



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**TIPIFICACIÓN VIRAL EN LA HIPERPLASIA
EPITELIAL MULTIFOCAL EN PACIENTES
ATENDIDOS EN LA UNIDAD DE ESPECIALIDADES
ODONTOLÓGICAS SEDENA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

ABRIL MARIEL ALCÁNTARA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:

MARTIN GILBERTO FLORES ÁVILA



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de
México 2017**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TIPIFICACIÓN VIRAL EN LA HIPERPLASIA EPITELIAL
MULTIFOCAL EN PACIENTES ATENDIDOS EN LA UNIDAD DE
ESPECIALIDADES ODONTOLÓGICAS SEDENA**

DIRECTOR DE TESIS

MARTIN GILBERTO FLORES AVILA

Cirujano Maxilofacial Adscrito FES Iztacala

ASESORES DE TESIS

ESAU FLORIANO SANCHEZ

Subdirector de Investigación
Escuela Militar Graduados de Sanidad

LUIS EDMUNDO MARTINEZ CALIXTO

Jefe del servicio de Patología Oral y Maxilofacial
Unidad de Especialidades Odontológicas

JUAN EDUARDO ORTIZ RAMIREZ

Cirujano Maxilofacial Adscrito FES Iztacala

Agradecimientos:

Agradezco a mis padres por el apoyo brindado durante toda mi formación académica, jamás me hizo falta nada para poder terminar mi carrera y eso se los debo a su trabajo, paciencia y esfuerzo, son mi mayor motivo para triunfar en la vida; a mi hermana Valerie por su total apoyo, consejos profesionales y a enseñarme a ser ambiciosa con lo que uno quiere tener en esta vida; a mi prima Vania por su cariño y por escucharme y finalmente a mi tía Esther, aunque ya no estés aquí presente, sé que me estas cuidando desde donde te encuentres.

Al Doctor Luis Edmundo Martínez Calixto por compartir sus conocimientos conmigo y convencerme de explorar nuevos caminos como lo es la Patología oral para descubrir cosas increíbles. A los Cirujanos Maxilofaciales Martin Gilberto Flores Ávila y Juan Eduardo Ortiz Ramírez que gracias a sus enseñanzas en la carrera, me dieron la pauta y el deseo para poder hacer investigación y sobre todo al Maestro Esaú Floriano Sánchez, sin su ayuda, paciencia y amistad, esta investigación jamás se hubiera concretado.

Agradezco a aquellos amigos que sin saber nada de mi profesión siempre me alientan a dar mi mayor esfuerzo y me recuerdan que debo sentirme orgullosa de lo que he logrado; gracias a los que caminaron conmigo desde un principio, a pesar de los altos y bajos momentos, seguiremos creciendo juntos.

Esta Tesis fue financiada con el Programa Presupuestario A022-2014-2018 (SEDENA). Investigación y Desarrollo Militar en Coordinación con Universidades Públicas, Instituciones Públicas de Educación Superior y/o demás Centros Públicos de Investigación (Tipificación viral en la hiperplasia epitelial multifocal en pacientes atendidos en la unidad de especialidades odontológicas SEDENA). Así mismo con el apoyo de infraestructura de equipo y personal del CEMICSA (Centro Militar de Ciencias de la Salud), de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Laboratorio Multidisciplinario de Investigación), gracias al apoyo específico del secuenciador de 8 capilares (Beckman Coulter).

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ABREVIATURAS	6
3. INTRODUCCION	7
4. MARCO TEORICO	8
4.1 Características generales de los virus	8
4.1.1 Generalidades del Papillomavirus	9
4.2 Genoma del Virus del Papiloma Humano.....	9
4.2.1 Clasificación del papillomavirus	10
4.3 Hiperplasia Epitelial Multifocal.....	13
4.3.1 Antecedentes históricos	13
4.3.2 Epidemiología	15
4.3.3 Raza	15
4.3.4 Descripción de la lesión	15
4.3.5 Diagnostico histopatológico	16
4.3.5 Diagnóstico viral.....	17
4.3.6 Diagnósticos diferenciales	17
4.3.7 Tratamiento	19
4.3.8 Pronóstico	19
4.3.9 Métodos de diagnóstico	20
4.4 Técnicas moleculares para la detección de VPH	20
4.4.1 Captura de híbridos	20
4.4.2 Extracción de ADN.....	21
4.4.3 Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)	22
4.4.4 Reacción en Cadena Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR).....	24
5. DISEÑO DE METODOLOGÍA.....	26
5.1 Planteamiento del problema.....	26
5.2 Justificación	26
5.3 Objetivo general	26
5.4 Objetivos específicos.....	26
5.5 Hipótesis	27
5.6 Tipo y diseño de estudio	27
5.7 Población y tamaño de muestra	27

5.8 Criterios de inclusión.....	28
5.9 Criterios de no inclusión	28
5.10 Criterios de eliminación.....	28
5.10 Definición de Variables	29
5.10.1 Variables demográficas	29
5.10.2 Variables clínicas	29
5.11 Análisis estadístico	30
5.12 Consideraciones éticas y legales	30
6. MATERIAL Y METODOS	30
6.1 Recolección de datos y biopsias	30
6.2 Preparación de la muestra biológica y extracción de ADN	30
6.3 Concentración e integridad de ADN en muestras purificadas	31
6.4 Elección de cebadores de VPH	31
6.5 Estandarización de las reacciones de PCR	32
6.6 Detección de VPH.....	33
6.7 Selección de las muestras a secuenciar	33
6.8 Purificación de muestras de PCR	33
6.9 PCR de Pre secuenciación	34
6.10 Purificación de muestras post secuenciación.....	35
6.11 Secuenciación y Análisis Informático en BLAST	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Características demográficas	36
7.1.1 Edad.....	36
7.1.2 Género	37
7.1.3 Lugar de Nacimiento	37
7.2 Variables clínicas	38
7.2.1 Topografía.....	38
7.2.2 Número de lesiones	40
7.2.3 Comorbilidades asociadas.....	41

7.3 Selección de muestras.....	41
7.4 Verificación de la integridad del ADN.....	42
7.5 Amplificación de Regiones de VPH.....	43
7.6 Análisis de amplificación de PCR.....	49
7.7 Selección de muestras a secuenciar.....	52
7.8 Análisis en BLAST.....	53
8. DISCUSIÓN.....	54
9. CONCLUSIONES.....	57
10. BIBLIOGRAFIA.....	58
11. ANEXOS.....	64
11.1 Anexo A.....	64
11.2 Anexo B.....	65
11.3 Anexo C.....	66
11.4 Anexo D.....	67
11.5 Anexo E.....	68

1. RESUMEN

La Hiperplasia Epitelial Multifocal es una enfermedad benigna que se manifiesta en boca con la proliferación en labios, lengua, carrillos, región yugal y en ocasiones en úvula y conjuntiva de lesiones papulonodulares, que van de 0.5 a 12 mm. de forma redonda u ovalada, de color de la mucosa oral normal, benignas y asintomáticas en su mayoría. Esta enfermedad ha sido descrita como poco usual y se han encontrado pocos casos en diferentes partes del mundo predominando en regiones de tribus centroamericanas.

Se revisaron 2933 reportes histopatológicos del servicio de Patología Oral y Maxilofacial de la Unidad de Especialidades Odontológicas SEDENA, del año 2006 al año 2016; se obtuvieron 70 muestras (2.38%) con diagnóstico clínico e histopatológico de Hiperplasia Epitelial Multifocal, de las cuales 47 muestras fueron utilizadas en este estudio; de estas, 27 muestras fueron seleccionadas para ser analizadas por medio de PCR y secuenciación; el 100% de las muestras fueron positivas a la amplificación de VPH con los primers MY9/MY11, GP5/GP6, L1/L2 y BG.

Los resultados obtenidos en las variables clínicas, nos indican la aparición de esta enfermedad en un 65% de los casos en comisuras labiales que pueden ser unilaterales o bilaterales y que se extienden hacia la piel, misma que no es reportada de manera precisa en la literatura.

De las 27 muestras, 12 (44.4%) fueron utilizadas para la secuenciación, de las cuales 3 (25%) fueron positivas a VPH subtipo 13, 1 muestra (8.33%) tuvo una correlación entre el subtipo 13 y el subtipo 6, 1 muestra (8.33%) fue positiva a VPH subtipo 32 con una correlación al subtipo 6, 1 muestra (8.33%) fue positiva a VPH Subtipo 160, 1 muestra (8.33%) fue positiva a VPH Subtipo 205, 1 muestra (8.33%) fue positiva a VPH Subtipo L-55, 2 muestras (16.66%) fueron analizadas como Virus No Clasificado mientras que 2 muestras (16.66%) no referían alguna secuencia similar.

Los resultados obtenidos en la secuenciación confirman la asociación de las muestras al virus del papiloma humano subtipo 13 y 32 tal como lo mencionan diversos autores, sin embargo en este estudio se encontró la correlación de estos mismos junto con el subtipo 6; así mismo se reportó la enfermedad con nuevos subtipos de VPH tales como 160 y L-55 ; estos subtipos están relacionados a la familia Alphapapillomavirus, y el subtipo 205 a la familia Gammapapillomavirus, lo que nos indica, junto con la frecuente aparición en comisuras labiales que la Hiperplasia Epitelial Multifocal puede considerarse como una lesión mucocutánea papilomatosa.

Palabras clave

Hiperplasia Epitelial Multifocal, VPH, Tipificación.

2. ABREVIATURAS

PCR Reacción Cadena Polimerasa

RT-PCR Reacción Cadena Polimerasa en Tiempo Real

ADN Acido Desoxirribonucleico

ddNTPs Dideoxynucleotidos

dNTPs Desoxynucleótidos

VPH Virus del Papiloma Humano

Ng Nanogramo

nM Nanomolar

ul Microlitro

pb Pares de base

3. INTRODUCCION

La Hiperplasia Epitelial Multifocal es una enfermedad benigna que se manifiesta en la cavidad oral afectando zonas anatómicas como lengua, labios, carrillos, región yugal y en ocasiones en úvula y conjuntiva en forma de lesiones papulonodulares, que van de 0.5 a 12 mm, de forma redonda u ovalada, de color de la mucosa oral normal, asintomáticas y múltiples en su mayoría. Esta enfermedad se ha descrito como poco usual y existe poca evidencia y pocos casos en diferentes partes del mundo. La incidencia de esta patología se presenta en la primera y segunda década de vida, afectando a mujeres en su mayoría. (1,2)

Los factores asociados a su prevalencia son la falta de nutrientes y de vitaminas; mayormente se presenta en personas con un nivel socioeconómico bajo. Otros factores asociados encontrados en la literatura son la predisposición genética, los traumas oclusales y la presencia de restauraciones con amalgama en boca debido a la irritación por corrientes galvánicas.

Esta enfermedad se encuentra asociada a los subtipos 13 y 32 del Virus del Papiloma Humano, e histológicamente es caracterizada por una proliferación epitelial exofítico, paraqueratosis, acantosis con proyecciones epiteliales que se anastomosan horizontalmente y la presencia de redes de crestas elongadas y gruesas que pueden confluir en la base. (3)

En Latinoamérica se le ha llamado a esta enfermedad *hiperplasia multifocal del epitelio*, ya que al usar este nombre se describe la principal característica clínica (lesiones múltiples) y el principal hallazgo histológico (hiperplasia del epitelio). En México, se encuentran escasos reportes de este padecimiento, por lo que se considera una enfermedad poco usual con poca población afectada; el primer reporte de la enfermedad se obtuvo en 1971. Las prevalencias más altas han sido encontradas en comunidades apartadas como es el caso de Yucatán y algunas zonas del Estado de México. (4,5, 6, 7)

4. MARCO TEORICO

4.1 Características generales de los virus

Los virus son moléculas químicas que tienen la capacidad de penetrar a una célula y modificar sus funciones normales, así como inducir la síntesis de nuevas moléculas por acción de su ácido nucleico. (8)

Existen distintas clasificaciones, una con base en su ácido nucleico, (virus con ADN y virus con ARN) de cadena sencilla o doble, única o segmentada, positiva o negativa; otra forma es dependiendo de la cápside, esto quiere decir según la forma de prismas de 20 caras y 12 vértices o en forma de espiral o hélice (virus icosaédricos y virus helicoidales); también pueden clasificarse por la presencia o ausencia de pepllos (envoltura), así como el número de capsómeros y diámetro de la nucleocápside en los virus helicoidales y el modo de replicación que utilizan los virus. Con base en dichos parámetros, los virus se ordenan en familias y géneros que a su vez forman grupos y subgrupos.

