmente y luego con receptores celulares¹³. Una vez que se produce el ensamblaje viral, los viriones son liberados en conjunto con las células de

las capas más superficiales del epitelio, que se desprenden y se desintegran en su ciclo de vida habitual⁸.

Infección por VPH mucoso

Se han definido tres etapas en la historia natural de la infección por VPH: 1) clínica, la cual se caracteriza por signos reconocibles, como condilomas acuminados, papilomas invertidos, leucoplasia, papilomatosis laríngea recurrente o cánceres⁹, sin procedimientos auxiliares de ayuda diagnóstica; 2) Subclínica, ésta se detecta sólo con la ayuda del colposcopio o microscopio, y 3) latente, que no tiene lesiones visibles y solo puede ser detectada por procedimientos de identificación del ADN viral¹⁴.

Las manifestaciones clínicas del virus varían dependiendo del sitio de infección, del huésped y genotipo del virus, pudiendo encontrarse infección en más de un sitio y con más de un genotipo viral. Cabe destacar que pueden pasar años antes de evidenciar algún tipo de lesión¹⁵. En las infecciones latentes, el epitelio oral y faríngeo se puede observar clínica e histológicamente normal, dado que la expresión de genes virales está restringida a E1 y E2, en un bajo número de copias en estado episomal, y puede permanecer en este estado por un período largo de tiempo, puede ser removido por el sistema inmune, o bien la infección puede activarse e iniciar su etapa productiva¹⁰.

La infección genital es frecuente en los adultos, se adquiere principalmente por contacto sexual. Se estima que 2/3 de las personas que han tenido contacto sexual con una persona infectada, se infectarán con VPH¹⁰.

Mediante técnicas de hibridización molecular de alta sensibilidad, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés), puede considerarse una aproximación a la prevalencia genital de VPH ligeramente inferior al 10% en mujeres de países desarrollados y alrededor del 15% en los países en

vías de desarrollo. Se estima que el volumen de mujeres infectadas por el VPH es de alrededor de 300 millones y unas 490 mil tienen un cáncer de cuello uterino^{16,17}.

La prevalencia de la infección genital por VPH es muy elevada en varones y mujeres jóvenes sexualmente activos, evolucionando en forma natural hacia la curación espontánea, la cual se observa en el 85-90% de los casos. En la segunda década de la vida se estima una prevalencia del 20-25% (pero en algunos grupos de adolescentes la infección puede llegar a afectar hasta un 70% de los individuos). En la tercera década la prevalencia disminuye considerablemente y a partir de los 35 años se mantiene estable estimándose en alrededor de 5%¹⁸.

En algunos estudios se ha observado un peak de prevalencia en mujeres postmenopáusicas, a partir de los 55 años de edad, curva bimodal¹⁸, que ha sido atribuido a la reactivación de una infección latente no detectada en las edades intermedias de la vida o debido al incremento de la susceptibilidad a la infección por el virus, que puede asociarse a la reducción fisiológica de la inmunidad natural en estas mujeres¹⁶, cambios hormonales ocurridos después de la menopausia, principalmente la reducción significativa de la producción de la hormona esteroide y los cambios fisiológicos del cérvix como atrofiaciones del epitelio¹⁹.

El nivel de infección genital en mujeres Chilenas entre los 20 y 65 años, bordea el 14%, cifra muy similar a lo descrito en otros países latinoamericanos como México (14,5%), Costa Rica (16%) y Colombia (14,8%)²⁰.

En los últimos años, se ha comenzado a estudiar la prevalencia de la infección por VPH en zonas extragenitales. En la cavidad oral de adultos asintomáticos con mucosa oral sana al examen físico, se ha encontrado entre 10-67% de portación de VPH dependiendo del lugar de toma de muestra (en criptas amigdalinas habría mayor concentración viral), el tipo de muestra y el método diagnóstico utilizado^{21,22}. Por lo que su prevalencia es controversial, y no se conoce con exactitud²².

El modo de transmisión de este virus a la cavidad oral y faríngea no es del todo claro. Se han sugerido distintas vías de transmisión, incluyendo el paso por el canal vaginal durante el parto de mujeres infectadas, autoinoculación, contacto boca-boca y sexo oral. Los lugares mas frecuentemente afectados en la boca son los labios, paladar, lengua, úvula, amígdalas palatinas y el piso de la boca. Se cree que la saliva tendría un rol protector contra la infección por VPH, dada la presencia de agentes antimicrobianos en ella, como lactoferrina, lisozimas, IgA y citoquinas, pero es controversial, ya que también sucede que esta se acumula en el piso de la boca y los agentes cancerígenos como el tabaco y el alcohol se disuelven en ella, y se cree que de este modo proveería un ambiente más propicio para el desarrollo de lesiones por VPH en el epitelio²³.

El VPH 6 y 11 son los genotipos más comunes encontrados en la cavidad oral, genotipos considerados de bajo riesgo⁴.

Infección por VPH en niños

Existen estudios que han confirmado la detección de VPH en piel y mucosas en niños, pero su mecanismo de transmisión es controversial. Se han sugerido distintas vías de transmisión vertical, transmisión horizontal postparto desde los padres u otros miembros de la familia o personas cercanas al niño, por autoinoculación, abuso sexual, y posiblemente vía indirecta a través de fomites³.

Hay pocos estudios en el mundo relacionados con la infección oral por VPH en niños, por lo que la prevalencia certera de dicha infección no es conocida^{3,24}. En recién nacidos sin lesiones orofaríngeas, se ha encontrado una prevalencia entre 4-87% de VPH en hisopados orales, incluso en recién nacidos de madres no infectadas (ADN VPH genital negativo)²⁵

En el estudio de Rintala y cols (2005)²⁶, las tasas de detección de VPH en aspirados nasofaríngeos de niños asintomáticos, varía entre 0% a 67%, mientras que, en Smith y cols (2007)²⁷, la prevalencia total de la infección por VPH en la cavidad orofaríngea

de niños estadounidenses fue de 1,9%, con una distribución bimodal según edad, en los menores de un año y los adolescentes entre 16 y 20 años presentaron las tasas de prevalencia más altas, 2,5% y 3,3% respectivamente. Además, se observó que las cargas virales disminuían al aumentar la edad del niño, y volvían a incrementarse en asociación al debut sexual en la adolescencia²⁷.

La transmisión vertical puede ser dividida en 3 categorías según el momento en el que se asuma que ocurrió la transmisión de VPH:

- Transmisión peri-conceptual (cercano a la fertilización): teóricamente podría ocurrir por infección del oocito o espermatozoides. ADN del VPH ha sido detectado en un amplio rango de 8% a 64% en muestras de semen en hombres asintomáticos, tanto en fluido seminal como en los espermatozoides y en biopsias de conductos deferentes. En las mujeres, se ha demostrado presencia de VPH tanto en genitales como en ovarios y endometrio, pero el significado de estos hallazgos es incierto. En consecuencia, la infección por VPH podría ocurrir desde la formación del embrión.
- Transmisión prenatal (durante el embarazo): Algunos autores han descrito la presencia de ADN de VPH en líquido amniótico, en sangre de cordón umbilical, en fetos con malformaciones y en fetos de abortos espontáneos de primer trimestre, lo que no implica necesariamente que haya una infección viral en estas muestras, pero podría demostrar el mecanismo a través del cual el VPH pudiera transmitirse de madre a hijo durante el período perinatal. Además hay evidencias que muestran infección por VPH en niños nacidos por cesárea, o de madres sin infección por VPH a nivel genital. Se especula que la infección también podría ocurrir por ascenso del virus por el canal del parto, favorecido por ruptura prematura de membranas²⁸.

La detección de ADN de VPH en muestras de placenta varía de 0 a 42,5%, en líquido amniótico va de 15 a 65%, y en sangre de cordón de 0 a 13,5%²⁸.

- Transmisión perinatal (durante el parto y en etapas posteriores): Las tasas de detección de VPH en cavidad oral en los primeros días de vida varían entre 4% y 72% en aquellos niños nacidos de madre infectadas por VPH genital durante el embarazo, y entre 0,6% y 20% en aquellos niños con madres sin VPH genital detectado durante el embarazo. En los seguimientos, las tasas de infección a las 6 semanas postparto, también varían ampliamente y no se ha visto mayor diferencia entre niños nacidos de madres VPH positivas o negativas²⁹.

Existen estudios que han asociado el tipo de parto con la transmisión vertical de VPH, en donde se ha visto que en los partos vaginales de mujeres infectadas, habría una mayor tasa de transmisión, aunque en cesáreas se han observado tasas de hasta un 8%, por lo que no sería un modo de evitar la transmisión de VPH en los hijos de mujeres infectadas²¹. Sin embargo, el debate acerca de la detección de VPH en cavidad oral de niños es continuo, dado que existe la posibilidad de que refleje sólo una contaminación pasiva y no una verdadera infección³⁰.

Dentro de los factores que podrían aumentar el riesgo de transmisión de VPH desde la madre al hijo, están el número de parejas sexuales de la madre y el tabaquismo, a mayor número de parejas sexuales y mayor consumo de tabaco, aumenta el riesgo de infección por VPH en la madre y como consecuencia aumentaría el riesgo de transmisión al hijo^{31,32}.

Las lesiones más típicas en niños causadas por VPH son las verrugas de piel, y dentro de las lesiones en tracto aerodigestivo, las infecciones por VPH en la laringe como la papilomatosis laríngea recurrente^{24,31}. De hecho, los papilomas orales son las lesiones epiteliales más frecuentes (7,5%) en la mucosa oral de los niños³⁰. Estas lesiones aparecen en niños cuyas edades están comprendidas entre cinco y once años con predominio en el sexo femenino¹³. En distintos estudios, se ha detectado ADN de VPH hasta en un 40% en cavidad oral de niños estudiados por lesiones orofaríngeas. Los genotipos más frecuentemente encontrados en cavidad

oral y faríngea, tanto en niños asintomáticos como en aquellos que presentan lesiones, son VPH 6, 11, 16 y 18³⁰.

VPH y Cáncer

El papel etiológico de las infecciones por VPH para el desarrollo del cáncer del tracto genital inferior tanto femenino como masculino está bien establecido⁹. Las infecciones por VPH son responsables de todos los casos de carcinoma escamoso celular y de adenocarcinoma de cuello uterino, así como de subgrupos de cánceres de vulva, vagina, ano y de pene. Los genotipos 16, 18, 31 y 45 son los predominantes encontrados en cánceres de cuello uterino, alcanzando en conjunto el 90% de los casos, y siendo el VPH 16 el que está presente en más de la mitad de todos los casos mundiales³³.

Se han establecido diversos factores y cofactores de riesgo involucrados en el desarrollo de cáncer por VPH. En relación al virus, se encuentran el tipo viral, la persistencia de la infección inicial y la infección mixta con varios tipos de VPH. Los factores ambientales del huésped incluyen el nivel de esteroides (relacionado a la ingesta prolongada de anticonceptivos hormonales, el número de embarazos y la edad, en el desarrollo de cáncer cervicouterino), el efecto mutagénico de las sustancias carcinogénicas del tabaco, la conducta sexual de la población (incluyendo la edad de la primera relación sexual, el número de parejas y la higiene), el estado socioeconómico y nivel de escolaridad (que pudieran relacionarse a la nutrición, los niveles de antioxidantes y el acceso a los sistemas de cribado), el estado inmunológico (que disminuye con la edad, en personas VIH positivas o con trasplante de órganos y varía debido a polimorfismos del complejo mayor de histocompatibilidad), la susceptibilidad genética y la coinfección con otros patógenos. En este punto resalta *Chlamydia trachomatis* en las patologías de cuello uterino¹⁹. Hasta la fecha, la única localización no genital para la cual se ha evidenciado una asociación igualmente sólida a favor de un papel etiológico del VPH corresponde a un grupo de cánceres de cabeza y cuello.

En 1983 Syrjanen y cols.³⁴ fueron los primeros en describir la relación entre el VPH y el cáncer de cabeza y cuello, basados en la evidencia de que este virus es epiteliotrópico, en la similitud entre el epitelio genital y el aerodigestivo, y que en estudios previos se había demostrado que el VPH podía inmortalizar queratinocitos orales⁵. Actualmente, los cánceres de cabeza y cuello constituyen la sexta causa de cáncer a nivel mundial⁵.

La asociación del VPH con el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se ha reportado en la literatura según la localización, siendo la orofaringe la de mayor importancia con 21 %-100 % de positividad, cavidad oral con 12 %-71 % y laringe 4 %-24 %. Además se ha encontrado una fuerte asociación del VPH con respecto a la localización: los tumores de orofaringe, sobre todo de amígdala y base de lengua, presentan una mayor positividad para VPH con respecto a otras regiones anatómicas. Se ha descrito que el epitelio escamoso que reviste el anillo de Waldeyer puede ser particularmente susceptible a la infección por VPH debido a la facilidad que posee el virus de acceder a las células basales de la mucosa en las criptas de la amígdala³⁵.

Se han reportado tasas de detección de ADN de VPH en lesiones precancerosas y cancerosas de cabeza y cuello entre 0% y 100%. Esta variación extrema se piensa que se debe a las diferencias de las poblaciones estudiadas, etnia, localización geográfica, tamaño muestral estudiado y los distintos métodos utilizados en la detección de VPH¹⁰.

La alta prevalencia de la infección por este virus en caso de lesiones bucales premalignas indica que la infección podría ser un evento temprano en el proceso de transformación maligna de las células epiteliales de la cavidad bucal¹⁴, y que la presencia de VPH-AR constituiría un factor de riesgo en alrededor del 26% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, independiente de otros factores de riesgos conocidos como el tabaquismo y el consumo de alcohol. El genotipo 16 se ha detectado en más del 90% de los cánceres de orofaringe positivos para VPH^{36,37}.

Sin embargo, pese a que no se sabe el mecanismo, se ha evidenciado que el tener infección por VPH sería uno de los factores pronósticos positivos más significativos en la evolución de los pacientes con cáncer orofaríngeo, con un 60% a 80% de reducción en el riesgo de morir por esta causa⁵. Esto estaría asociado a pacientes con una enfermedad de menor agresividad, con tumores bien diferenciados, en estadios menores, que responden mejor a radioterapia (mayor radiosensibilidad), lo que generaría mejores tasas de supervivencia general y libre de enfermedad³⁸. Es por esto que, en las últimas décadas ha habido un interés progresivo en establecer la portación de VPH en cavidad orofaríngea a distintas edades, detectar los genotipos de VPH presentes y su potencial rol en la patogénesis de carcinoma de células escamosas en la cavidad oral y faríngea³⁹.

Mecanismo oncogénico

El mecanismo oncogénico de VPH implica alteraciones moleculares causadas por la sobreexpresión de las oncoproteínas virales E6 y E7. La proteína E6 a través de la interacción con E6-AP se une a p53, induciendo una rápida degradación de éste. La inactivación de p53 bloquearía los mecanismos de reparación del ADN frente a un daño leve y los mecanismos de la apoptosis cuando el daño al ADN es mayor^{40,41}. La oncoproteína viral E7 complementaría el rol de E6, a través de la interacción con proteínas de la familia del retinoblastoma (pRb, p107 y p130) que están interactuando con el factor de transcripción E2F. El complejo pRb/E2F controla la progresión de ciclo celular, cuando E7 se une a pRb, se liberaría E2F permitiendo la entrada en la fase S del ciclo celular y activando la proliferación celular¹³. En la infección persistente transformante, los eventos normales del ciclo replicativo viral se ven alterados, se produce una desregulación en la expresión de E6 y E7, las proteínas oncogénicas virales, y una pérdida de las proteínas reguladoras de la replicación viral, específicamente E2. Se postula que esta desregulación se produciría por la integración del genoma viral al de la célula infectada, aunque aún existen antecedentes contradictorios de este proceso¹³.

VPH e inmunidad

A nivel inmunológico, la inmunidad celular y la inmunidad innata son probablemente los factores más importantes en la resistencia del huésped, así como la participación de las células presentadoras de antígenos y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias⁶.

Los VPH son inmunógenos naturales débiles debido a que su propio patrón de composición molecular no es reconocido por los receptores de las células de la respuesta innata (receptores similares a Toll como TLR3 y TLR9); al estar constituidos por una doble cadena de ADN son menos inmunogénicos que los virus constituidos por ARN, no contienen señales intramoleculares de peligro virales (p. ej., CpG en su ADN) y su expresión se presenta en escasa cantidad (comparada con la expresión de proteínas inmunogénicas de otros virus), provocando una respuesta inmune innata local mínima. La infección por VPH en los queratinocitos o en las lesiones preinvasoras epiteliales está limitada a las células superficiales y no penetra por debajo de la membrana basal. Los VPH mantienen un ciclo de vida sin salir del queratinocito infectado, inducen proliferación celular más que histólisis, no provocan lisis celular, por ello no inducen una respuesta inflamatoria potente; no se liberan citoquinas ni mediadores solubles del complemento y con esto se impide la activación y el sinergismo entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Además, en general los queratinocitos y particularmente las células epiteliales escamosas diferenciadas tienen naturalmente limitada capacidad de procesar y presentar antígenos. Por otra parte, la infección por VPH no provoca fase virémica y por lo tanto cursa sin presentación sistémica del antígeno, ya que su replicación está insertada en el programa de diferenciación del queratinocito. Por todo esto, frecuentemente el huésped queda inmunológicamente ignorante de la infección¹⁹. Se ha demostrado que la persistencia de VPH en niños varía de 2 días a 3 años aproximadamente, y que los individuos que generan una infección persistente y aquellos que son inmunodeficientes tienen mayor riesgo de desarrollar infecciones más agresivas, incluso cáncer a futuro^{10,42}.

Vacunas

Como se mencionó anteriormente, los genotipos virales encontrados con mayor frecuencia (70%) en lesiones malignas y premalignas son 16 y 18, mientras que en condilomas y papilomas se detectan generalmente los tipos 6 y 11 (90%); de allí que estos cuatro genotipos de VPH sean blancos en el desarrollo de modelos experimentales y en la evaluación de procedimientos terapéuticos y profilácticos¹⁹.

La infección por VPH podría prevenirse usando vacunas específicas contra el virus. En los últimos años, se ha presenciado el desarrollo de 2 vacunas para VPH que consisten en proteínas L1 auto-ensambladas en cápsidas vacías o Partículas Similares al Virus (Virus Like Particles: VLP's) que desde el punto de vista inmunológico son casi idénticas a los viriones originales¹⁶.

Se han reportado cifras de 86% a 100% de protección contra la infección por VPH a nivel genital, en el corto período de prueba que llevan estas vacunas, pero aún faltan muchos temas por evaluar en torno a esta infección y el uso de estas vacunas, como lo es la edad certera de inicio de la vacunación, la extensión a vacunar a hombres que son los portadores principales de VPH, ver que pasa con las cifras de cánceres no genitales, y la de lesiones benignas en el caso de la vacuna Gardasil que cubre los genotipos 6 y 11⁵.

Dado que en Chile, no existen estudios sobre la prevalencia de VPH en faringe en ningún grupo etario, que la incidencia y prevalencia de la infección es cada vez más alta a nivel mundial, y se ve cada vez más asociada al desarrollo de distintos tipos de cánceres, existe la necesidad de resaltar la importancia de realizar un diagnóstico precoz en niños portadores asintomáticos, lo que permitiría una monitorización de la evolución y un tratamiento preventivo adecuado si aparece una lesión, evitando su transformación y progresión a lesiones premalignas y/o malignas. Por esto, y también por el impacto que puede significar implementar las distintas medidas de prevención a nivel de salud pública, como es la vacunación, nuestro interés es determinar si existe infección por VPH en cavidad faríngea de una

población de lactantes Chilenos del área norte de Santiago, y determinar los genotipos de VPH presentes en los infectados.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La prevalencia de la infección por VPH en faringe de lactantes del área norte de Santiago es mayor a la prevalencia reportada en lactantes estadounidenses.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Detectar si existe infección por VPH en cavidad faríngea de una población de lactantes Chilenos del área norte de Santiago, hospitalizados por infección respiratoria aguda (IRA), y determinar los genotipos de VPH en los infectados.

Objetivos Específicos:

1. Estandarización de la PCR convencional y detección del gen de β -globina humana y del gen TLR4 humano en muestras de ANF para determinar la calidad de las muestras.
2. Establecer la prevalencia de VPH genérico en cavidad faríngea de los lactantes en estudio.
3. Genotipificación y detección de la frecuencia de los genotipos de VPH, en muestras de ANF positivas para VPH por PCR convencional, mediante la técnica de Linear Array.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cálculo estadístico del tamaño muestral

Para una prevalencia estimada de 2.5% de portación de VPH en cavidad orofaríngea en niños menores de dos años (según Smith et al.²²), con un nivel de confianza de 95% y un error de estimación de un 2%, se necesitan 235 muestras. Esto fue calculado en base a la fórmula: $n \geq (z/d)^2 * p * (1-p)$ donde $z=1.96$ (percentil de la distribución normal) d =error de estimación p =prevalencia esperada.

Muestras clínicas y recopilación de datos

Para realizar este estudio, se analizaron muestras de aspirados nasofaríngeos de 291 lactantes de entre 0 y 24 meses de edad, con IRA por virus respiratorio sincicial (VRS) o Adenovirus (ADV), hospitalizados en el área norte de Santiago. Estas muestras habían sido recolectadas previamente para 2 estudios: Fondecyt regular 2005 – 1050513, y 2002 – 1020544, almacenadas en medio Hanks a -80°C hasta su utilización, y su uso para este proyecto, fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Chile (anexos).

Se contaba con una base de datos incompleta de antecedentes personales y clínicos de los niños incluidos en estos estudios previos, por lo que se revisaron las fichas clínicas en busca de datos relevantes que se pudieran asociar a la infección de VPH en cavidad faríngea, como son: el número de hermanos, número de parejas sexuales de la madre, infección genital por VPH en la madre, tabaquismo en los padres, tipo de parto, nivel socioeconómico y comorbilidades inmunosupresoras de cada lactante.

Obtención del material genético

Cada muestra (20µL) se trató con buffer de digestión: 150ul de TNE 1X (1M Tris-HCl pH8.0, 5M NaCl, 0,5M EDTA pH 8.0), 20ul de dodecil sulfato de sodio 10% (SDS) y 10ul de Proteinasa K [10µg/µL] (Merck). La digestión se realizó a 56°C durante 30 minutos en baño termorregulado.

La extracción de ADN para todas las muestras se realizó mediante fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (Winkler). Posterior a la digestión con Proteinasa K, se adicionaron 200ul de fenol básico a cada muestra, se mezcló por 2 min, y se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C por 3 min. Se aspiraron 150ul de la fase superior y se le adicionaron 150ul de fenol-cloroformo básico, se mezcló por 2 min, y se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C por 3 min. Se tomaron 100ul de la fase superior y se le adicionaron 100ul de cloroformo:alcohol-isoamílico 24:1, se mezcló por 2 min y se volvió a centrifugar a la misma velocidad y tiempos anteriores. Se tomaron 40 ul de esta fase superior, evitando aspirar el cloroformo de la fase inferior. Esta muestra stock fue mantenida a -20°C.