VIRUS CON ADN	
FAMILIA	GENERO
Adenoviridae	Mastadenvirus Aviadenovirus
Herpesviridae	Herpesvirus Alfa Beta Gamma
Parvoviridae	Parvovirus
Poxviridae	Orthopoxvirus Molluscipoxvirus
Papoviridae	Poliomavirus Papovavirus
Hepadnavoridae	Hepadnavirus

Tabla 1. Clasificación de virus con ADN.
(Romero CR. Microbiología y Parasitología Humana, 2007)

4.1.1 Generalidades del Papillomavirus

Los virus del genero Papillomavirus son provenientes de la familia Papoviridae, estructuralmente miden alrededor de 55 nanometros de diámetro, están formados por doble cadena de ADN, de 8000 pares de base, una cápside de 72 capsómeros, conformada en un 95% por la proteína L1 y en un 5% por la proteína L2, son icosaédricos y carecen de envoltura. (8,9)

4.2 Genoma del Virus del Papiloma Humano

El genoma puede dividirse en 3 regiones:

La Región Larga de Control (LCR), también denominada Unidad Reguladora no Codificada (URR), ocupa el 10% del genoma o de 0.4 a 1 kilobases (kb) de longitud, esta es esencial para funciones reguladoras del genoma en la replicación, origen de replicación del ADN y potenciadora de la transcripción viral promotores de síntesis del ARN.

La región E por sus siglas en inglés Early = temprano, o de expresión temprana (segunda región), formada por varias secuencias (E1-E7) que codifican proteínas responsables de las funciones de transformación celular, replicación y de la persistencia del ADN integrado en las células a las que infecta. Destacan las proteínas que intervienen en la replicación viral (E1, E2), su control (E1, E4) y, sobre todo, las que intervienen en los procesos de transformación celular (E5, E6, E7).

Especial interés tienen las regiones E6/E7, que poseen un importante papel en los mecanismos de transformación celular. Estas regiones están siempre virtualmente expresadas en el cáncer asociado al VPH. Las proteínas codificadas por estos genes virales se unen a los genes supresores de tumores p53 y Rb105, que inactivan su función, mecanismo que puede explicar en parte la intervención de los VPH en el proceso de oncogénesis.

La región L por sus siglas en ingles Late = tardía, formada por dos secuencias (L1 y L2), responsables de la codificación de las proteínas de la cápside en la fase final de ensamblaje viral. La L1 codifica para proteína principal de la cápside (región altamente conservada entre VPH) y la L2 para proteínas secundarias antígeno-específicas. (10)

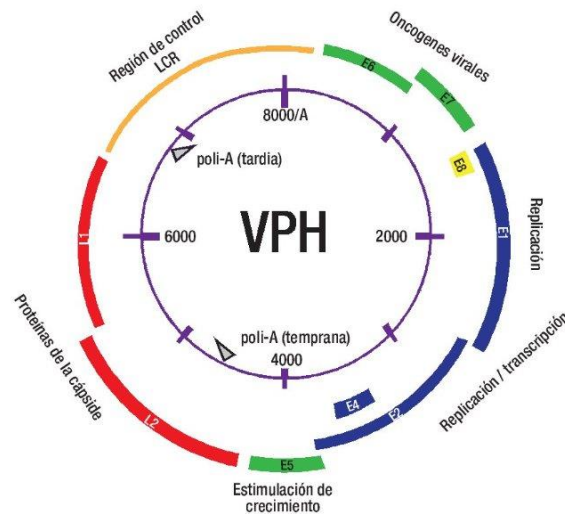


Figura 1. Genoma del Virus del Papiloma Humano

4.2.1 Clasificación del papillomavirus

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), menciona que la clasificación de los tipos, subtipos y variantes del papillomavirus es determinada por el porcentaje de variación que hay en el gen L1, ya sea de un 10%, de un 2-10% o por un máximo de 2% respectivamente. (11)

El International HPV Reference Center, a la fecha tiene registrado 210 subtipos de VPH agrupados en varias especies y familias. Estos virus son pertenecientes a los géneros Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Mupapillomavirus y Nupapillomavirus, que son aquellos que afectan a los humanos. (12)

Alphapapillomavirus:

Se divide en 15 especies. Presente en lesiones cutáneas y mucosas de humanos y primates. Su clasificación es de alto (lesiones malignas y pre malignas) y bajo riesgo (lesiones benignas).

Betapapillomavirus:

Se divide en 5 especies. Presente en lesiones cutáneas en humanos, en infecciones latentes que afectan a la población general.

Gammapapillomavirus:

Se divide en 5 especies. Presente en lesiones cutáneas en humanos. Histológicamente es distinguido por medio de cuerpos específicos de inclusión para estas especies.

Mupapillomavirus:

Se divide en 2 especies. Histologicamente distinguido por cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.

Nupapillomavirus:

Se divide en 1 especie. Presente en lesiones cutáneas benignas y malignas en humanos. (13)

4.3 Hiperplasia Epitelial Multifocal

La hiperplasia epitelial multifocal se define como la proliferación de la mucosa oral, de origen viral, caracterizada por la presencia de lesiones múltiples en los tejidos blandos de la cavidad oral. Estadísticamente entra dentro de las quince lesiones más frecuentes en boca; representa una de las reacciones más comunes de los tejidos blandos orales. (1, 14)

4.3.1 Antecedentes históricos

La hiperplasia epitelial multifocal fue conocida internacionalmente en el año de 1965 por Archard, Heck y Stanley, quienes relataron casos aislados en indios norteamericanos en Nuevo México, así como casos aislados en el estado de Mato en Brasil, y un caso en un niño esquimal en Alaska; debido a los hallazgos clínicos pasaron a denominar a esta entidad como Hiperplasia Focal del epitelio, la enfermedad popularmente se le conoce como Enfermedad de Heck. (15)

En Latinoamérica, la hiperplasia epitelial multifocal fue descrita por primera vez en Colombia, en la región de indios Caramatas por Estrada en el año de 1956, reportó una serie de lesiones papilomatosas y verrugas intraorales que también descubrió en otra región de Colombia con los indios Katios. (3, 16, 17)

En 1964, se encontró la mayor prevalencia de Latinoamérica en Venezuela, Soneira y Fonseca estudiaron la enfermedad en 160 niños y dedujeron que el 33.8% de ellos padecían la misma enfermedad, atribuyéndole a esta un origen viral por los hallazgos clínicos e histopatológicos. (4,18)

En el año de 1894, Helms realiza lo que podría considerarse el primer reporte de Hiperplasia epitelial multifocal, ya que describe lesiones que podrían considerárseles así en esquimales de Groenlandia. Fue hasta el año de 1970, que Praetorius-Clausen publicó un estudio de 460 esquimales de los cuales el 19.4%

padecían esta entidad, sin embargo la prevalencia y aparición era en habitantes mayores de 30 años en un 33.1%. (19, 20)

En México, aún se considera que hay poca información de la enfermedad, el primer artículo que hablaba de esta enfermedad fue presentado por Rojas en 1971, donde presenta 3 casos clínicos. El primer reporte de grupos familiares afectados lo realizó Luengas en 1987. (21, 22)

Uno de los estudios más grandes realizados en México, fue hecho por Sedano, quien estudió a 32,022 niños de comunidades pobres de diversos estados del país, encontrando 19 casos (0.05%). (5)

En el mismo año, Morales en su estudio de prevalencia de Hiperplasia Epitelial Multifocal en Puebla, concluyó que dicha alteración no constituye un problema de salud pública en Puebla, donde se pensaba que podría serlo. (23)

González en 1995, encontró que de 2,308 pacientes geriátricos, correspondientes a los 24 municipios del estado de México, solo 537 presentaban lesiones en boca encontrando que el 3.16% presentaban Hiperplasia Epitelial Multifocal. (24)

En el año de 1987, Hernandez-Jauregui reportó el primer estudio de análisis de ADN en la enfermedad con pacientes mexicanos, como resultado encontró la presencia del VPH subtipo 13 en 7 de los casos. (25)

Uno de los estudios en México más recientes los realizó, Cerón en el año 2011, este realizó una revisión de 71 casos en el área sureste de Yucatán, mencionando que la mayoría de los pacientes tenían una edad igual o menor a 7 años, que se encontró la enfermedad con predominio en sexo femenino (63.3%) y que el 91% de los casos presentaron lesiones múltiples con localización lengua. (6).

En ese mismo estado de la República, Carrillo-Montiel, en el año 2015 hizo una revisión de 525 niños, encontrando 62 (11.8%) casos positivos a Hiperplasia Epitelial Multifocal, donde se afectaba mayormente a niñas. (7)

La ocurrencia de casos familiares y la tendencia a afectar determinados grupos étnicos sugieren que una predisposición genética podría contribuir al desarrollo de la enfermedad. Un estudio mexicano evidenció una asociación significativa entre la HEF y el HLA-DR4, alelo relativamente frecuente en poblaciones indígenas (Mazatecas y Náhuatl), Guatemala y Colombia. (26)

4.3.2 Epidemiología

La aparición de estas lesiones es en las dos primeras décadas de vida, Aunque existen reportes de adultos afectados, más del 90% de los que acuden a consulta, son niños y adolescentes entre los 3 y 17 años de edad. (6,27)

El predominio es en mujeres en una relación 1:0.4 a 1:1, esto puede ser debido a las condiciones de vida dentro de sus grupos étnicos. (28)

4.3.3 Raza

Reportes señalan que la frecuencia en cuanto a raza es mayor en mestizos mientras que es rara en caucásicos y nula en individuos de raza negra, sin embargo reportes recientes han hablado de casos en países asiáticos tales como Irán con reportes de 7 casos y también Sri Lanka con 3 casos. (29,30,31)

4.3.4 Descripción de la lesión

Esta enfermedad se presenta en forma de lesiones papulonodulares múltiples aunque en ciertas ocasiones son únicas y localizadas. Su color es el mismo que la mucosa adyacente o mucosa sana, su diámetro varía de 0.1 mm hasta extenderse

1 cm, sin embargo también se puede extender a varios centímetros por la coalescencia de varias lesiones pequeñas, son lesiones circunscritas, de forma redonda u ovalada, en ocasiones se presentan elevadas, pero generalmente son de superficie plana, su consistencia es blanda y se caracterizan por un crecimiento lento. En la mayoría de los pacientes, son lesiones asintomáticas, sin embargo pueden interferir en la masticación provocando molestias en la cavidad oral. (32)

Pietropaolo en 1981 menciona que una característica propia de estas pápulas es la resiliencia, esto se refiere a que cuando se la mucosa se estira, la lesión desaparece y cuando regresa a su estado normal la lesión se hace nuevamente visible. No se encuentra compromiso en piel. (18,33)

4.3.5 Diagnostico histopatológico

Con la técnica de hematoxilina-eosina, se observa microscópicamente una prominente acantosis del epitelio que algunas veces se asemeja a la forma de un trébol debido a que las extensiones epiteliales se anastomosan y se dirigen hacia el tejido conectivo. Se observan la presencia de células escamosas que son queratinocitos que contienen un núcleo alterado y son llamados células mitosoides debido a que son muy similares a una mitosis normal. Se pueden encontrar células con citoplasma claro, núcleo pictonico o ausencia de este, llamados coilocitos. (2, 18, 34, 35)

Los estudios de microscopia electrónica son poco sensibles para demostrar la presencia del HPV. En los casos positivos se observan inclusiones nucleares de partículas virales de 45 a 50 mn de diámetro, dispuestas en forma aislada o en grupos de más de 100 dentro del núcleo. Se han descrito casos en los que se observaba una degeneración nuclear, parecida a mitosis, importante para el diagnóstico. (33)

4.3.5 Diagnóstico viral

Pfister en el año de 1983 describe por primera vez la presencia del subtipo 13 en la Hiperplasia Epitelial Multifocal, y no fue hasta 1986 que Beaudenon describe un nuevo subtipo de VPH identificado en las muestras estudiadas, tiempo después se le consideró llamársele subtipo 32. (36,37)

Estos subtipos virales predominantes se encuentran casi en el 90% de esta enfermedad, a su vez no se les ha encontrado en otras zonas que no sean la mucosa oral. (38) Distintos autores describen a su vez la presencia de otros subtipos de VPH que pueden dar reacciones cruzadas como los subtipos 1, 6, 11 y 16 y 18. (18, 39)

4.3.6 Diagnósticos diferenciales

Enfermedad de Cowden o Síndrome de múltiples Hamartomas:

Se define como genodermatosis autosómica dominante. Tiene hallazgos característicos tales como trigüilomas localizados en cara como nariz y orejas y las zonas aledañas a la boca.