La concentración de ADN presente en cada muestra fue cuantificada mediante espectrofotometría en el equipo *Biomate3, Thermo Spectronic*. Posteriormente, se prepararon alícuotas (200ul) de 50ng/ul de ADN para normalizar la carga en la PCR. Estas alícuotas fueron mantenidas a -20°C.

Detección del gen de la β -globina humana mediante PCR convencional

Para determinar la calidad del ADN de cada muestra y la presencia de posibles inhibidores de la PCR, se realizó una PCR convencional para el gen de β -globina utilizando los partidores pC03 y B3 descritos previamente en la literatura y que delimitan una región de 106 pb^{43,44,45}. La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía 6 μ L de muestra, 1X de Buffer libre de MgCl₂ (10X), 1,5 U Taq ADN polimerasa (Biotools), 4 mM MgCl₂, 0,6 μ M de cada partidor, 0,2 mM de dNTP (Omega Bio-Tek) y agua libre de nucleasas para completar el volumen de 50 μ L. La amplificación se realizó en el termociclador *Thermal Cycler PXE0,2 (Thermo Electrón USA)*, bajo las siguientes condiciones: una etapa preliminar de denaturación a 96°C por 7min, luego 35 ciclos de 95°C por 1min, 56°C por 45s y 72°C por 45s, y una etapa final de elongación a 72°C por 5min. La secuencia de los partidores se muestra en la tabla 1.

En todas las reacciones de amplificación, se incluyó como control positivo el ADN purificado de células de sangre periférica de donantes de banco de sangre, y como control negativo agua libre de nucleasas.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (LAFKEN, Fermelo Biotec) al 2% teñidos con bromuro de etidio y se utilizó como marcador de tamaño molecular un estándar de 100pb (Winkler Ltda). La electroforesis se realizó a 120V durante 25 min en buffer TBE 0,5X (45mM Tris/Borato, 1mM EDTA pH 8.0). Se consideraron positivas, aquellas muestras en las que se visualizó una banda de aproximadamente 106pb.

Reextracción de material genómico y nueva PCR para las muestras con β -globina negativa por PCR convencional

A aquellas muestras que resultaron negativas para β -globina por PCR convencional en la primera instancia (n=35), se les realizó una segunda extracción de ADN utilizando el mismo método descrito anteriormente (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico), se midieron las concentraciones de DNA por espectrofotometría, se normalizaron a 50ng/ul, y se les repitió la PCR para β -globina descrita en el punto anterior.

Detección del gen TLR4 humano mediante PCR convencional

A modo de verificar la calidad de la muestra considerando que el fragmento de VPH amplificado es mayor que el fragmento de β -globina amplificado, se realizó una PCR convencional para amplificar un fragmento del gen TLR4 humano en todas las muestras. El fragmento amplificado presenta un tamaño de 167 pb que es mayor que el fragmento de VPH que se amplificará.

Los partidores habían sido diseñados anteriormente en el laboratorio de Virología, ICBM, Universidad de Chile (Dra. Sandra Ampuero).

La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía 6 μ L de muestra, 1X de Buffer libre de MgCl₂ (10X), 1,5 U Taq ADN polimerasa (Biotools), 4 mM MgCl₂,

0,6 μM de cada partidor, 0,2 mM de cada dNTP (Omega Bio-Tek) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen de 50 μl . La amplificación se realizó en el equipo *Thermal Cycler PXE0,2* (Thermo Electrón USA), con una etapa preliminar de denaturación a 95°C por 5min, luego 30 ciclos de 95°C por 45s, 58°C por 45s y 72°C por 45s, y finalmente una etapa de elongación a 72°C por 10min, que se mantuvo a 4°C hasta su retiro. La secuencia de los partidores se muestra en la tabla 1.

En todas las reacciones de amplificación, se incluyó como control positivo el ADN humano extraído de células de sangre periférica de donantes de banco de sangre, y como control negativo agua libre de nucleasas.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y fueron teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de tamaño molecular un estándar de 50bp (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 120V durante 25 min en buffer TBE 0,5X. Se consideraron positivas aquellas muestras en las que se visualizó una banda de aproximadamente 167pb.

Detección de VPH mediante PCR convencional

Para la detección de VPH, se realizó una PCR convencional con partidores universales GP5⁺/GP6⁺, que amplifican un segmento de 150pb ubicado dentro de la región L1 del genoma viral.

La reacción se realizó en un volumen final de 50 μL que contenía 6 μL de muestra, 1X de Buffer libre de MgCl_2 (10X), 1,5 U Taq ADN polimerasa (Biotools), 2 mM MgCl_2 , 0,5 μM de cada partidor y 0,2 mM de dNTP (Omega Bio-Tek) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 50 μl . La amplificación se realizó de acuerdo a un protocolo ya descrito⁴⁶, bajo las siguientes condiciones: una etapa de denaturación a 95°C por 5min, luego 40 ciclos de 95°C por 1min, 40°C por 2min y 72°C por 1,5min, una etapa final de elongación a 72°C por 10min, y se mantuvo a 4°C hasta su retiro. Esta amplificación se realizó en el equipo Thermal Cycler PXE0,2 (Thermo Electrón USA).

En todas las reacciones de amplificación, se incluyó como control positivo el ADN purificado de células HeLa, que contienen ADN de VPH-18, y como control negativo agua libre de nucleasas.

La secuencia de los partidores se muestra en la tabla 1.

Previamente, se estandarizó la reacción variando las concentraciones de magnesio (2mM, 3mM, 4mM) y de cada partidor (0,2uM, 0,3uM, 0,4uM) (figura 3).

Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de tamaño molecular un estándar de 50pb (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 120V durante 25 minutos en buffer TBE 0,5X. Se consideraron positivas para VPH aquellas muestras en las que se visualizó una banda de aproximadamente 150 pb.

A aquellas muestras en las que se observó una banda positiva débil, de baja intensidad para VPH en el gel, se les realizó una segunda PCR para VPH con los mismos partidores y protocolo descrito anteriormente, a modo de confirmación.

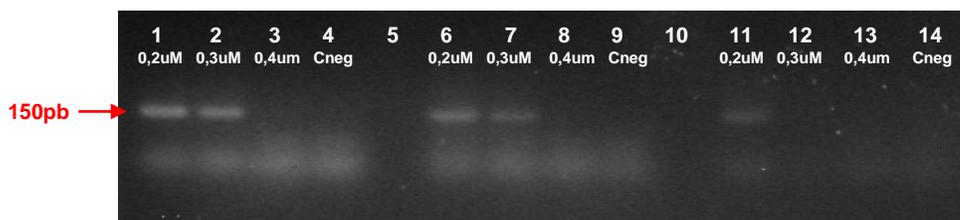


Figura 3. Prueba de concentraciones de magnesio (2mM, 3mM, 4mM) y de partidores (0,2uM, 0,3uM, 0,4uM) para la detección de VPH mediante PCR utilizando plasmidio VPH 16, en gel de agarosa al 2% tenido con Bromuro de etidio. Se cargaron los productos de amplificación de las reacciones obtenidas con la concentración de 2mM de MgCl₂ en los carriles del 1 al 4, con 3mM de MgCl₂ en los carriles del 6 al 9, y con 4mM de MgCl₂ en los carriles 11 al 14. Los carriles 1, 6 y 11 corresponden a los productos con 0,2uM de partidores; los carriles 2, 7 y 12 a los productos con 0,3uM de partidor, y los carriles 3, 8 y 14 a concentración de 0,4uM de partidor. En los carriles 4, 9 y 14 se colocaron los controles negativos respectivos. Los carriles 5 y 10 no contienen muestras.

Sensibilidad de la detección de VPH mediante PCR convencional con partidores genéricos GP5⁺/GP6⁺

Para probar la sensibilidad de detección de VPH mediante este protocolo, se realizaron diluciones seriadas de células HeLa (5000, 500, 50, 25 y 5 copias VPH/ul), con las que se realizó una PCR convencional con partidores genéricos GP5⁺/GP6⁺. Las diluciones se realizaron con una muestra negativa para VPH, probada por una PCR anterior con los mismos partidores. Esta misma muestra VPH negativa (G1) se incluyó como segundo control negativo, además del control negativo interno realizado con agua libre de nucleasas. Como control positivo, se incluyó una muestra conocida positiva para VPH (G53). Se detectó hasta 5 copias VPH/ul. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 2%, la electroforesis se realizó igual que en puntos anteriores. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (figura 4).

También se realizó una curva con plasmidio de VPH-16, con concentraciones de 5000, 500 y 50 copias, usando el mismo protocolo anterior.



Figura 4. Detección de la sensibilidad de la PCR convencional para VPH con partidores genéricos GP5⁺/GP6⁺, en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Se colocó un marcador de 50pb en el primer carril. En los demás carriles fueron cargados los productos de amplificación de la muestra de ANF G1 (VPH negativa) mezclada con distintas concentraciones de ADN proveniente de células HeLa (VPH-18), como se muestra en la figura. El control positivo fue cargado en el segundo carril, y el control negativo en el carril 10.

Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')	Amplicón (pb)	
Gen humana	β-globina	Primer PC03 F	ACACAACACTGTGTTCACTAGC	161
		Primer PB3 R		
Gen TLR4		Primer TLR4 F	CAAATCTCTCAAAAGGCTTAC	167
		Primer TLR4 R		
GP5+/GP6+		Primer GP5+F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	151
		Primer GP6+R		

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación del gen de la β-globina humana, gen TLR4 humano y VPH genérico.

Sensibilidad del método Fenol cloroformo:alcohol-isoamílico para la extracción de ADN

A modo de medir la sensibilidad del método de extracción de ADN de las muestras, se tomó una muestra VPH negativa por PCR (G1), la cual se mezcló en tubos independientes con 5000, 500 y 50 copias de VPH-16 respectivamente. Se utilizó como control positivo de extracción la misma muestra (G1), y como control negativo TNE. Se sometieron al proceso de extracción de ADN con el mismo protocolo descrito en "Obtención del material genético". Luego se les realizó la detección del gen de la β-globina humana. En esta PCR se usó como control positivo ADN humano extraído de células de sangre periférica de donantes de banco de sangre, y como control negativo agua libre de nucleasas, además del control negativo de la extracción con TNE. También se les realizó detección de VPH con PCR convencional con partidores GP5⁺/GP6⁺, usando como control positivo 50.000 copias de VPH-16, y como control negativo agua libre de nucleasas. Se detectaron hasta 50 copias de VPH-16.

Los amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2%, la electroforesis se realizó en las mismas condiciones que en puntos anteriores. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (no se muestran los resultados).