Son pápulas color piel, rosado o café que tienen la apariencia de verrugas vulgares. También pueden encontrarse dentro de boca en mucosa oral, labios, encías y lengua que dan la apariencia característica de “empedrado” semejando a la Hiperplasia Epitelial Focal. Histológicamente estas pápulas orales se caracterizan por mostrar nódulos fibromatosos compuestos de fibras relativamente acelulares en remolino o tejido fibrovascular con acantosis. (40, 41)

Esclerosis tuberosa:

Es Proveniente de un desorden heredado en forma autosómica dominante y se caracteriza por la triada de retardo mental, epilepsia y angiofibromas en la cara. Pueden aparecer fibromas pequeños de consistencia dura en las encías que pueden ser únicos o múltiples, semejados a la HEM.

Histológicamente estos fibromas presentan fibroblastos grandes, estrellados y fibrosis de apariencia glial, ocasionalmente dilatación capilar. (42, 43)

Verruga vulgar:

Es un incremento exofítico sésil, circunscrito, con una superficie papilomatosa que en el examen histológico se observa la existencia de hiperqueratosis, el estrato granuloso es más pronunciado y las crestas interpapilares se encuentran de modo característico. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres a partir de los 20 años de edad. (44, 45)

Papiloma Escamoso Múltiple:

Su prevalencia es 1 de cada 250 adultos. Se consideran elevaciones pequeñas, sésiles o pedunculadas, refieren crecimiento lento y vascularización limitada, son de color blanquecino o grisáceo. Las ubicaciones más frecuentes son paladar, lengua y posteriormente labios, en menor predominio se localizan en encías y mucosa yugal. Histológicamente son lesiones pedunculadas con una superficie semejante a la de una coliflor y contienen un núcleo delgado central de tejido conectivo, el cual se encuentra cubierto por un epitelio escamoso hiperqueratósico. (46, 47)

Condiloma acuminado:

Es una enfermedad de transmisión sexual, causada por el virus del papiloma humano subtipo 2. Es la manifestación más común de la infección por VPH. No presenta síntomas y la infección desaparece por si sola. Son lesiones filiformes pedunculadas; en ciertos casos tienen forma de coliflor. Se le considera una hiperplasia epitelial benigna con acantosis y papilomatosis considerables. (45)

Enfermedad de Darier (ED):

Es una genodermatosis autosómica dominante, caracterizada por un trastorno de la queratinización. Afecta epidermis, uñas y mucosas. Aparece en la segunda o tercera década de la vida en ambos sexos. La microscopia destaca acantólisis con clivaje suprabasal y disqueratosis, manifestada por cuerpos redondos y granos, predominan en regiones seboreicas y pliegues, con evolución crónica, con periodos de remisión y exacerbación. (48)

Autores han mencionado una posible alteración inmunológica en los casos de aparición de HEM en pacientes con glomerulonefritis crónica, colitis ulcerosa y artritis reumatoide que estaban en tratamiento con inmunosupresores. (49)

4.3.7 Tratamiento

Se han reportado regresiones espontaneas tras meses o años. En lesiones antiestéticas o lesiones favorecidas a trauma recurrente, se puede realizar una cirugía excisional conservadora. Como alternativas de tratamiento se puede utilizar crioterapia, dióxido de carbono (CO₂), laser o electrocoagulación. (33, 50)

Hasta el momento, el tratamiento que se prefiere utilizar es el de aplicación de nitrógeno líquido, sin embargo se han realizado estudios recientes en México donde se ocupa con éxito el Ácido Tricloroacético al 5%, Imiquimod al 5% y con menores resultados pero también efectivo el Ácido glicirricínico. (51)

Como coadyuvante a estos tratamientos también se recomienda la suplementación con vitamina E. (32)

4.3.8 Pronóstico

El pronóstico de las lesiones es favorable utilizando cualquier tipo de tratamiento, sin embargo se recomienda una evaluación periódica sobre todo si se encuentran hábitos perniciosos en el paciente. (2)

4.3.9 Métodos de diagnóstico

Dentro de los métodos para diagnosticar la presencia de VPH existen los convencionales tales como la citología, la cual es ampliamente usada para la detección oportuna de cáncer cérvico-uterino; la colposcopia que evalúa pacientes con citologías anormales ya que analiza áreas específicas del epitelio gracias a la aplicación de ácido acético diluido sobre el tejido que se supone afectado y la histopatología, la cual se lleva a cabo estudiando fragmentos de tejido dañado a través de un microscopio, logrando diferenciar los estratos del epitelio y la infiltración de células infectadas en tejido sano. (45, 52, 53)

4.4 Técnicas moleculares para la detección de VPH

Hasta la fecha las técnicas basadas en la detección del ADN del VPH son las más precisas, sensibles y específicas en la detección de lesiones pre-malignas y han demostrado su utilidad en el diagnóstico. (54)

4.4.1 Captura de híbridos

Es una técnica que utiliza un método colorimétrico para la determinación de muestras humanas positivas a la presencia de virus; se basa en la formación de híbridos de moléculas de DNA viral con sondas específicas de RNA, estos híbridos se exponen al reconocimiento de anticuerpos especialmente diseñados y que se encuentran acoplados a moléculas coloridas, las que son finalmente detectadas en un luminómetro. La desventaja de este método es que se ha demostrado que esta prueba tiene una sensibilidad que varía entre el 70% y el 96.8%. (55)

4.4.2 Extracción de ADN

Este método consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal.

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite. Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente. (56)

En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN.

4.4.3 Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.

La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar, la polimerasa, los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar, desoxinucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis. Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular.

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. (57)

Existen tres pasos obligatorios en una PCR: Desnaturalización, Alineamiento y Extensión.

1. Desnaturalización: Es el proceso mediante el cual la doble cadena de ADN es separada y se lleva a cabo a 94°C.
2. Alineamiento: Temperatura a la cual los *primers* o iniciadores específicos para la secuencia de ADN que se quiere detectar, reconocen su complemento y se alinean; la temperatura a la que sucede esto depende de la secuencia de los mismos.
3. Polimerización o Extensión del ADN: Es el paso en el cual se forma la cadena completa de ADN a partir de los iniciadores que reconocieron la secuencia. Las bases van reconociendo su complemento y de esta manera se extiende el fragmento que posteriormente será detectado.

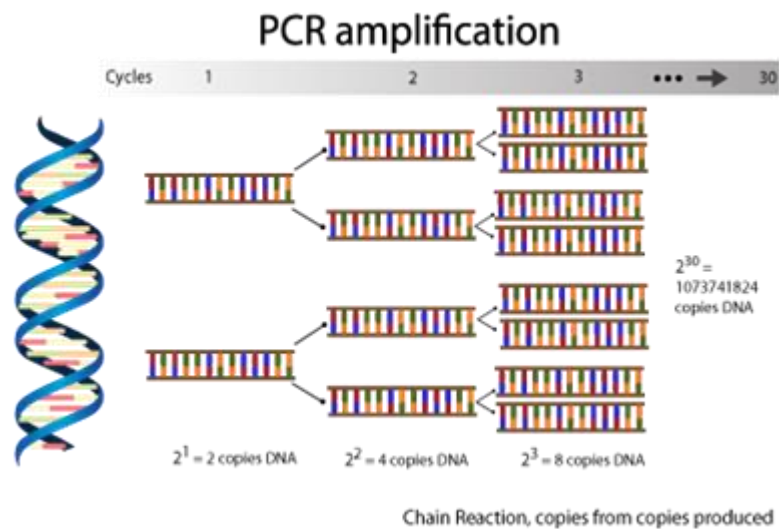


Figura 2. Etapas de Reacción Cadena Polimerasa

Tomada de: <http://www.gmotesting.com/Testing-Options/Genetic-analysis>

Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten de 30 a 40 veces en un tiempo corto, a esto se le conoce como ciclos; en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado. Este proceso se lleva a cabo en equipos automatizados especiales llamados termocicladores. (56, 57, 58)

4.4.4 Reacción en Cadena Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)

En la PCR en Tiempo Real, los termocicladores, o equipos de amplificación llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), basándose en la utilización de moléculas específicas llamadas fluoróforos; este sistema es capaz de mostrar en tiempo real lo que sucede en cada ciclo de amplificación y adicionalmente, con la ayuda de equipos computarizados especializados se pueden hacer análisis de fragmentos por electroforesis capilar de alta resolución. (59)

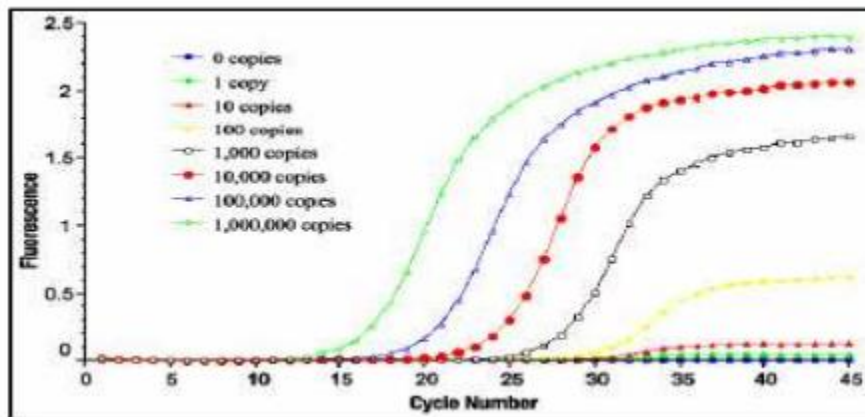


Figura 3. Curva de incremento a la Fluorescencia.

Tomada de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>

Los estudios ideales para la identificación del virus son por PCR, ya que el virus se replica solamente en células epiteliales diferenciadas. La región blanco frecuentemente más usada en los ensayos de PCR es la región L1, así como otros primers generales de regiones conservadas del genoma, dentro de los ensayos universales de detección de VPH se incluyen los sistemas MY9/MY11, GP5, GP6. (59, 60)

5. DISEÑO DE METODOLOGÍA

5.1 Planteamiento del problema

La Hiperplasia Epitelial Multifocal es una enfermedad benigna de las mucosas producida por el virus del papiloma humano (VPH); existen varios reportes donde se asegura que los papilomavirus subtipos 13 y 32 son los responsables de esta condición, sin embargo la literatura es escasa y como resultado no existe un tratamiento específico, eficaz y adecuado para esta patología.