Genotipificación de VPH mediante ensayo de Linear Array

Todas las muestras positivas para VPH por PCR convencional utilizando los partidores GP5⁺/GP6⁺ se genotipificaron usando el kit Linear Array (LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test, Roche). Este ensayo detecta treinta y siete genotipos de VPH: 6,11,16,18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 y CP6108, mediante sondas específicas e incluye un control interno para β -globina. Este kit incluye cuatro procesos: extracción de ADN de las muestras, amplificación por PCR de VPH y β -globina, hibridación y detección, que fueron llevadas a cabo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó la extracción de ADN celular y de VPH de las muestras a través de denaturación con proteinasa K a elevadas temperaturas, y su purificación se obtuvo a través de columnas con membranas de sílica usando vacío. La PCR se realizó en 100ul de volumen final, que consistían en 50ul de la extracción de ADN de la muestra, más 50ul de Mix que contenía MgCl₂, KCl, amplitaq Gold ADN polimerasa, uracil-N-glicosilasa, dNTPs y partidores PGMY biotinilados junto a partidores de β -globina. La amplificación se realizó con el protocolo recomendado por el fabricante, bajo las siguientes condiciones: una etapa de denaturación a 50°C por 2min, seguidas de 95°C por 9min, luego 40 ciclos de 95°C por 30seg, 55°C por 1min y 72°C por 1min, una etapa final de elongación a 72°C por 5min, y se mantuvo 72°C hasta su retiro. Esta amplificación se realizó en el equipo *Thermal Cycler PXE0,2 (Thermo Electrón USA)*. Se incluyó un control positivo incluido en el kit, y un control negativo de TNE desde el proceso de extracción.

Los productos de PCR se mezclaron con 100ul de solución denaturante provista por el kit, de los cuales se tomaron 150ul para hibridarlos con las tiras que contenían las sondas específicas para 37 genotipos distintos de VPH y para β -globina. Estas se sometieron a varios lavados astringentes consecutivos, hasta la visualización colorimétrica de bandas sobre las tiras. Se consideraron válidas aquellas reacciones en las que se visualizaron las 2 bandas para β -globina (de alto y bajo tamaño molecular), y se consideraron positivas a aquellas tiras en las que apareció una banda azul en alguno de los genotipos. Estas fueron interpretadas usando la guía de referencia provista por el fabricante.

Todas las reacciones de detección se llevaron a cabo en un recipiente especial que contenía 24 canaletas para posicionar las tiras reactivas. Para evitar contaminaciones cruzadas, se realizaron 10 reacciones cada vez, con un espaciado mínimo de 2 canaletas entre cada tira.

DetECCIÓN DE VPH MEDIANTE PCR CONVENCIONAL A PARTIR DE EXTRACCIONES DE ADN REALIZADAS POR LINEAR ARRAY

A todas las muestras que se analizaron por Linear Array, se les realizó una nueva PCR convencional utilizando los partidores GP5⁺/GP6⁺, pero utilizando el ADN extraído mediante el kit de Linear Array. El ADN de estas extracciones se cuantificó a través del espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop 1000*, que utiliza el software V3.71 para visualizar los resultados. Posterior a esto, las muestras se diluyeron a concentración de 50ng/ul con agua. Se utilizaron como templado 6ul de cada muestra, con el mismo protocolo de PCR GP5⁺/GP6⁺, descrito anteriormente. Los resultados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se utilizó como marcador de tamaño molecular un estándar de 100pb, en las mismas condiciones descritas en puntos anteriores. Se consideraron positivas para VPH aquellas muestras en las que se visualizó una banda de 150 pb.

RESULTADOS

Datos Epidemiológicos de la población en estudio

Según la base de datos obtenida de los estudios originales en donde se recolectaron estas muestras, y de la revisión de fichas clínicas, de un total de 291 niños ingresados a este estudio, la edad promedio fue de 4,5 meses (rango: 5días a 24 meses). Sólo en un subgrupo de 120 lactantes se logró obtener datos acerca del género y el tiempo de lactancia materna, con un total de 63 (53%) hombres y 57 (47%) mujeres, y una lactancia materna exclusiva promedio de 1,8 meses (rango: 0 a 6 meses) en 69 de ellos (64,1%). Los diagnósticos de ingreso y egreso para toda la población en estudio, fueron bronquiolitis o bronconeumonía. No se pudieron obtener datos acerca del número de hermanos, número de parejas sexuales de la madre, tabaquismo en padres, infección genital por VPH en la madre, tipo de parto, nivel socioeconómico y comorbilidades inmunosupresoras de cada lactante.

Determinación de Calidad de las muestras de ANF

Se extrajo ADN de las 291 muestras de ANF. Todas obtuvieron concentraciones medibles de ADN mediante espectrofotometría.

Para determinar la calidad de las muestras, a todas ellas se les realizó la PCR para β -globina. Los resultados se observan en la Tabla 2. Los geles de los productos amplificados se muestran en la figura 5.

Muestras ANF	Positivas	Negativas	TOTAL
PCR β -globina	284	7	291

Tabla 2. Resultados obtenidos en la detección de β -globina en las muestras de ANF mediante PCR.

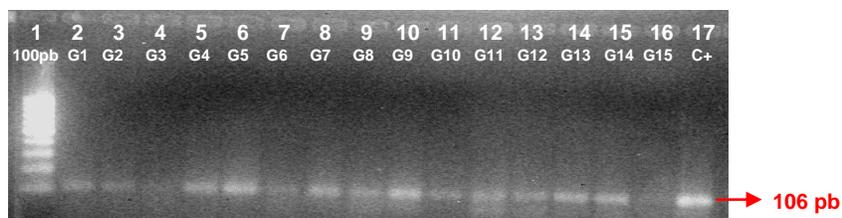


Figura 5. Detección del gen de β -globina (106pb) en muestras ANF en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Se colocó un marcador de tamaño molecular de 100pb como se indica en la figura. En los otros carriles se cargaron los amplificados de las muestras de ANF (G1 a G14). El control positivo se cargó en el último carril.

Considerando la detección de β -globina como gen de referencia en cuanto a calidad de la muestra, sólo el 2,5% de las muestras se deberían excluir del presente estudio. Sin embargo, al reanalizar el tamaño del fragmento de β -globina que se amplifica (106pb), y compararlo con el amplificado que se debe obtener para VPH utilizando los partidores GP5⁺/GP6⁺, de 151pb, se decidió realizar otro PCR de un gen celular humano pero que su producto amplificado presenta un tamaño igual o mayor al detectado para VPH. Con este nuevo amplificado se evitaría estar evaluando muestras que tengan un grado de degradación tal, que permite amplificar el fragmento de β -globina, pero no fragmentos de mayor tamaño, con lo que no podríamos asegurar que un resultado negativo para VPH estuviera dado por la degradación de la muestra y no porque no existe genoma de VPH presente. Por tal motivo se realizó una PCR a todas las muestras de ANF para el gen celular TLR4, cuyo amplificado presenta un tamaño de 167pb (mayor al del VPH). Los resultados de esta amplificación se muestran en la Tabla 3 y el gel representativo en la figura 6.

Muestras ANF	Positivas	Negativas	TOTAL
PCR TLR4	160	131	291

Tabla 3. Resultados obtenidos en la detección del gen TLR4 en las muestras de ANF mediante PCR.

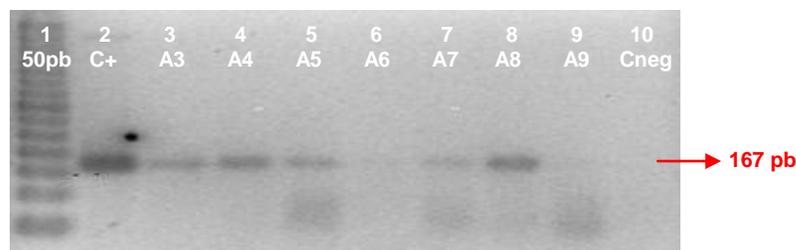


Figura 6. Detección del gen TLR4 (167pb) en muestras ANF en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Se colocó un marcador de tamaño molecular de 50pb como se indica en la figura. En los otros carriles se cargaron los amplificados de la PCR de TLR4 (muestras A3-A9). El control positivo se cargó en el segundo carril y el negativo en el último carril.

Obtenidos estos resultados, 55% de las muestras de ANF (160/291) presenta una calidad adecuada para realizar el estudio de prevalencia de VPH.

Detección de VPH por PCR convencional

Posteriormente a la estandarización de la técnica, se realizó la detección de VPH utilizando los partidores universales GP5⁺/GP6⁺, de todas aquellas muestras que resultaron TLR4 positiva (n=160). Estos resultados se muestran en la tabla 4 y figuras 7 y 8. Cabe destacar además que todas aquellas muestras que resultaron VPH positivas tienen una PCR positiva para β-globina.

Si se consideran las muestras TLR4 positivas, la prevalencia de VPH en los ANF es de 31% (49/160), cifra mucho mayor a la reportada por Smith et al. (2007) en una población similar de lactantes estadounidenses.

Muestras ANF	Positivas	Negativas	TOTAL
PCR GP5 ⁺ /GP6 ⁺	49 (31%)	111 (69%)	160

Tabla 4. Resultados obtenidos en la detección de VPH utilizando los partidores universales GP5⁺/GP6⁺ en las muestras TLR4 positivas mediante PCR.

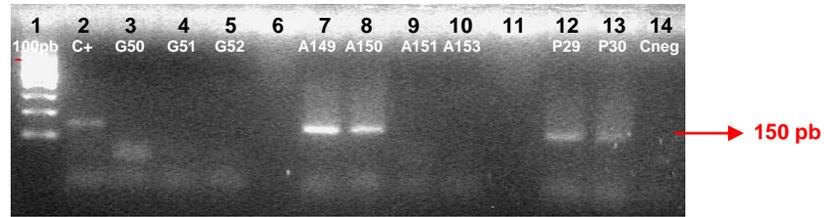


Figura 7. Detección de VPH (150p) en muestras ANF en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Se colocó un marcador de tamaño molecular de 100pb como se indica en la figura. En los otros carriles se cargaron los amplificados de la PCR de VPH con partidores GP5⁺/GP6⁺ de muestras TLR4 positivas (G50, G51, G52, A149, A150, A151, A153, P29 y P30). El control positivo se cargó en el segundo carril y el negativo en el último carril.

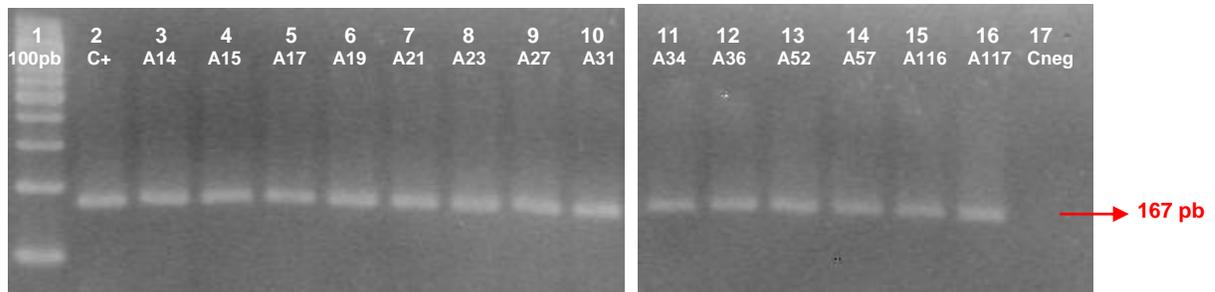


Figura 8. Detección del gen TLR4 (167pb) de aquellas muestras VPH positivas mediante PCR convencional, en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Se colocó un marcador de tamaño molecular de 100pb como se indica en la figura. En los otros carriles se cargaron los amplificados de la PCR de TLR4 de algunas muestras positivas para VPH (A14 a A117). El control positivo se cargó en el segundo carril y el negativo en el último carril.

Determinación de genotipos de VPH mediante el ensayo de Linear Array

Se genotificaron las 49 muestras VPH positivas obtenidas con el PCR-GP5⁺/GP6⁺ mediante el Kit Linear Array. Sólo en ocho muestras se obtuvieron genotipos detectables de VPH (16,3%) (tabla 5). Dos (25%) de ellas fueron positivas sólo para el genotipo VPH-58, tres (37,5%) positivas sólo para genotipo VPH-16, una positiva sólo para genotipo VPH-18, una (12,5%) sólo positiva para genotipo VPH-11 y una (12,5%) muestra con infección múltiple para genotipos VPH-16 y 18 (tabla 6).