5.2 Justificación

La Hiperplasia Epitelial Multifocal es una enfermedad que se considera poco usual que afecta a la mucosa oral, y que se manifiesta entre la primera y segunda década de vida; de inicio se le da una importancia clínica ya que afecta a una población en desarrollo. A pesar de saber la incidencia en México, no existen series de casos clínicos recientes con tipificación viral reportados, y los casos clínicos presentados son aislados, lo cual nos obliga a determinar los datos estadísticos en nuestra población hospitalaria, con el objetivo futuro de hacer un estudio mexicano multicéntrico y comparar los datos con los publicados a nivel nacional.

5.3 Objetivo general

Conocer los tipos de virus que se asocian a la Hiperplasia Epitelial Multifocal en los pacientes atendidos en la Unidad de Especialidades Odontológicas SEDENA.

5.4 Objetivos específicos

- a. Conocer las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes cuyo diagnóstico histopatológico fue Hiperplasia Epitelial Multifocal.

- b. Determinar los subtipos de VPH que se asocian a la Hiperplasia Epitelial Multifocal en biopsias obtenidas de pacientes atendidos en la Unidad de Especialidades Odontológicas a través del método de PCR y Secuenciación de ADN.

5.5 Hipótesis

- a. Hipótesis de trabajo: Los subtipos 13 y 32 del Virus del Papiloma Humano son los únicos que tienen relación con la Hiperplasia Epitelial Multifocal.
 - b. Hipótesis nula: Los subtipos 13 y 32 del Virus del Papiloma Humano no son los únicos que tienen relación con la Hiperplasia Epitelial Multifocal.
-
- a. Hipótesis de trabajo: Existen otros subtipos de papilomas aparte del subtipo 13 y 32 que son causantes de la Hiperplasia Epitelial Multifocal.
 - b. Hipótesis nula: No existen otros subtipos de papilomas aparte del subtipo 13 y 32 que son causantes de la Hiperplasia Epitelial Multifocal.

5.6 Tipo y diseño de estudio

Estudio retrospectivo, transversal, descriptivo y observacional.

5.7 Población y tamaño de muestra

Biopsias de pacientes diagnosticados clínica e histopatológicamente como Hiperplasia Epitelial Multifocal.

5.8 Criterios de inclusión

- a. Biopsias con datos completos de pacientes diagnosticados con Hiperplasia Epitelial Multifocal.
- b. Expedientes completos de pacientes valorados en la Unidad de Especialidades Odontológicas, con diagnóstico histopatológico de Hiperplasia Epitelial Multifocal de ambos sexos.

5.9 Criterios de no inclusión

- a. Biopsias sin datos de registro del paciente.
- b. Expedientes incompletos

5.10 Criterios de eliminación

- a. Muestra insuficiente para la realización de PCR.

5.10 Definición de Variables

5.10.1 Variables demográficas

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	OPERACIONALIZACION	CATEGORIA	ESCALA DE MEDICION	UNIDAD DE MEDICION
Edad	Tiempo transcurrido de su nacimiento a la fecha que acudió al servicio	Edad que indica el paciente	Cuantitativa	Razón	Años
Género	Característica sexual	El género al que pertenece de nacimiento el paciente	Cualitativa	Nominal	Dicotómica: Hombre Mujer
Lugar de nacimiento	Lugar geográfico de nacimiento	Lugar registrado en el expediente	Cualitativa	Nominal	Descriptiva

5.10.2 Variables clínicas

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	OPERACIONALIZACION	CATEGORIA	ESCALA DE MEDICION	UNIDAD DE MEDICION
Localización de lesión para toma de biopsia	Localización de la lesión	Localización de la lesión más grande para la toma de biopsia, registrada en el expediente	Cualitativa	Nominal	-Mucosa labial (labios) -Lengua -Mucosa yugal -Otros
Numero de lesiones	Cantidad de lesiones registradas	Exploración registrada en el expediente	Cualitativa continua	Nominal	-Múltiples -Única
Comorbilidades asociadas	Enfermedades que refiere el paciente al interrogatorio	Enfermedades registradas en el expediente dichas por el paciente.	Cualitativa	Nominal	-Descriptiva

5.11 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de los datos utilizando frecuencias simples y porcentajes para variables categóricas, así mismo se realizaron gráficos de las variables

5.12 Consideraciones éticas y legales

El presente estudio, cumplirá con los acuerdos de la Declaración de Helsinki en materia de investigación en humanos, con riesgo menor al mínimo, es decir, no plantea en su estructura intervención alguna que ponga en riesgo al paciente.

No se darán a conocer datos personales de quienes han sido parte de este estudio ni se compartirán; los expedientes contienen la hoja de Aviso de privacidad.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Recolección de datos y biopsias

El presente estudio incluyó la revisión completa de expedientes de un total de 70 pacientes del año 2006 al año 2016 con un diagnóstico clínico e histopatológico de Hiperplasia Epitelial Multifocal, de los cuales se seleccionaron un total de 47 muestras que cumplían con los criterios de inclusión. Las biopsias fueron tomadas por el servicio de Patología oral y Maxilofacial de la Unidad de Especialidades Odontológicas SEDENA.

6.2 Preparación de la muestra biológica y extracción de ADN

Para la preparación de muestras se utilizó el **QIAasymphony DSP DNA Mini Kit** siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo B) y se almacenaron en el ultra congelador a -80°C hasta la extracción de ADN.

El proceso de extracción de ADN se llevó a cabo en el purificador de ADN genómico **QIAasymphony SP AxPH** siguiendo las instrucciones del fabricante, al término de la extracción, las muestras se congelaron a -20° C.

6.3 Concentración e integridad de ADN en muestras purificadas

Se cuantificó y se evaluó la calidad y concentración del ADN de las muestras mediante el uso del equipo **QIAxpert (QIAGEN)**, el cual sirve para evaluar la concentración e integridad del ADN colocando por cada pozo de su gradilla 5ul de muestra. Al término del proceso, la integridad de las muestras fue estudiada por medio de Electroforesis capilar de alta resolución, utilizando el equipo **Qiaxcel (QIAGEN)**.

6.4 Elección de cebadores de VPH

Para el diagnóstico de VPH se amplificaron 3 regiones localizadas en el gen L1 de este virus, los cuales fueron L1, MY y GP, además de la región B-globina que fue utilizada como control interno para verificar la calidad del ADN y la ausencia de inhibidores durante la PCR. Se utilizaron como **primers GP5(F)/GP6(R), L1(F)/L2(R) y MY9(F)/MY11(R)**. (Tabla 3)

Gen	Secuencia de Primers 5'-3'	T de alineamiento	Tamaño del amplicón (pb)
GP	F TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC R GAAAAATAAACTGTAAATCATAYTC	40 °C	150
L	F CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT R CAACTTCATCCACGTTCCACC	45 °C	244
MY	F CGTCCMARRGGAWACTGATC R GCMCAGGGWCATAAYAATGG	55 °C	450

Tabla 3. *Primers* que fueron utilizados

6.5 Estandarización de las reacciones de PCR

Las pruebas fueron realizadas bajo las condiciones de PCR específicas de cada cebador (Tabla 4) utilizando el **Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)**.

Los cebadores elegidos fueron diluidos a una concentración de 10Mm cada uno para su uso mientras que la cantidad de ADN total utilizada para cada reacción de PCR fue de 100 ng/ul. Cada solución utilizada para cada reacción fue calculada con base a las instrucciones del fabricante (Tabla 5) quedando como volumen final 12.5 µl por reacción.

	GP	L1	MY	BG
Desnaturalización	95° C 5 minutos	95° C 5 minutos	95° C 5 minutos	95° C 5 minutos
40 Ciclos	- 95°C 5 seg. -40°C 5 seg. -60°C 10 seg.	-95°C 5 seg. -45°C 5 seg. -60°C 10 seg.	- 95°C 5 seg. -55°C 5 seg. -60°C 10 seg.	- 95°C 5 seg. -55°C 5 seg. -60°C 10 seg.
Enfriamiento	27°C 1 minuto	27°C 1 minuto	27°C 1 minuto	27°C 1 minuto

Tabla 4. Condiciones de amplificación

Soluciones	Calculo para 1 reacción	Calculo para 25 reacciones
Primer F	0.3 µl	7.5 µl
Primer R	0.3 µl	7.5 µl
2x Master Mix	6.25 µl	156.25 µl
H2O	1.65 µl	41.25 µl
ADN	4 µl	Este se mide solo para una reacción individual
Volumen Final	12.5 µl	

Tabla 5. Volumen de reacciones con *Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit*

6.6 Detección de VPH

Los productos de PCR se analizaron visualizando su tamaño en pares de bases (pb) por medio de electroforesis capilar de alta resolución. Como referencia utilizó un marcador de peso molecular de 50pb – 1.5 kb (*QX DNA Size Marker QIAGEN*) para identificar el tamaño del amplicón.

6.7 Selección de las muestras a secuenciar

Se analizaron las amplificaciones de PCR y los electroferogramas realizados de cada región del virus para seleccionar las muestras a ocupar.

6.8 Purificación de muestras de PCR

El proceso de purificación de las muestras fue hecho con el producto *Exo-SAP-IT PCR Product Cleanup (USB)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. (Anexo C)

6.9 PCR de Pre secuenciación

Las pruebas fueron realizadas bajo las condiciones de temperatura del **DTCS-Quick Start Kit (Genome Lab)** (Tabla 6)

Las cantidades utilizadas para cada reacción fueron calculadas en base a las instrucciones del fabricante (Tabla 7) quedando como volumen final 19µl por reacción.

Temperatura	Tiempo
96°C	20 segundos
50°C	20 segundos
60°C	4 minutos
Numero de Ciclos	30 ciclos

Tabla 6. Condiciones de temperatura para PCR de pre secuenciación.

Soluciones	Calculo para 1 reacción
H2O	6 µl
Primer	1 µl
DTCS	8 µl
ADN	4 µl
Volumen Final	19 µl

Tabla 7. Volumen de reacciones **DTCS-Quick Start Kit**.

6.10 Purificación de muestras post secuenciación

El proceso de purificación de las muestras fue hecho con los reactivos **del DTCS-Quick Start Kit (Genome Lab)** siguiendo las instrucciones del fabricante. (Anexo D)

6.11 Secuenciación y Análisis Informático en BLAST

La secuenciación fue realizada en el equipo **Genetic Analysis System GeXP (GenomeLab)**. Una vez que se determinaron las secuencias se procedió a realizar una comparación de estas con las del banco de genes NCBI mediante el programa computacional de base de datos **Basic Logic Alignment Search Tool (BLAST)**, para comparar similitudes con las secuencias ya reportadas y determinar el serotipo al que corresponden.

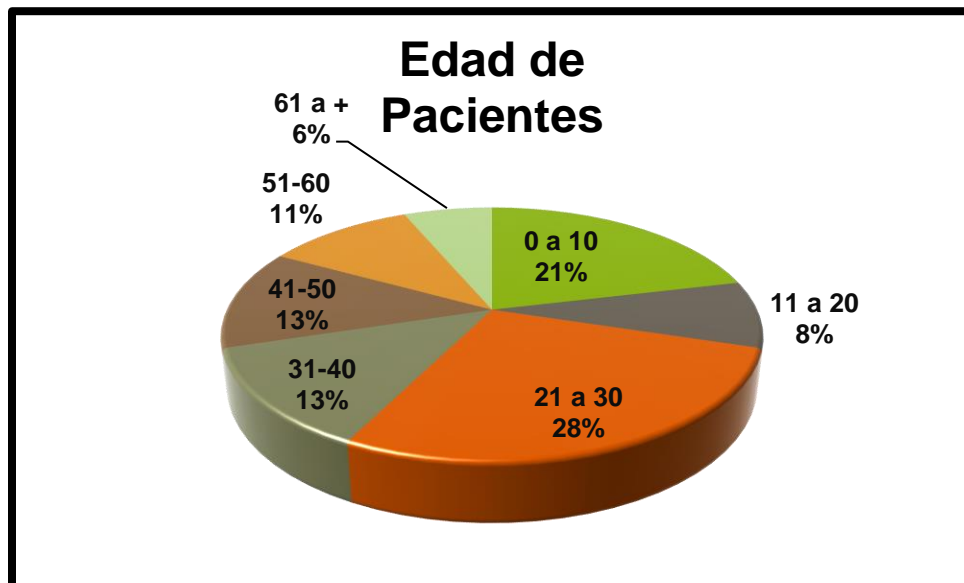
7. RESULTADOS

De 2933 reportes del laboratorio de Patología entre 2006 y 2016, se encontraron 70 reportes con diagnóstico de Hiperplasia Epitelial Multifocal y 47 de estos se utilizaron para este estudio.