Todas las muestras analizadas mediante Linear Array obtuvieron una banda visible de β -globina positiva (control interno del kit), lo que confirma un buen proceso de extracción de ADN de las muestras (figura 9).

Muestras con PCR GP5+/GP6+ Positivas	VPH Positivas	VPH Negativas	TOTAL
Linear Array	8	42	49

Tabla 5. Detección de VPH mediante ensayo de Linear Array. Se realizó este ensayo a las 49 muestras VPH positivas obtenidas en la PCR convencional con partidores GP5⁺/GP6⁺.

Muestras	Genotipo de VPH
G53	58
G87	11
G59	58
A19	16
A21	16
A23	16
A27	16,18
A213	18

Tabla 6. Genotipos de VPH encontrados en las muestras analizadas por Linear Array. Se genotipificaron las 49 muestras VPH positivas obtenidas con el PCR GP5⁺/GP6⁺ mediante el kit Linear Array.

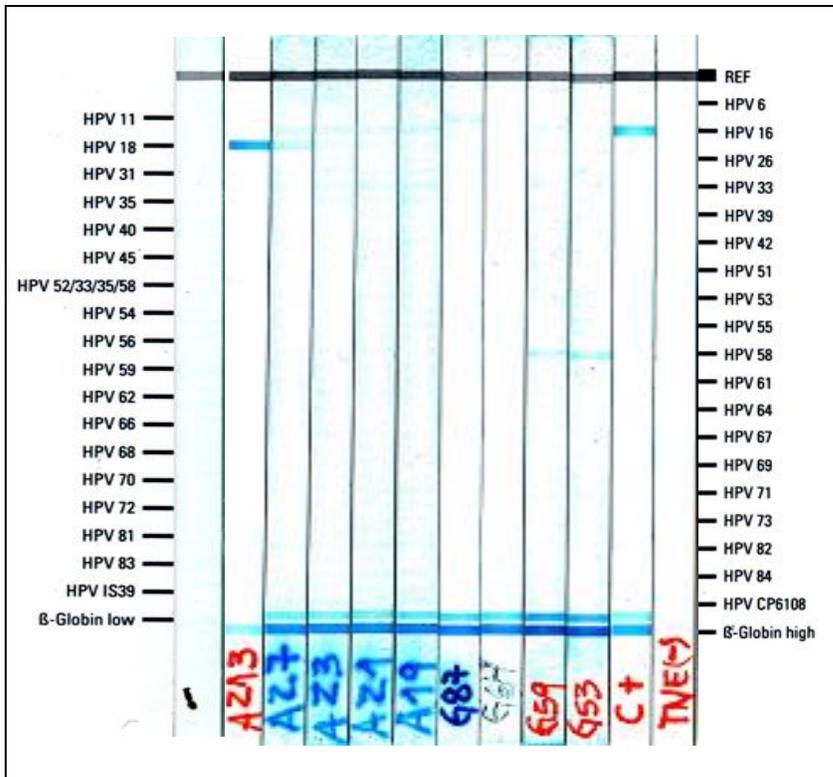


Figura 9. Tiras reactivas obtenidas mediante el ensayo de Linear Array. Se aprecian las tiras con bandas positivas para VPH y sus genotipos según el marcaje a ambos lados, entregado por el kit. Sólo la tira G64 es negativa para estos genotipos de VPH.

Detección de VPH por PCR convencional a partir de extracciones de ADN realizadas con el ensayo de Linear Array

Se realizó la detección de VPH mediante PCR con partidores universales GP5⁺/GP6⁺, utilizando el ADN extraído de las muestras de ANF que se sometieron al ensayo de Linear Array. Se obtuvieron 46 muestras positivas y 3 muestras negativas (G2, G64 y G65) para VPH como se observa en la tabla 7 y figura 10.

Muestras ANF	Positivas	Negativas	TOTAL
PCR GP5 ⁺ /GP6 ⁺	46	3	49

Tabla 7. Detección de VPH por PCR convencional con partidores GP5⁺/GP6⁺, en muestras ANF sometidas al ensayo de Linear array.

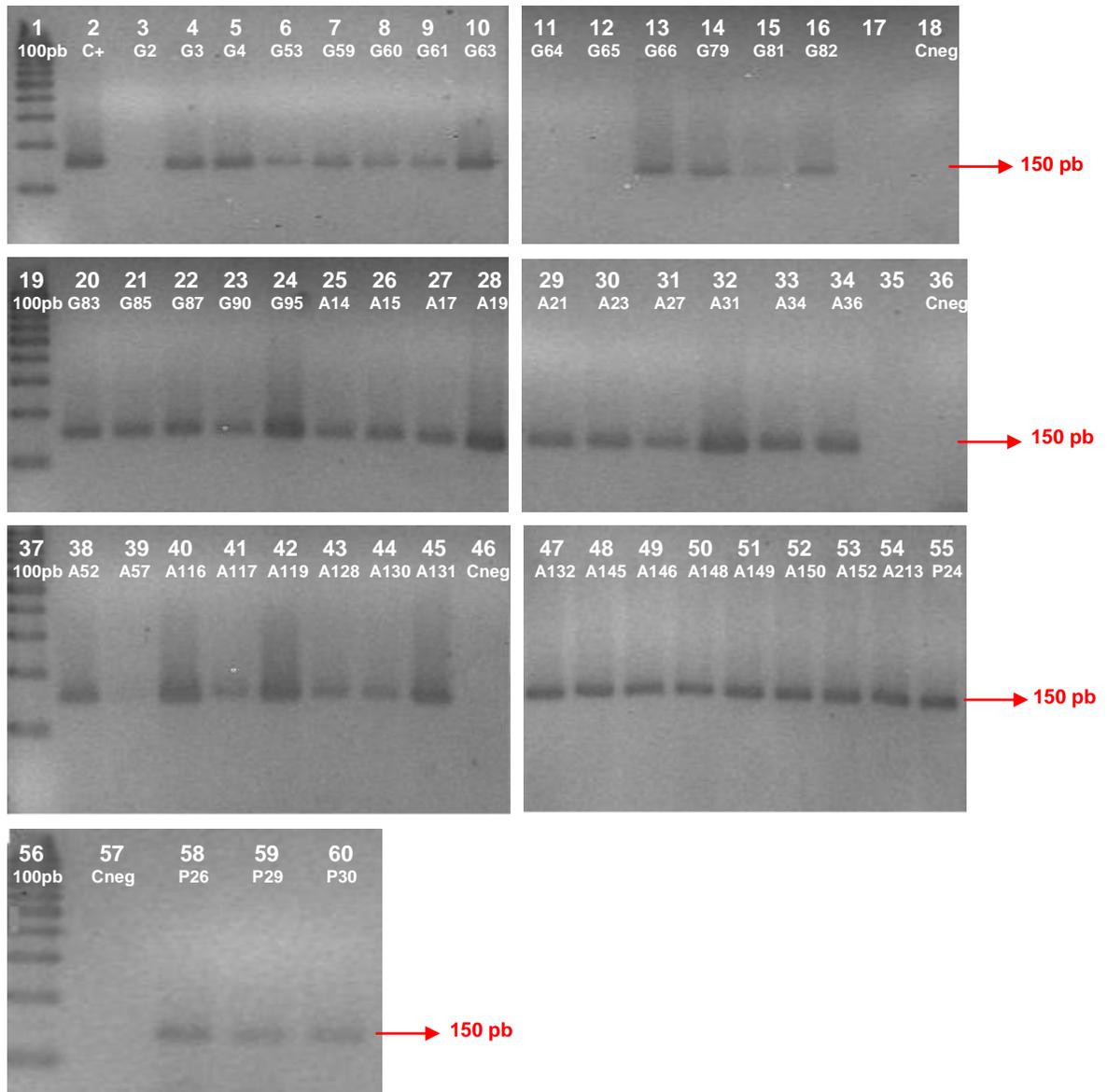


Figura 10. Detección de VPH (150pb) por PCR convencional con partidores GP5⁺/GP6⁺ de las 49 muestras de ANF sometidas al ensayo de Linear array, en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Se colocó un marcador de tamaño molecular de 100pb en los carriles 1, 19, 37 y 56 como se indica en la figura. Entre los carriles 3 y 16, 20 y 34, 38 y 55, y entre el 57 y 60 se cargaron los amplificadores de PCR del material genético extraído mediante kit de linear array. El control positivo se cargó en el segundo carril. Controles negativos se colocaron en los carriles 18, 36, 46 y 57. Los carriles 17, 35 no contienen muestra. Se aprecia que las muestras G2, G64 y G65, en los carriles 3, 11 y 12 respectivamente, fueron negativas para VPH.

DISCUSIÓN

La infección por VPH está asociada a papilomatosis laríngea recurrente en niños y adolescentes, a cáncer cervical, y a otros cánceres anogenitales y de cabeza y cuello en adultos. En los últimos años, sobre todo las infecciones latentes, asintomáticas en cavidad oral y faríngea en infantes, su significancia clínica y las vías de transmisión han sido tema de debate e investigación internacional, por la preocupación acerca del posible desarrollo de una neoplasia intraepitelial en cavidad orofaríngea a largo plazo, pero especialmente por la emergencia de las vacunas contra VPH, que han demostrado eficacia en prevenir esta infección a nivel genital en mujeres jóvenes³⁰. Por lo que determinar la prevalencia de la infección por VPH a distintas edades podría permitir dilucidar cual es el mejor momento de la vida para la vacunación y si se debe ampliar al género masculino, que también son portadores y transmisores importantes de este virus³⁰.

Si bien existen estudios que han confirmado la detección de VPH en piel y mucosas en niños, su mecanismo de transmisión es controversial pudiendo ser vía transmisión vertical, transmisión horizontal postparto desde los padres u otros miembros de la familia o personas cercanas al niño, por autoinoculación, abuso sexual, o vía indirecta a través de fomites³. Su prevalencia en cavidad oral y faríngea también es controversial e incierta, tanto en adultos como en niños, ya que existen pocos estudios de este tipo, que han demostrado resultados heterogéneos, con una amplia diferencia entre ellos, que va de 0% a 84% de detección de VPH oral. Así por ejemplo, en el estudio de Rintala y cols (2005)²⁶, las tasas de detección de VPH en aspirados nasofaríngeos de niños asintomáticos, varía entre 0% a 67%, mientras que, en Smith y cols (2007)²⁷, la prevalencia total de la infección por VPH en la cavidad orofaríngea de niños estadounidenses fue de 1,9%, con una distribución bimodal según edad, en los menores de un año y los adolescentes entre 16 y 20 años presentaron las tasas de prevalencia más altas, 2,5% y 3,3% respectivamente²⁷, y Cason y cols (2005)²⁵ encontraron una prevalencia de hasta 87% de VPH en hisopados orales de recién nacidos sin lesiones orofaríngeas.