7.1 Características demográficas

7.1.1 Edad

Se realizaron grupos de edades de 0 a 10 años, 11 a 20 años, 21 a 30 años, 31 a 40 años, 51 a 60 años y mayores de 61 años, de los cuales 10 pacientes (21%) se encuentra en una edad menor a 10 años, 4 (8%) están en el rango de 11 a 20 años, 13 (28%) están en el rango de 21 a 30 años, 6 pacientes (13%) se encuentran en una edad de 31 a 40 años, 6 (13%) están en el rango de 51 a 60 años, 5 (11%) de 41 a 50 años y hay 3 (6%) pacientes mayores de 61 años.



Grafica 1. Distribución de edad de los pacientes

7.1.2 Género

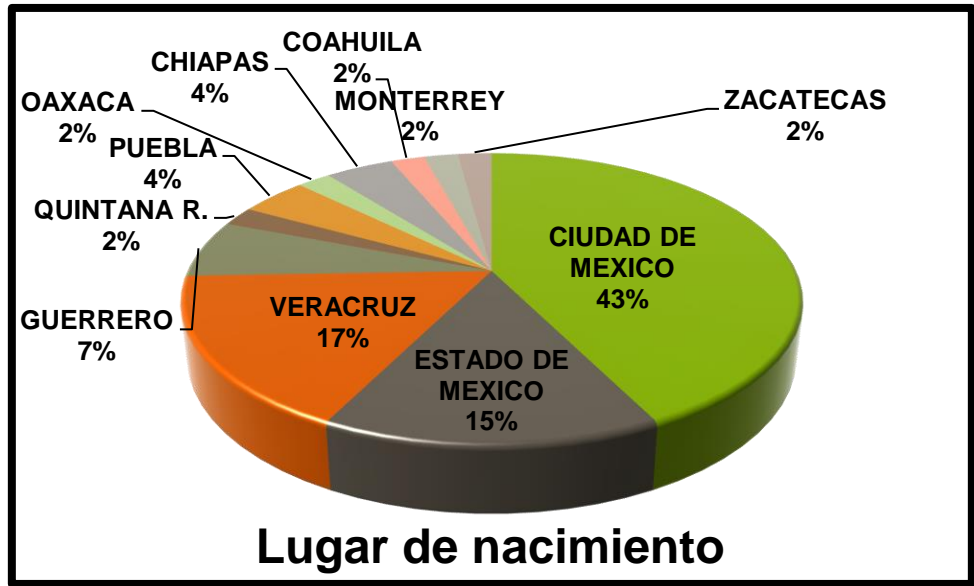
Se registraron 33 mujeres (70%) y 14 hombres (30%).



Gráfica 2. Distribución de género de los pacientes

7.1.3 Lugar de Nacimiento

20 pacientes (43%) nacieron en la Ciudad de México, 8 (17%) en Veracruz, 7 pacientes (15%) en el Estado de México, 3 pacientes (7%) en Guerrero, 2 pacientes (4%) en Puebla, 2 pacientes (4%) en Chiapas, 1 paciente (2%) en Quintana Roo, 1 paciente (2%) en Oaxaca, 1 paciente (2%) en Coahuila, 1 paciente (2%) en Monterrey y 1 paciente (2%) en Zacatecas.

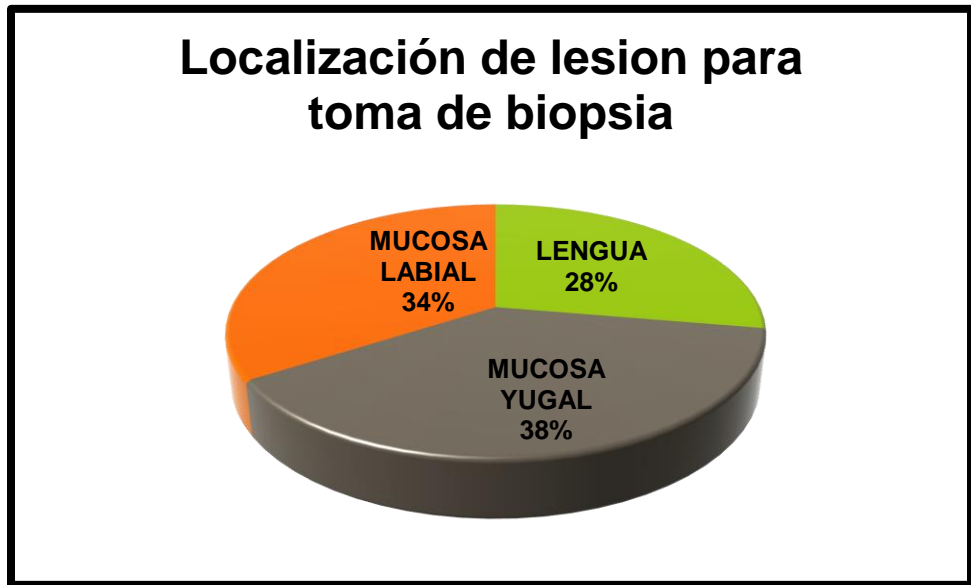


Gráfica 3. Distribución de lugar de nacimiento de los pacientes

7.2 Variables clínicas

7.2.1 Topografía

La toma de biopsia fue realizada en la lesión más grande encontrada en cada paciente, la localización más frecuente fue en la mucosa yugal encontrando 18 pacientes (38%) seguidos por 16 pacientes (34%) en mucosa labial (labios) y por ultimo 13 pacientes (28%) en lengua.



Gráfica 4. Localización de la lesión

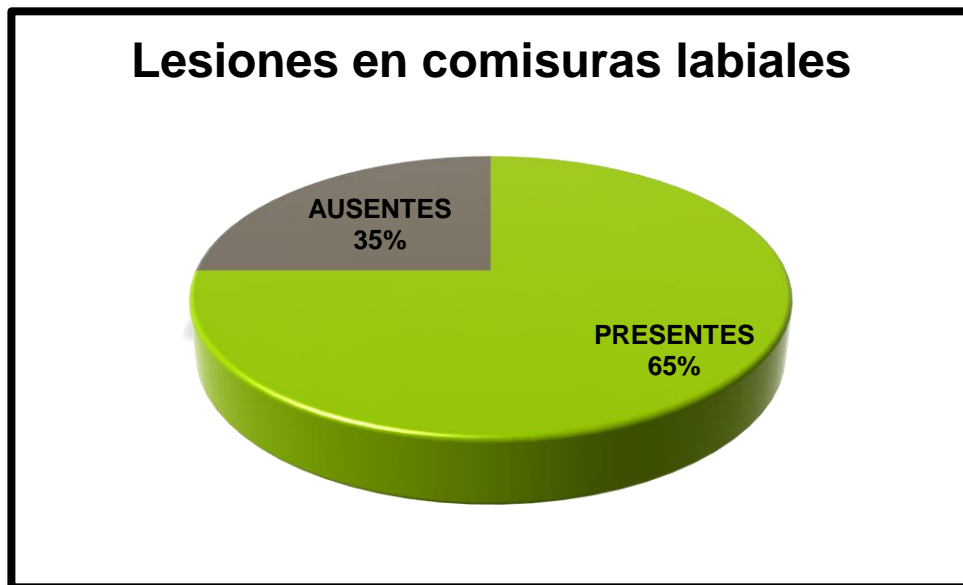


Figura 4. Presentación clínica
Nótese la presencia de la lesión generalizada.



Figura 5. Fotografía clínica donde se observa la HEM en el borde lateral de la lengua.

Dentro de la revisión de expedientes se encontró la presencia de múltiples verrugas en comisuras labiales en un 65%.



Gráfica 5. Lesiones en comisuras labiales

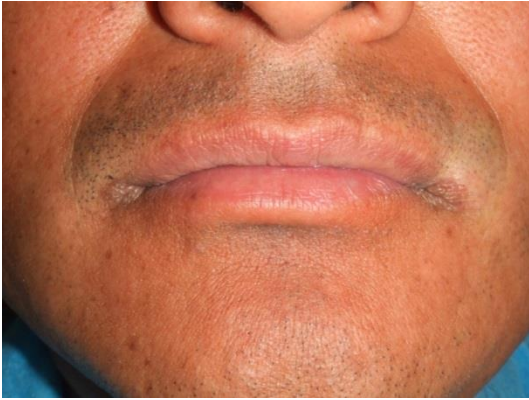


Figura 6. Fotografía clínica donde se observa la aparición de lesiones en comisuras labiales



Figura 7. Fotografía clínica donde se observa la aparición de lesiones y manchas en comisuras labiales

7.2.2 Número de lesiones

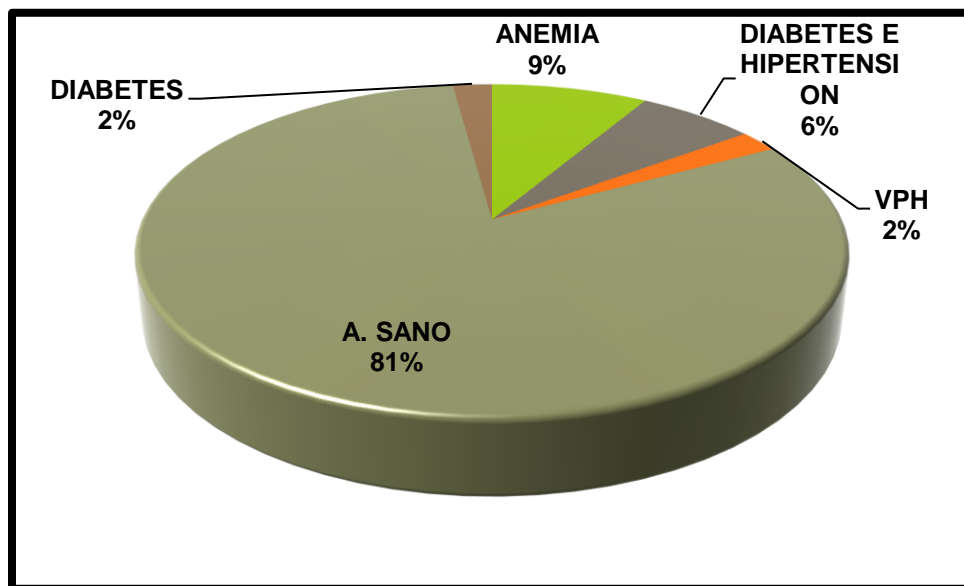
El 100% de los casos presentan lesiones clínicas múltiples.



Gráfica 6. Número de lesiones por paciente

7.2.3 Comorbilidades asociadas

Dentro de los expedientes, 38 pacientes (81%) fueron referidos como aparentemente sanos, 4 pacientes (9%) refirieron ser diagnosticados con anemia, 3 pacientes (6%) refirieron ser diagnosticados con Diabetes e Hipertensión Arterial, 1 paciente refirió ser diagnosticado con Diabetes (2%), y un paciente (2%) refirió ser diagnosticado previamente con VPH en genitales.



Gráfica 7. Comorbilidades asociadas

7.3 Selección de muestras

Se realiza la selección de 27 muestras para análisis de PCR y amplificación.

7.4 Verificación de la integridad del ADN

Se observan las concentraciones correspondientes a las muestras utilizadas.
(Tabla 8)

MUESTRA	CONCENTRACION
1E	190.2 ng/ul
1S	110.6 ng/ul
2E	217 ng/ul
2S	167.8 ng/ul
3E	225.9 ng/ul
3S	57.8 ng/ul
4E	155.3 ng/ul
4S	89.9 ng/ul
5E	129 ng/ul
5S	162.3 ng/ul
6E	104.2 ng/ul
6S	35 ng/ul
7E	239.5 ng/ul
7S	81.9 ng/ul
8E	7.9 ng/ul
8S	33.2 ng/ul
9E	5.8 ng/ul
9S	90 ng/ul
10E	203.9 ng/ul
10S	39.4 ng/ul
11E	296.7 ng/ul
11S	23.4 ng/ul
12E	104.3 ng/ul
13E	118.2 ng/ul
14E	105 ng/ul
15E	79.7 ng/ul
16E	67.8 ng/ul

Tabla 8. Concentraciones de ADN

Por medio de electroforesis se observa la integridad de los productos de la extracción de ADN de las muestras. Cada carril nombra la muestra correspondiente. (Figura 4)

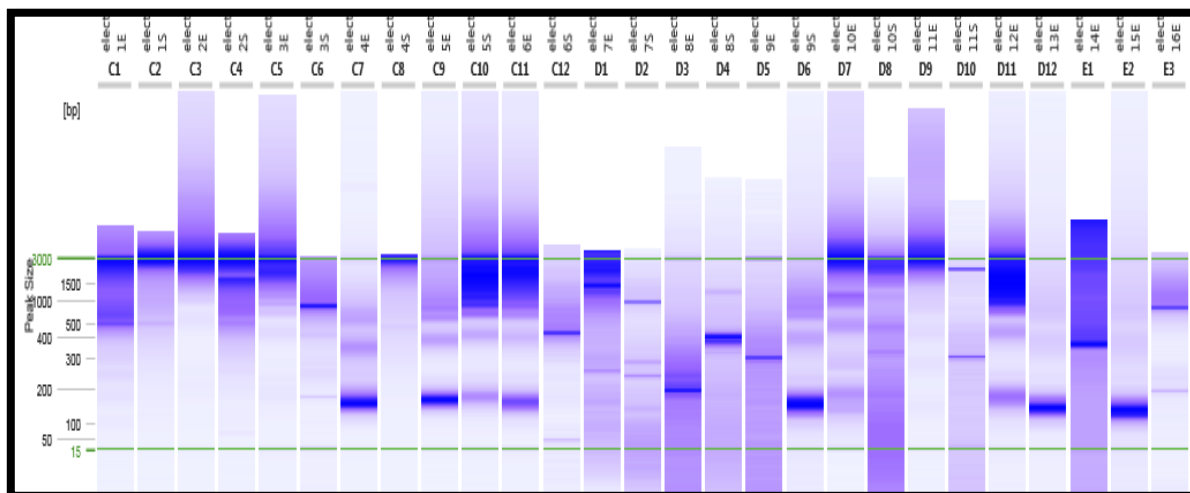


Figura 4. Electroforesis de material nucleico de las muestras obtenidas. Electroferograma de alta resolución capilar

7.5 Amplificación de Regiones de VPH

Se observa cómo se comportaron las amplificaciones al someter a los productos de la PCR a desnaturalización por medio del aumento de la temperatura, a lo que se le llama análisis melting.

COLOR	MUESTRA	COLOR	MUESTRA	COLOR	MUESTRA
	1E		7E		11E
	2E		7S		11S
	2S		8E		12E
	4E		8S		13E
	4S		9E		14E
	5S		9S		15E
	6E		10E		16E
	6S		10S		

Tabla 9. Muestras de PCR con cebador GP

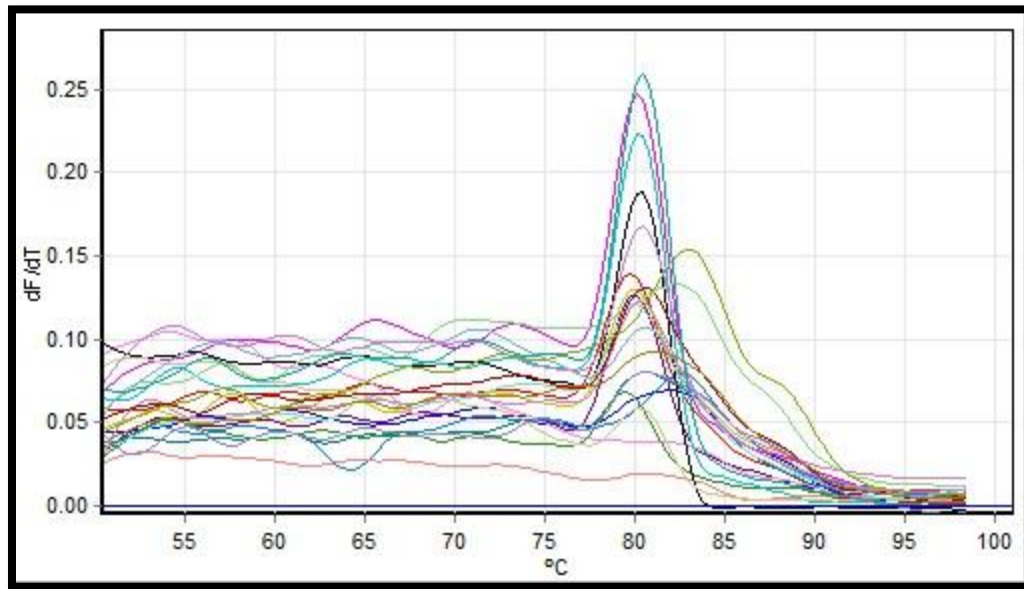


Figura 5. Curva Melt para VPH. Se observan las fluorescencias para la amplificación de muestras con GP.

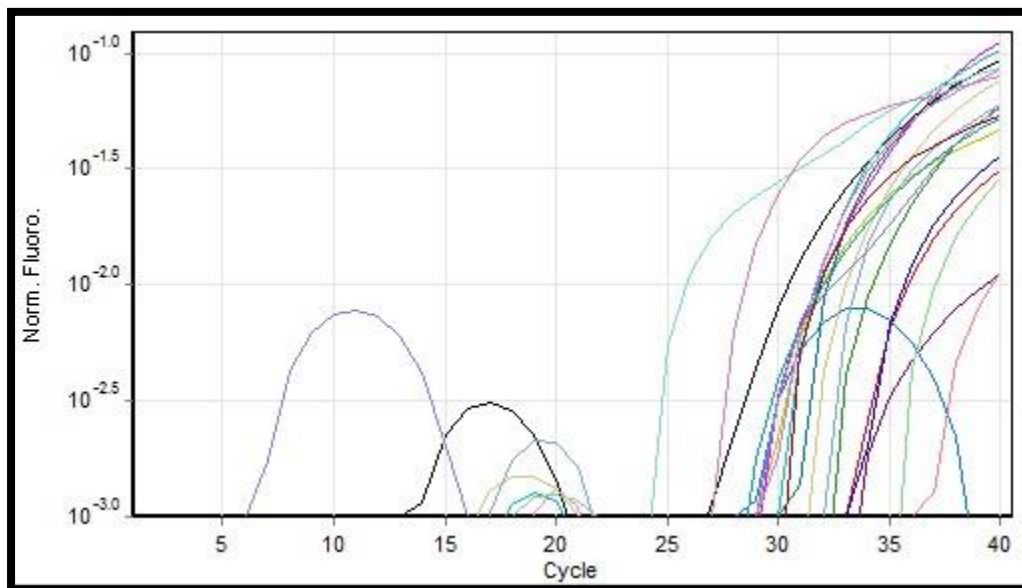


Figura 6. Análisis de curvas de amplificación de muestras con GP. Se muestran las curvas de amplificación analizadas, donde se observan los ciclos en los que alcanzaron cada una de las muestras su amplificación logarítmica.

COLOR	MUESTRA	COLOR	MUESTRA	COLOR	MUESTRA
	1S		7E		11E
	2S		7S		11S
	3S		8E		12E
	4E		8S		13E
	4S		9E		14E
	5S		9S		15E
	6E		10E		16E
	6S		10S		

Tabla 10. Muestras de PCR con *primer L*.

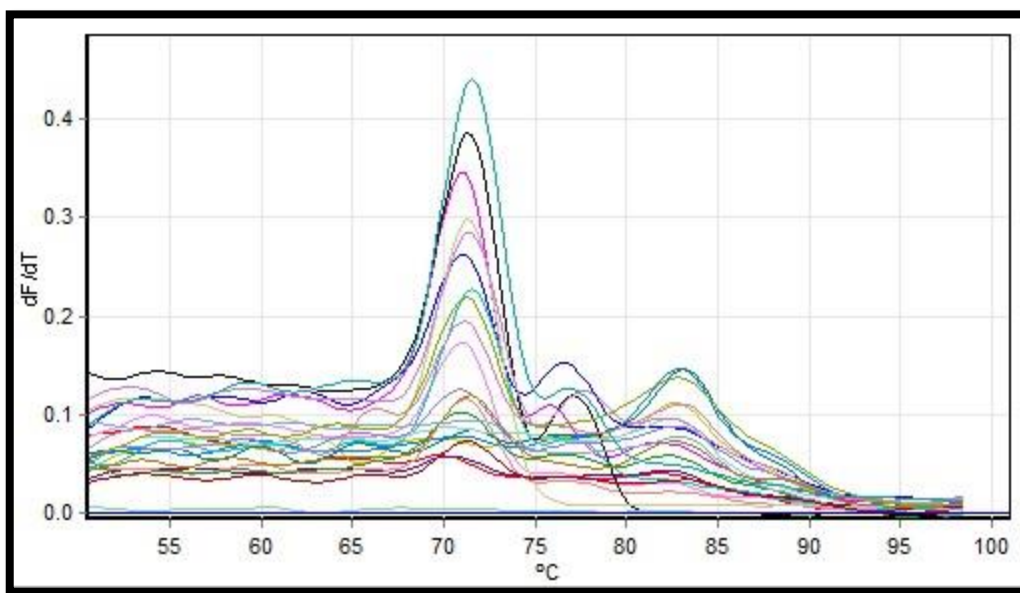


Figura 7. Curva Melt para VPH. Se observan las fluorescencias para la amplificación de muestras con L. Véase que en la gráfica el pico aumenta a los 70°C.