Tomando en consideración los resultados obtenidos por la detección del gen TLR4 como control de calidad de las muestras, de un total de 160 niños enrolados en este estudio, la prevalencia de la infección por VPH en los ANF detectada con la PCR genérica con partidores GP5⁺/GP6⁺ fue de 30,6%, una cifra mucho mayor a la reportada por Smith y cols. (2007)²⁷ en una población de lactantes estadounidenses, que se tomó como referencia, con lo que se verifica nuestra hipótesis. Incluso, es concordante con los otros reportes de prevalencia hasta de 87% de infección por VPH en orofaringe de recién nacidos sanos, por lo que nuestro resultado es perfectamente esperable. En conjunto con esto, podemos además apoyarnos en el hecho de que en Estados Unidos la portación de VPH genital de las mujeres en edad fértil (10%) es inferior a la que tenemos reportada en mujeres Chilenas (15%), por lo que podemos presumir que quizás la transmisión vertical madre-hijo de VPH, por ende, es mayor en Chile, aumentando así la prevalencia en niños. Cabe destacar que al año 2010, basado en un metanálisis reciente, la transmisión vertical global de VPH se presume que ocurre en aproximadamente un 20% de los casos. La tasa de detección de VPH en aspirados nasofaríngeos tomados inmediatamente posterior al parto, es amplia, de 1,5% a 37%³⁰, aunque la concordancia entre los genotipos de VPH encontrados en la madre y el hijo varía de 57% a 69%, indicando que el niño no sólo puede adquirir la infección a través de la madre, sino también desde el ambiente^{3,12}.

A pesar de que el estudio de Smith y cols.²⁷ es un estudio donde se utilizó el mismo tipo de muestras en el mismo rango etario del presente estudio, existen algunas diferencias entre ellos. El estudio de Smith y cols.²⁷ se realizó en forma prospectiva, donde se preguntaron datos de cada paciente enrolado, con lo que se contaba con una buena base de datos. En cambio en nuestro estudio, por ser un estudio en el que se usaron muestras y datos recopilados para otro tipo de estudios, no contábamos con una base de datos propia de los niños, que habrían sido relevantes en la asociación con infección por VPH, como por ejemplo: el número de hermanos, número de parejas sexuales de la madre, infección genital por VPH en la madre, tipo de parto, nivel socioeconómico o comorbilidades inmunosupresoras en los niños. La

única asociación parcial que se obtuvo en un subgrupo de lactantes, fue la lactancia materna exclusiva. Dentro de este grupo, se aprecia que un 70% (16/23) de los niños que tuvieron lactancia materna registrada fueron positivos para VPH en sus ANF. Esto se correlacionaría con lo descrito en la literatura, ya que al tener un contacto más estrecho con la piel de la madre aumentaría la posibilidad de infección por VPH en cavidad oral en el hijo. Sin embargo, este es un grupo muy acotado dentro del estudio, con un número muestral pequeño, que no representa al total de la población estudiada.

En segundo lugar, en el estudio de Smith y cols.²⁷ se conoce que los lactantes estudiados son sanos, sin lesiones orofaríngeas al examen físico, a diferencia de los pacientes de nuestro estudio que tenían enfermedades respiratorias virales por las que fueron hospitalizados, pero no se cuenta con la información de si a estos lactantes se les realizó un examen físico para verificar presencia o ausencia de lesiones en boca. En la literatura no existen estudios de infección por VPH en cavidad oral o faríngea en niños con morbilidades concomitantes parecidas a las de los niños incluidos en este estudio (cursando infección por VRS o ADV), por lo que no tenemos parámetro de comparación ni sabemos si esto tiene alguna relevancia en la coinfección con VPH y en su prevalencia encontrada. Quizás estos niños en particular, tienen algún grado de falla en su inmunidad que los hace ser más susceptibles de tener cuadros de mayor gravedad y por lo que requirieron hospitalización por ADV o VRS; por lo mismo, podrían tener mayor susceptibilidad de infectarse con otros virus como el VPH. Para confirmarlo, a estos niños habría que hacerles estudio de inmunidad y además compararlos con la inmunidad e infección por VPH en lactantes sanos, idealmente dentro de una misma población y bajo las mismas condiciones.

Por otra parte, aunque al iniciar nuestro estudio se realizó el cálculo estadístico para el tamaño muestral, la prevalencia utilizada en ese calculo se basó en la reportada por Smith y cols²⁷ necesitándose 235 muestras, pero sólo se pudo obtener un número de 160 muestras. A pesar de esta falencia, este es un estudio de prevalencia

que no se había realizado anteriormente en Chile, no habían datos que reflejarán de alguna forma la realidad nacional, y aunque el n muestral puede ser insuficiente, la prevalencia detectada tiene gran relevancia y sirve como un estudio preliminar para estudios futuros, los cuales se deberían realizar con una cohorte más grande de lactantes y en condiciones óptimas que permitan corroborar esta alta prevalencia de infección de VPH en lactantes chilenos.

Con respecto a los genotipos más frecuentemente encontrados en cavidad oral y faríngea, tanto en niños asintomáticos como en aquellos que presentan lesiones, son VPH 6, 11, 16 y 18³⁰, lo que es concordante con nuestros resultados, ya que obtuvimos en su mayoría VPH 16 y 18 y una muestra positiva para VPH 11. Si bien no obtuvimos ninguna muestra positiva para VPH 6, esto puede ser debido al bajo n (8/49) que se logró genotipificar que mediante Linear array, y nó porque no esté presente. El VPH 58, que obtuvimos en 2/8 muestras, no es uno de los más frecuentemente encontrados en niños, pero está descrito como uno de los más frecuentes encontrados en lesiones orales y faríngeas producidas por VPH en adultos⁴⁸. En Chile, al no contar con estudios al respecto, no se puede aventurar que tengamos los mismos genotipos circulantes de VPH, por lo que perfectamente podrían ser estos que obtuvimos los más prevalentes. Habría que realizarles otros estudios más acabados de genotipificación, como secuenciación, a aquellas muestras que no se lograron genotipificar mediante el ensayo de linear array, para poder saber con exactitud los genotipos presentes en ellas, y así, su prevalencia en esta población.

Para la detección de VPH en mucosa oral y faríngea, se puede usar la citología e histología de tejidos. De esta forma, se pueden apreciar cambios en el epitelio, característicos de esta infección, como lo es la coilocitosis, halos citoplasmáticos perinucleares, displasia nuclear, metaplasia atípica y binucleación. Sin embargo, son métodos de baja sensibilidad, que no permiten definir genotipos virales presentes en las muestras, y no pesquisan infecciones latentes por VPH. Se han sugeridos otros tipos de muestras, como los enjuages o cepillados bucales y los aspirados, que

conlleven una toma de muestra de una superficie más amplia de la mucosa orofaríngea comparada con las biopsias, además son menos invasivas, fáciles de tomar y almacenar, y generalmente recolectan células de toda la cavidad oral mediante las cuales se obtienen cantidades de ADN suficientes para realizar técnicas moleculares que permitan determinar si existe infección por VPH y los genotipos presentes. Sin embargo, la desventaja es que no se localiza la infección³¹.

El VPH, a diferencia de otros virus, no crece en cultivos celulares convencionales de laboratorio, debido al requerimiento de un epitelio pluriestratificado⁶. Sin embargo, la infección puede ser diagnosticada mediante la presencia del ADN viral usando técnicas de hibridización como el Southern blot, dot -blot, hibridización *in situ* y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta última permite detectar VPH con partidores universales o genotipificar usando partidores específicos para cada genotipo. La detección del genoma viral mediante PCR es el método usado en la mayoría de los estudios epidemiológicos⁴. Sin embargo, existe una variación en la sensibilidad de los diferentes métodos dependiendo del tejido utilizado, tejido en parafina vs tejido fresco, que han complicado la interpretación y comparación de los datos existentes.

Al momento de hacer la detección de ADN de VPH en muestras orales o faríngeas, hay que tener en consideración que se ha demostrado mediante PCR que estas infecciones son menos productivas que aquellas infecciones a nivel genital, dando amplificadas más débiles en la PCR, tanto en presencia como ausencia de lesión orofaríngea visible. Basados en esto, es de suma importancia la calidad de la muestra y la metodología que se emplea para la detección de VPH. Además, el VPH es ubicuo en el ambiente, y minúsculas cantidades de ADN viral podrían acarrear ya sea en guantes, en la piel del manipulador, en los instrumentos utilizados para los distintos procesos a los que son sometidos las muestras a estudiar, o incluso de forma aerosolizada, lo que podría generar una contaminación de las muestras con VPH y por consiguiente dar falsos positivos en los resultados, tendiendo a aumentar la prevalencia de la infección. En este estudio se puso especial atención a la

prevención y detección de contaminación en el proceso de PCR. Se tomaron medidas estrictas en el laboratorio para disminuir el riesgo de contaminación: se trabajó bajo campana, no hubo contacto de los reactivos del PCR ni de las muestras con los guantes del manipulador puesto que los tubos se abrían con trozos de parafilm, se utilizaron controles negativos tanto fuera como adentro de la sala donde se realizaba la mezcla de reactivos (a modo de probar contaminación ambiental) y ninguno de ellos resultó positivo para VPH en cada PCR realizada, por lo que parece poco probable que haya habido contaminación de las muestras de este estudio con VPH externo.

Existe una serie de otras variables que pudieran afectar la detección de ADN viral, como por ejemplo el método de extracción de material genético utilizado y el tipo de partidores. En la mayoría de los estudios de detección de VPH, se intenta amplificar por PCR una amplia gama de genotipos virales mediante partidores universales o de “consenso” que amplifican una región del gen L1 del VPH, muy conservada dentro de los genotipos mucosos, y luego se pueden utilizar sondas específicas dirigidas a cada genotipo. Estos partidores pueden ser degenerados como los MY09/11, o sobrepuestos como en los sistemas Amplicor (PGMY), o que contengan secuencias que permitan uniones erradas en condiciones de baja exigencia de PCR como los GP5⁺/GP6⁺, o que contengan residuos de inosina en posiciones ambiguas como los partidores SPF^{5,7,47}.

Los partidores MY09/MY11, amplifican un fragmento de 450pb y son los que se usan principalmente en estudios con muestras cervicales. Sin embargo, en nuestro estudio se utilizaron los partidores GP5⁺/GP6⁺, que amplifican un fragmento de 150pb⁴⁸, y que se ha reportado que son más sensibles que los MY09/MY11 en la detección de ADN de VPH en muestras orales⁴⁵.

Otra diferencia importante con respecto a otros estudios dentro del ámbito, es que generalmente utilizan muestras frescas para realizar sus análisis, en cambio las muestras que se utilizaron en este estudio fueron tomadas hace varios años y no se

sabe exactamente cual fue el manejo de ellas previamente. Esto puede influir en la calidad de las muestras. Si comparamos los resultados obtenidos en la PCR de b-globina con los de la PCR del gen TLR4, se hace evidente, que independiente de la morbilidad de los niños y si tienen lesiones en orofarínge o no, el tiempo transcurrido desde la toma de las muestras y nuestros análisis, y el desconocimiento de como se manipularon en este tiempo, puede haber influido directamente en la calidad de estas muestras y por ende en nuestros resultados, pues se podría estar subestimando su prevalencia en esta población, ya que se asume que hay degradación del ADN presente en ellas. El grado de degradación permitió amplificar fragmentos pequeños como los de b-globina (106pb) y VPH con partidores genéricos (150pb), pero permitió amplificar fragmentos un poco más grandes como los de TLR4 (167pb) en 45% de las muestras iniciales. Bajo esta misma premisa, en el ensayo de linear array realizado, que usa partidores PGMY, los cuales amplifican un fragmento de 450pb, y en el cual se obtuvieron sólo 8 muestras positivas para VPH (con lo cual se obtiene una prevalencia de 5%), se podría especular nuevamente que si algunas muestras presentaban un grado de degradación tal que no permitieron amplificar fragmentos grandes como el del VPH (450pb) pero sí permitieron amplificar fragmentos más pequeños como el de su control interno β -globina (268 pb), se podría estar subestimando la prevalencia de la infección con esta metodología, dado que probablemente no se pesquisó VPH por el grado de degradación de la muestra, y no porque no haya habido VPH presente en ellas. Estos antecedentes también ayudarían a explicar la diferencia encontrada entre los resultados obtenidos entra la PCR con partidores GP5⁺/GP6⁺ y los del Linear Array en las mismas muestras (49 muestras VPH positivas v/s 8 VPH positivas respectivamente). Cabe destacar que todas las muestras analizadas mediante Linear Array obtuvieron una banda visible de β -globina positiva, lo que confirma un buen proceso de extracción de ADN. Además, hay que tomar en consideración que este kit fue creado para la detección de VPH en muestras anogenitales, y nosotros utilizamos muestras de ANF, lo cual también podría generar diferencias en la sensibilidad de este ensayo en la detección de VPH, pese a que se siguió estrictamente el mismo protocolo del fabricante.