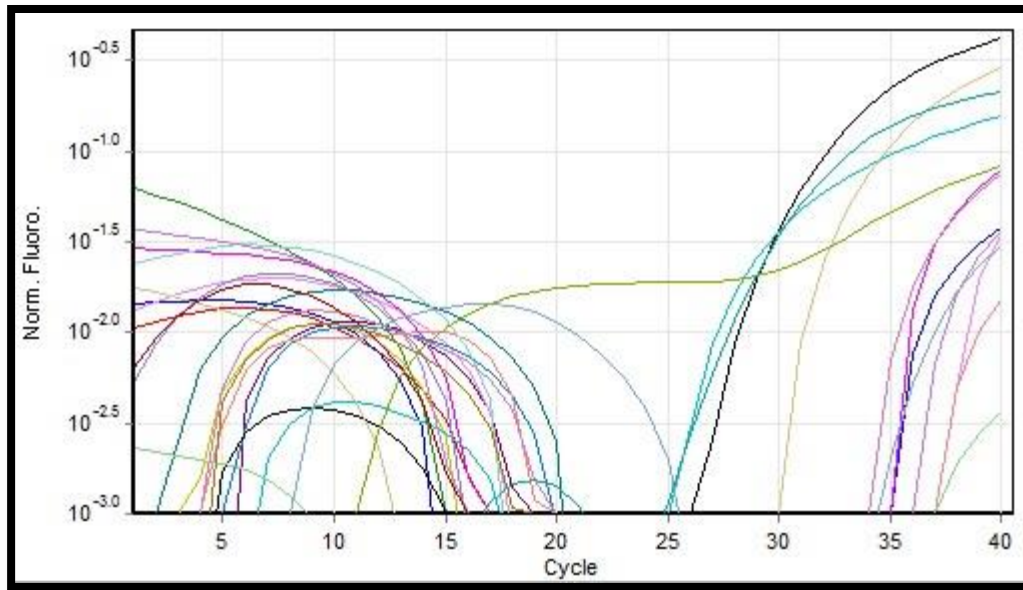


Figura 8. Análisis de curvas de amplificación de muestras con L. Se muestran las curvas de amplificación analizadas, donde se observan los ciclos en los que alcanzaron cada una de las muestras su amplificación logarítmica.

COLOR	MUESTRA	COLOR	MUESTRA	COLOR	MUESTRA
	1E		7E		11E
	2S		7S		11S
	3S		8E		12E
	4E		8S		13E
	4S		9E		14E
	5S		9S		15E
	6E		10E		16E
	6S		10S		

Tabla 11. Muestras de PCR con *primer* MY

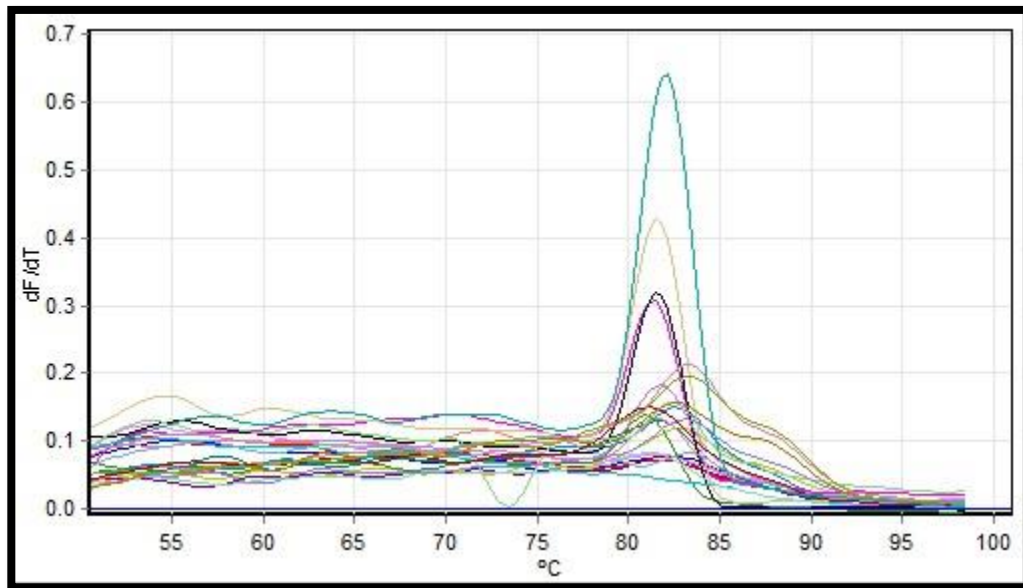


Figura 9. Curva Melt para VPH. Se observan las fluorescencias para la amplificación de muestras con MY.

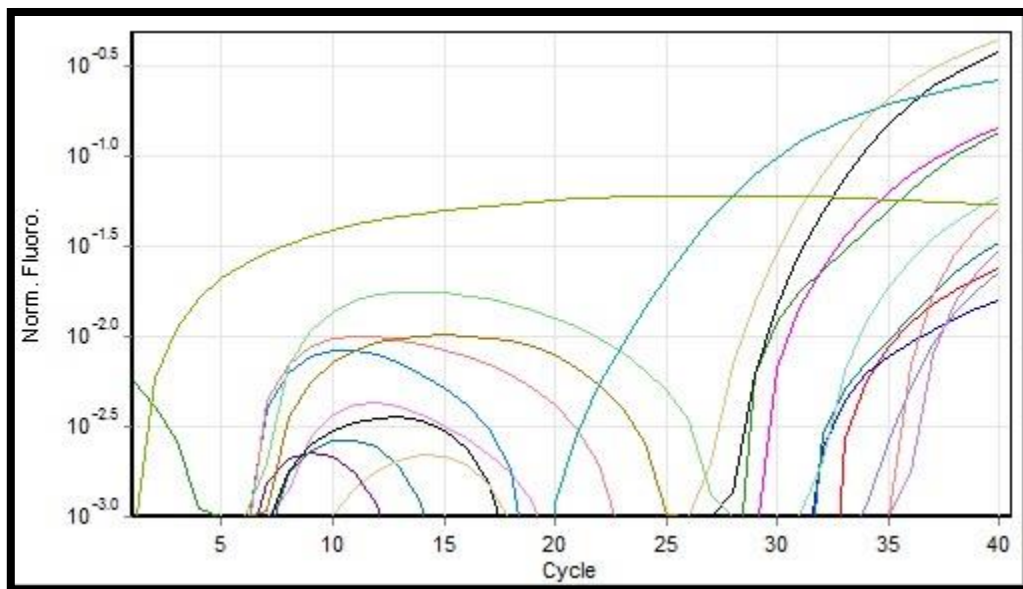


Figura 10. Análisis de curvas de amplificación de muestras con L. Se muestran las curvas de amplificación analizadas, donde se observan los ciclos en los que alcanzaron cada una de las muestras su amplificación logarítmica

COLOR	MUESTRA
	1E
	2E
	3E
	5E
	CONTROL 1
	CONTROL 2
	1E BG
	2E BG

Tabla 12. Muestras de PCR con *primer* MY y control interno Beta globina

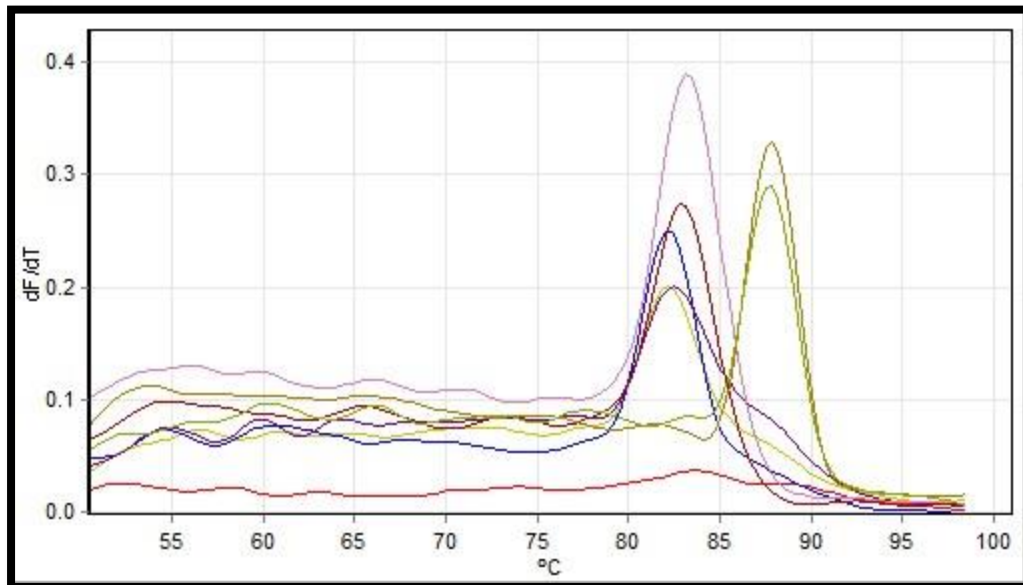


Figura 11. Curva Melt para VPH. Se observan las fluorescencias para la amplificación de muestras con MY y el control endógeno Beta globina.

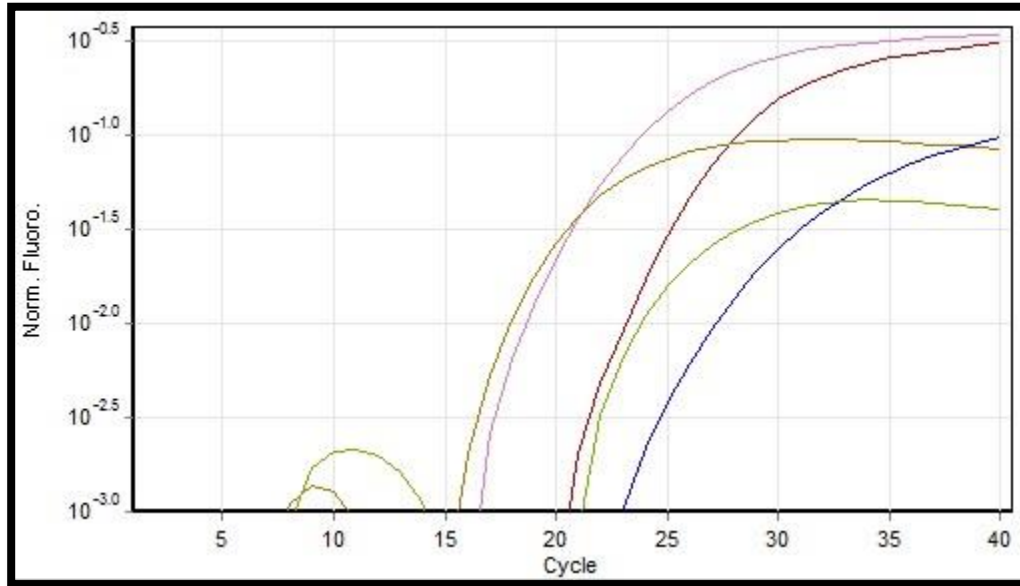


Figura 12. Análisis de curvas de amplificación de muestras con MY y el control endógeno Beta globina. Se muestran las curvas de amplificación analizadas, donde se observan los ciclos en los que alcanzaron cada una de las muestras su amplificación logarítmica.

7.6 Análisis de amplificación de PCR

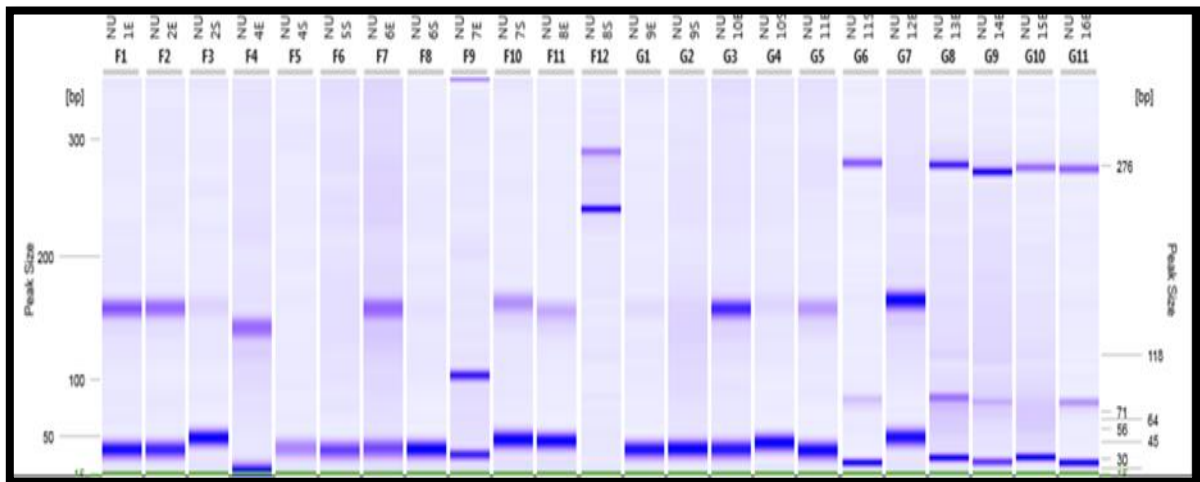


Figura 13. Electroforesis de PCR con *primer* GP. Carriles F1 a G11, muestras amplificadas con GP (150 pb).