Basándonos en un principio en la detección del gen de β -globina (97,5% de muestras positivas) podíamos asumir una prevalencia de 17,25% de la infección de VPH en nuestro estudio. Sin embargo, asumiendo que el amplificado obtenido con β -globina no era el más adecuado como control de degradación de las muestras, y realizando la detección de un fragmento mayor (PCR del gen TLR4) obtuvimos una prevalencia de 30,6%. Estos resultados divergentes nos confirma que resultados de prevalencia heterogéneos obtenidos en distintas poblaciones y grupos etarios deben asumirse con precaución, especialmente al momento de realizar comparaciones, pues detalles como condiciones homogéneas para establecer la calidad de la muestra y los productos que se amplifican pueden dar resultados totalmente contradictorios.

Otra alternativa para la discordancia obtenida entre PCR con GP5⁺/GP6⁺ y en el ensayo de linear array es que existan otros genotipos de VPH presentes en las muestras, que sean distintos a los que detectan las 37 sondas específicas del kit. Esta alternativa parece ser menos probable, dado que los 37 genotipos mucosos detectados por Linear Array son considerados los más prevalentes en las poblaciones estudiadas en la literatura extranjera. Sin embargo, por un lado, la mayoría de estos estudios se ha realizado en muestras anogenitales y no en muestras de cavidad orofaríngea; por otro lado, hay estudios como el de Castro y cols.⁴⁸, donde se ha reportado que los genotipos de VPH 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 32, 41, 43, 44, 45 y 46, que no son detectados por el kit de Linear array, estarían dentro de los más prevalentes encontrados en lesiones de cavidad oral y faríngea, y por último, en Chile no existe ningún estudio al respecto tampoco, por lo que no podemos comparar ni asegurar que sean estos mismos genotipos los prevalentes en cavidad faríngea de niños Chilenos.

Dado que la incidencia y prevalencia de la infección es cada vez más alta a nivel mundial, y se ve cada vez más asociada al desarrollo de distintos tipos de cánceres, existe la necesidad de realizar un diagnóstico precoz en niños portadores asintomáticos de VPH, lo que permitiría una monitorización de la evolución y un tratamiento preventivo adecuado si aparece una lesión, pudiendo evitar su

transformación y progresión a lesiones premalignas y/o malignas. También, por el impacto que puede significar implementar las distintas medidas de prevención a nivel de salud pública, como es la vacunación, nuestro estudio cobra mucha importancia para la realidad nacional, donde no se tenía ningún dato al respecto, y sirve como un estudio preliminar para estudios futuros.

CONCLUSIONES

La prevalencia de VPH que obtuvimos en cavidad faríngea (30,6%) en esta población de niños Chilenos, está dentro de lo descrito internacionalmente, y fue una cifra superior a la descrita por Smith y cols. (2,5%) en Estados Unidos. Nuestro estudio se realizó con muestras congeladas de estudios previos realizados en nuestro laboratorio, lo que limita las posibilidades de extrapolar nuestros resultados a todos los lactantes chilenos. Sin embargo, es el primer estudio de este tipo que se realiza en Chile, y servirá como referencia para estudios futuros en el mismo ámbito.

Los procesos de congelación/descongelación que sufrieron las muestras incluídas en este estudio y la consiguiente degradación de algunas de ellas, pueden explicar que la técnica de Linear Array no sea la más adecuada para genotipificar VPH en estas muestras. Habría que hacerles un estudio más acabado a aquellas muestras que no se pudieron genotipificar mediante este ensayo, como secuenciación, y ver si efectivamente se encuentran otros genotipos de VPH.

Se requiere de un estudio prospectivo, que incluya un tamaño muestral mayor, con un protocolo de toma y manejo adecuado de las muestras, las que idealmente deben ser frescas, y además, debería incluirse un cuestionario dirigido a datos relevantes del niño y de sus padres. Esto permitiría ver si existen asociaciones importantes a determinadas condiciones, que favorezcan el desarrollo de esta infección en la etapa infantil, y así poder responder cual es la prevalencia de infección por VPH en cavidad oral y faríngea de niños en Chile y si existen condiciones específicas que aumente el riesgo de tenerla. Considerando estas limitaciones, este es el primer estudio que muestra que hay genoma de VPH detectable en faringe de lactantes chilenos. Estudios de seguimiento podrán discriminar infecciones persistentes que favorecerían el desarrollo de lesiones benignas o malignas a edades más tardías.

ANEXOS

Anexo 2-A:

**CONSENTIMIENTO INFORMADO – PROYECTO FONDECYT
EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE COMO MECANISMO DE
PATOGENICIDAD EN INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BAJAS DEL
LACTANTE POR ADENOVIRUS**



03 JUN. 2010

Registro N°-----

Ficha N°-----

Médicos Responsables:

Dra. Carmen Larrañaga L. (6786317, Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y 6822474, Hospital San Juan de Dios)

Dr. Jorge Fernández (6786317; Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile)

Dr. Luis Fidel Avendaño (6786317; Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile)

Dra. María Angélica Palomino (7371047; Hospital Roberto del Río)

Dra. Leonor Jofré Morales y Dra. Pilar Fernández Fraile (6788876, Hospital Clínico, Universidad de Chile)

Casos con Infección Respiratoria aguda por Adenovirus:

Todos los años, los niños menores de dos años se pueden contagiar con el virus llamado adenovirus, el que puede producirles desde un resfriado hasta una infección respiratoria aguda baja; esto es una infección pulmonar que se manifiesta como bronquitis obstructiva y, o bronconeumonía. Su hijo actualmente presenta una infección respiratoria aguda baja por adenovirus.

Para poder atenderlos mejor es necesario saber más acerca de este virus, por lo cual solicitamos su ayuda.

Nuestro propósito es estudiar los mecanismos de defensa (respuesta inmune) de su hijo/hija contra este virus. Este estudio se realizará en el Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y en los Hospitales Roberto del Río, San Juan de Dios, y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile donde su hijo/hija se encuentra hospitalizado/a actualmente. Este estudio aportará conocimientos importantes para ayudar tempranamente a otros niños infectados con el adenovirus.

A los niños les tomaremos una muestra de secreción nasal mediante aspiración de sus secreciones y una muestra de 3 ml de sangre (1 cucharadita de té) en dos momentos de su evolución: la primera muestra al ingreso al protocolo dentro de los primeros 4 días de hospitalización y la segunda muestra al cumplirse 15 días de la fecha de ingreso al hospital. Si su hijo/a fuera dado de alta antes de los 15 días de evolución, solicitamos su concurrencia para completar el estudio y controlar al niño clínicamente, por el equipo de médicos que lo atienden. Este control no tendrá ningún costo adicional para su hijo/a. Los gastos de movilización del niño y su acompañante para este control serán costeados por el estudio. La participación de su hijo/a en este estudio no le traerá más molestias, ya que las muestras se obtendrán al mismo tiempo en que se realizan los exámenes habituales para esta enfermedad. A Ud. le preguntaremos además algunos datos importantes. Esta información será estrictamente confidencial y el nombre de los niños y sus familiares no será revelado. En caso que Ud. tenga dudas sobre este estudio o considere que su hijo/a

**CONSENTIMIENTO INFORMADO – PROYECTO FONDECYT
EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE COMO MECANISMO DE
PATOGENICIDAD EN INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BAJA
LACTANTE POR ADENOVIRUS**



Registro N°-----

Ficha N°-----

presente molestias por participar en él, Ud. puede consultar a los médicos responsables nombrados al comienzo de este documento. Esta consulta será absolutamente gratuita.

La participación en este estudio es completamente libre, voluntaria y gratuita. Si Ud. decide que su hijo/a no participe, esto no significará de ninguna forma que su hijo/a vaya a recibir un tratamiento y una atención diferentes a los que habitualmente se proporcionan en esta enfermedad. Si Ud. acepta que su hijo/a participe en el estudio, Ud. también puede cambiar de opinión en el momento que estime necesario y su hijo/a será retirado/a del estudio sin perjuicio alguno sobre su tratamiento médico.

Después de haber leído lo anterior, haber hecho las preguntas que he estimado convenientes y haber recibido una copia de este documento, DOY MI
CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN DE MI HIJO/A EN EL ESTUDIO.

Nombre del niño: _____

Nombre y Firma del padre o madre (Tutor legal)

Fecha de la firma: _____

Nombre y Firma del profesional: _____

Nombre y Firma del testigo: _____

Anexo 1-A:

CONSENTIMIENTO INFORMADO



PROYECTO FONDECYT
"INFECCIÓN POR VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL: ESTUDIO DE
POLIMORFISMOS DE LOS GENES IL-4, IL-8, SP-A Y SP-D
RELACIONADAS A ENFERMEDAD GRAVE POR VRS EN POBLACIÓN
CHILENA SUSCEPTIBLE."

03 JUN 2010

Registro N°-----

Ficha N°-----

Investigadores Responsables:

Dra. Carmen Larrañaga L. (6786317, Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y 6822474, Hospital San Juan de Dios)

Dr. Luis Fidel Avendaño C. (6786317, Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile)

Dr. Angel Spotorno (6786317; Programa de Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Chile)

Dr. Flavio Carrión A. (4129342; Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes)

Lactantes con Infección Respiratoria aguda baja por VRS:

Invitación a participar:

Le estamos invitando a participar en el Proyecto de Investigación "Infección por Virus Respiratorio Sincicial (VRS): Estudio de polimorfismos de los genes IL-4, IL-8, SP-A y SP-D relacionadas a enfermedad grave por VRS en población chilena susceptible", debido a que todos los años, los niños menores de dos años se pueden contagiar con el virus llamado virus respiratorio sincicial (VRS), el que puede producirles una infección respiratoria aguda baja. Esta infección pulmonar se manifiesta como bronquitis obstructiva y, o bronconeumonía. Su hijo actualmente presenta una infección respiratoria aguda baja por VRS. Para esta infección no se dispone hoy de vacunas ni de tratamiento antiviral específico. Algunos niños con esta infección tienen una evolución más grave. En otros países se ha observado que algunas características genéticas de los niños y el tipo de respuesta inmune (defensas) contra la infección por este virus son determinantes en la severidad de la infección. Para poder conocer las características genéticas e inmunológicas que se asocian a enfermedad grave por VRS en nuestros niños, es que solicitamos su ayuda. Este estudio aportará conocimientos importantes en Chile para ayudar tempranamente a otros niños con infección por VRS en el futuro. Estudio similares se han realizado en otros países con el fin de entender los mecanismos por los cuales este virus causa una enfermedad tan grave. En el mediano plazo esperamos que estos estudios permitan también aplicar vacunas para prevenir esta enfermedad. En este sentido es muy importante estudiar niños chilenos con esta infección, para cuando exista vacuna disponible podamos aplicarlas con toda seguridad en nuestra población de niños.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de Investigación
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

03 JUN. 2010



2

Objetivos del Estudio:

Nuestro objetivo es estudiar factores genéticos e inmunológicos de su hijo/a que se asocian a enfermedad por este virus. Los factores genéticos que le solicitamos estudiar en su hijo/a son la presencia de algunas formas específicas que pueden tener los genes humanos denominados IL-4, IL-8, SP-A y SP-D, las cuales se asocian más frecuentemente a enfermedad severa por VRS. Del mismo modo estudiaremos el tipo de defensa inmunológica que presenta su hijo/a frente a este virus que hoy lo aqueja. Este estudio se realizará en el Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes y en los Hospitales Roberto del Río y San Juan de Dios, donde su hijo/a ha consultado o se encuentra hospitalizado/a actualmente. El estudio incluirá un número total de 50 niños infectados con VRS que no hayan necesitado ser hospitalizados y de 100 niños con este mismo virus que si necesitaron ser hospitalizados para su tratamiento. Al mismo tiempo incluiremos en el estudio 25 niños sanos que deseen participar en el estudio como también a 100 adultos, para poder comparar los resultados obtenidos de sus exámenes con los de los niños enfermos por VRS.

Procedimientos:

Si Ud. acepta participar en este estudio, a su hijo/a le tomaremos una muestra de secreción nasal mediante aspiración de sus secreciones para buscar el virus y una muestra de 3 ml de sangre (1 cucharadita de té) para estudiar sus mecanismos de defensa contra el virus y determinadas formas genéticas relacionadas a la enfermedad por VRS. Estas muestras serán tomadas por una sola vez y bajo su consentimiento al ingresar al protocolo. La toma de muestra será realizada simultáneamente con la toma de exámenes habituales que son solicitados en una enfermedad de este tipo, ya sea que su hijo/a se encuentre hospitalizado o haya consultado en el Servicio de Urgencia. Así, la participación de su hijo/a en este estudio no le traerá ninguna molestia extraordinaria. Al mismo tiempo a Ud. le preguntaremos además algunos datos importantes. Esta información será estrictamente confidencial y el nombre de los niños no será revelado.

Riesgos:

La participación en este estudio de su hijo/a no constituye ningún riesgo extraordinario ni se acompaña de ningún efecto indeseado. Los procedimientos de aspirar secreciones y de punción venosa para obtener muestras de sangre son los procedimientos habituales para tomar los exámenes que su hijo/a requiere por su enfermedad. Para el caso de este estudio las muestras se tomarán simultáneamente con los exámenes que su hijo/a necesita. La punción venosa para obtener los exámenes de sangre en su hijo/a le provocarán dolor transitorio durante el procedimiento, como es habitual.

Costos:

La participación en este estudio no representa ningún costo extra para Ud., ya que el costo de los exámenes solicitados para el estudio será financiado con fondos destinados a este proyecto. El costo de los exámenes, tratamientos, hospitalización y honorarios habituales en enfermedades como la de su hijo/a deberá ser financiado por Ud. o su sistema previsional de salud como es habitual.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte



03 JUN. 2010

Beneficios y Compensación:

Al participar en este estudio no obtendrá ningún beneficio directo, ni compensación económica, excepto haber contribuido con el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes pediátricos que enfermen por el virus VRS.

Voluntariedad en participar:

La participación en este estudio es completamente libre, voluntaria y gratuita. Si Ud. decide que su hijo/a no participe, esto no significará de ninguna forma que su hijo/a vaya a recibir un tratamiento y una atención diferentes a los que habitualmente se proporcionan para esta enfermedad. Si Ud. acepta que su hijo/a participe en el estudio, Ud. también puede cambiar de opinión en el momento que estime necesario y su hijo/a será retirado/a del estudio sin perjuicio alguno sobre su tratamiento médico.

Confidencialidad:

Las muestras de su hijo/a solicitadas para este proyecto sólo serán utilizadas en este estudio. Toda la información derivada de la participación de su hijo/a en este estudio será conservada con estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores del proyecto. Cualquier comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Información adicional:

En caso que Ud. tenga dudas sobre este estudio o considere que su hijo/a presente molestias por participar en él, Ud. puede consultar a los médicos responsables nombrados al comienzo de este documento. Esta consulta será absolutamente gratuita. Además Ud. o su médico tratante serán informados de cualquier nuevo conocimiento que surja durante el desarrollo del estudio.

Después de haber leído lo anterior, haber hecho las preguntas que he estimado convenientes y haber recibido una copia de este documento, DOY MI
CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN DE MI HIJO/A EN EL ESTUDIO.

Nombre del niño: _____

Nombre y Firma del padre o madre (Tutor legal)

Fecha de la firma: _____

Nombre y Firma del profesional: _____

Nombre y Firma del testigo: _____

Aprobado:
25 de 5, 2005
Válido hasta
25 de 5, 2006

CEI-SSM.MORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

REFERENCIAS

1. Chuang T., Brashear R. Genital warts. Emedicine. [online]. 2009. Disponible en: <<http://www.emedicine.medscape.com>>.
2. Gall S. Female genital warts. Global trends and treatments. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001;9:149-154.
3. Syrjänen S, Puranen M, Human Papillomavirus Infections in children: The Role Of Maternal Transmission, *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):259-74
4. A. Mijares Briñez, C.M. Suarez, R. Castro, C. Fuentes, S.E. Medina, C. Pacheco Soler, E. Agudo, Carcinoma de Cavidad Oral y su Relación con El Virus de Papiloma Humano, *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez de Leon* 2007; 38(1): 24-33.
5. Campisi G, Giovannelli L., Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment, *Head Neck Oncol*. 2009 Mar 30;1:8.
6. Concha R. Marcela, Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano, *Rev Chil Infect* 2007; 24 (3): 209-214, disponible en www.sochinf.cl
7. Martínez G. M. José. Diagnóstico microbiológico de infecciones de transmisión Sexual. Parte II. ITS virales. *Rev Chil Infect* 2010; 27 (1): 60-64.
8. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10.
9. Briceño D Liliana, Lacruz L Ricardo, Fleury A, Mendible Mariana. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por virus de papiloma humano. *Centro méd*; 2002,47(1):17-23.
10. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer*. 2009 Nov 25;4:16, disponible en: <http://www.infectagentscancer.com/content/4/1/16>
11. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):525-41.
12. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 2007 Oct;98(10):1505-11.
13. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4754-62.
14. Limongi L., Perez C., Jimenez C. Prevalencia de la infección por virus papiloma humano en la cavidad bucal de pacientes pediátricos. *Acta odontol. venez*, ago. 2006, vol.44, no.2, p.277-283.
15. Vargas-Hernandez VM., Virus del papiloma humano. Aspectos epidemiológicos, carcinogénicos, diagnósticos y terapéutico, *Ginecol. Obstet. Méx* 1996; Volumen 64(9): 411-417.

16. Spinoso Cruz Vicente, Muniesa Soriano José Ángel. El virus de papiloma humano: ¿un enemigo vencido? *Boletín Oncológico*, 2008, disponible en <http://www.boloncol.com>
17. De San José S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Epidemiología de las infecciones por Virus del Papiloma Humano (VPH): riesgo de carcinoma cervico-uterino y de otros tumores ano-genitales. Nuevas opciones preventivas. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer: Epidemiología y Prevención*. 2006; 31-50.
18. Abarca Katia, Infección por Virus papiloma Humano y Cáncer Cervicouterino: ¿En las puertas de la prevención?, *Boletín escuela de Medicina U.C., Pontificia universidad Católica de Chile*, 2007, Vol 32, N°1.
19. De Guglielmo Zoraya y col. Virus de papiloma humano y factores de riesgo en el desarrollo de cáncer cérvico uterino. *Rev Venez Oncol* 2010;22(1):32-38.
20. Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, Ampuero SL, Snijders PJ, Meijer CJ, Vaccarella SV, Jara AT, Puschel KI, Robles SC, Herrero R, Franceschi SF, Ojeda JM. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Dec;13(12):2271-6.
21. Medeiros LR, Ethur AB, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, Mylius LC. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica*. 2005 Jul-Aug;21(4):1006-15. Epub 2005 Jul 11.
22. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 Mar-Apr;72(2):272-82.
23. Castro TM, Bussoloti Filho I, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009 Mar-Apr;75(2):167-71.
24. Rintala MA, Grénman SE, Puranen MH, Isolauri E, Ekblad U, Kero PO, Syrjänen SM. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):376-81.
25. Cason J, Mant CA: High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. *J Clin Virol* 2005, 32(Suppl 1):S52-S58.
26. Rintala MA, Grénman SE, Järvenkylä ME, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. *Clin Infect Dis*. 2005 Dec 15;41(12):1728-33. Epub 2005 Nov 7.
27. 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 Sep;26(9):836-40.
28. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virol J*. 2009 Jun 21;6:83.

29. Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, Goncé A, Ros R, Pérez JM, Quintana MJ, Muñoz J, Albero G, de Sanjosé S, Bosch FX. 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 May 27;9:74.
30. Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS*. 2010 Jun;118(6-7):494-509.
31. 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 Jan;91(1):62-9.
32. Smith EM, Parker MA, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010;2010:326369. Epub 2010 Mar 14.
33. Grm HS, Bergant M, Banks L. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian J Med Res*. 2009 Sep;130(3):277-85
34. Syrjanen KJ, Pyrhonen S, Syrjanen SM: Evidence suggesting human papillomavirus (HPV) etiology for the squamous cell papilloma of the paranasal sinus. *Arch Geschwulstforsch* 1983, 53:77-82.
35. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer*. 1997;9(3):595-604.
36. Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L, Smith E, Saláková M, Smahelová J, Ludvíková V, Rotnáglová E, Kodet R, Hamsiková E. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol*. 2009 May;81(5):878-87.
37. Keerti V. Shah, El VPH, un Ubicuo Carcinógeno Humano, HPV today, 2007, nº13, 1-3, disponible en www.hpvtoday.com.
38. Liuzzi Juan, Estanga Ninoska, Castillo Ilibia. Tipificación del virus del papiloma humano en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *Rev. venez. oncol.*, sep. 2007, vol.19, no.3, p.210-218.
39. Dell DL, Chen H, Ahmad F, Stewart DE. Knowledge about human papillomavirus among adolescents, *Obstet Gynecol* 2000; 96:653–656.
40. Rivera Z. René, y cols. Mecanismos de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev.Chil.Obstet Ginecol* 2006; 71(2)
41. Cricca, M., Morselli-Labate, A., Venturoli, S., Ambretti, S., Gentilomi, G., Gallinella, G., Costa, S., Musiani, M., Zerbini, M. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol*. 2007 Sep;106(3):549-57.
42. Jastreboff A., Cymet T. Role of human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Rev Postgrad Med J* 2002; 78: 225-8.
43. Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol*. 2009 Jun 25;1:22.

44. Peitsaro, P., Johansson, B., Syrjanen, S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *J Clin Microbiol* 2002, 40, 886-891.
45. Randall S., Scharf S., Falona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restrictions site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230, 1350-1353.
46. Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Fränzer JT, Sterling JC, Stanley MA, Sudhoff H, Goon PK. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer*. 2009 Dec 15;9:440.
47. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV detection methods. *Dis Markers* 2007, 23:273-281.
48. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 Mar-Apr;72(2):272-82.