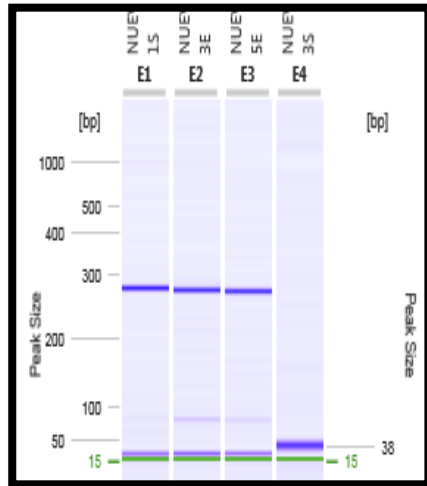


Figura 14. Electroforesis de PCR con *primer GP*. Carriles E1 a E4, muestras amplificadas con GP (150 pb).

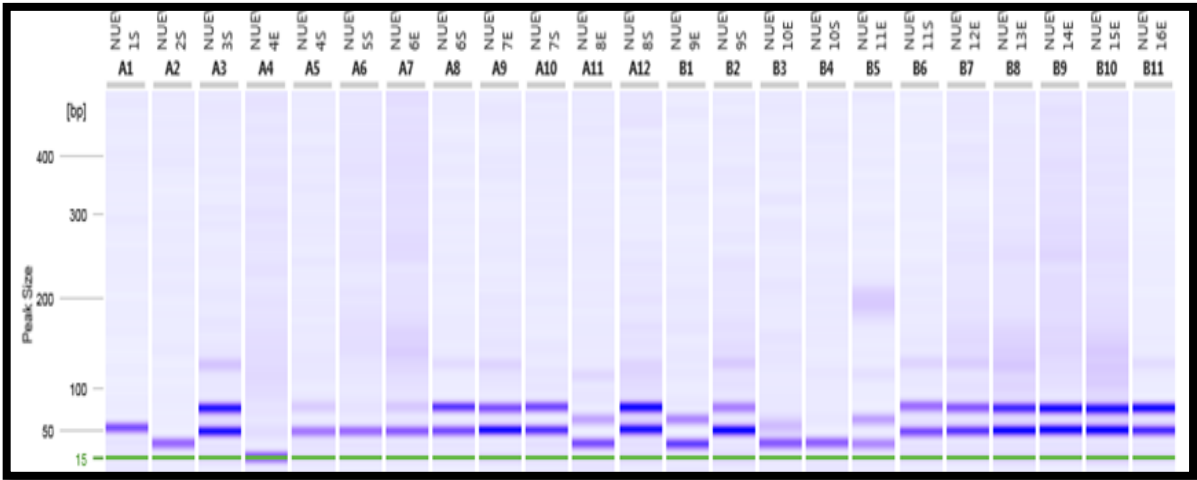


Figura 15. Electroforesis de PCR con *primer L*. Carriles A1 a B11, muestras amplificadas con L (244 pb).

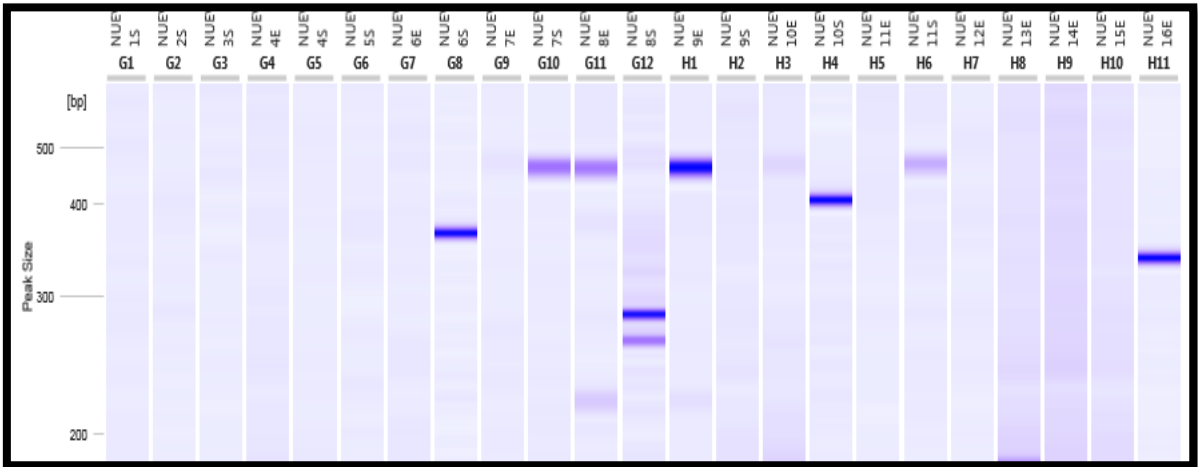


Figura 16. Electroforesis de PCR con *primer* MY. Carriles G1 a H11, muestras amplificadas con MY (450 pb)

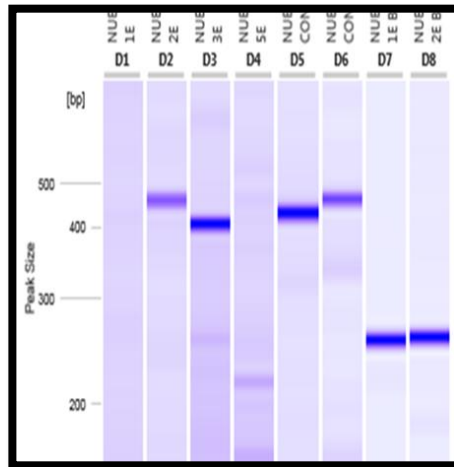


Figura 17. Electroforesis de PCR con *primer* MY. Carriles D1 a D6, muestras amplificadas con MY (450 pb). Carriles D7 y D8 refieren control endógeno.

7.7 Selección de muestras a secuenciar

Selección de muestras positivas a VPH con los *primers* **GP5/GP6**, **MY9/MY11** y **BG**

MUESTRA	Región Polimórfica(+)			Control
	MY	L1	GP	BG
1E	-	-	+	
1S	-	-	-	
2E	-	-	-	
2S	-	-	-	
3E	-	-	+	+
3S	-	-	-	
4E	-	-	-	
4S	-	-	-	
5E	-	-	+	
5S	-	-	-	
6E	-	-	-	
6S	-	-	-	
7E	-	-	-	
7S	+	-	-	
8E	+	-	-	
8S	-	-	-	
9E	-	-	+	
9S	-	-	-	
10E	-	-	-	
10S	-	-	-	
11E	-	-	-	
11S	-	-	-	+
12E	-	-	+	
13E	-	-	-	
14E	-	-	-	
15E	-	-	-	
16E	-	-	-	

Tabla 13. Muestras seleccionadas

7.8 Análisis en BLAST

Una vez identificados los casos positivos, 12 muestras fueron secuenciadas. (Anexo E)

Tomando en cuenta los casos en los que se logró determinar el tipo viral se identificaron los siguientes subtipos del Virus de Papiloma Humano:

MUESTRA	SUBTIPO
1E F GP	Virus no clasificado
1E R GP	Secuencia no similar
3E F GP	Subtipo 13 Subtipo 6
3E R GP	Subtipo 13
5E F GP	Subtipo 13
5E R GP	Subtipo 160
9E F GP	Subtipo 32 Subtipo 6
9E R GP	Subtipo 13
3E F BG	Virus no clasificado
3E R BG	Subtipo 205
11S F BG	Secuencia no similar
11S R BG	HPV L-55

Tabla 14. Resultados de Secuenciación.

8. DISCUSIÓN

La Hiperplasia Epitelial Multifocal es una enfermedad que antes era descrita en la primera década de vida; analizando nuestros resultados, reportamos que la edad es variable ya que donde encontramos más casos fue en pacientes pertenecientes a los grupos etarios de 0-10 años y de 21-30 años en comparación a González-Loza y colaboradores que reportaron un predominio en la cultura maya en menores de 15 años en un 79.1%. (24)

Con respecto al predominio de sexo; la hiperplasia epitelial multifocal se presentó más frecuentemente en mujeres en un 70%, dato que coincide con lo publicado en los últimos 10 años por autores como Carrillo-Montiel en un 53%. (7)

La predisposición geográfica encontrada en este estudio, fue favorable en un 43% a pacientes que nacieron en la Ciudad de México, sin embargo nuestro estudio arroja que el Estado de Veracruz en un 17% y el Estado de México en un 15% presentan datos de esta patología.

La lesión más grande y de donde se tomó la biopsia en los pacientes de la Unidad de Especialidades Odontológicas se encuentra en la mucosa yugal con un 38%, seguido en la mucosa labial (labios) con un 34% y posteriormente en la lengua con un 28%; estos datos son similares a los resultados presentados por Ledesma-Montes que reporta como principal sitio afectado la mucosa yugal, seguida de mucosa labial (labios); por el contrario reporta el paladar como tercer sitio más frecuente en la hiperplasia epitelial multifocal. (48)

Dentro de los reportes estudiados encontramos la presencia de múltiples verrugas en comisuras labiales en un 65% de los casos, las cuales se describen como manchas y verrugas bien definidas, que van desde planas hasta una elevación de 0 a 5 mm; se describen unilaterales y bilaterales y que van desde la mucosa con extensión hasta piel.

Nuestro estudio encontró que nuestra población presenta lesiones múltiples en un 100% de los casos difiriendo con autores como Cerón que presenta como resultados 91% lesiones múltiples y 9% lesión única. (6)

Por otro lado, respecto a las comorbilidades asociadas, el 9% de nuestros casos refieren presentar anemia, que si bien como menciona Elizondo y colaboradores aun no es demostrable para su diagnóstico, puede tener correlación con la enfermedad. (67)

En referencia a nuestros experimentos de PCR, encontramos que los cebadores GP5(F)/GP6(R) mostraron mayor especificidad para la amplificación de VPH a diferencia de Güitekin y colaboradores (61), quienes con el uso de los cebadores MY09/MY11 encontraron VPH subtipo 11, 13 y 32; también demostramos amplificación de VPH con el cebador BG, al igual que González Losa en el 2011. (62)

Los subtipos de VPH 13 y 32, propios a la Hiperplasia Epitelial Multifocal, provienen de la familia de los Alphapapillomavirus, la cual se distingue por estar presente en lesiones cutáneas; en nuestro estudio se destaca el hallazgo virológico del subtipo de VPH 160 en una de nuestras muestras; este nuevo subtipo de VPH, fue descubierto en verrugas planas y también forma parte de la familia de los Alphapapillomavirus; a su vez se encontró la presencia de otros dos nuevos subtipos de VPH llamados 205 y L-55, estos son provenientes genéticamente de la familia de los Gammapapillomavirus, la cual, al igual que la familia de los Alphapapillomavirus, se encuentra presente en lesiones cutáneas; estos nuevos subtipos de VPH, han sido mencionados en una ocasión y fueron encontrados en piel sana expuesta al sol, y en heces fecales de recién nacidos.

La aparición de una doble infección de subtipos de VPH se hizo presente en 2 muestras y se relacionó al subtipo de VPH 6, esta correlación coincide con Henke y colaboradores, los cuales mencionan la presencia de VPH subtipo 13 y 6 en una muestra. (63)

9. CONCLUSIONES

Dentro de esta investigación, percibimos que la Hiperplasia Epitelial Multifocal es una enfermedad la cual ha aumentado su incidencia con el tiempo y se encuentra ya no solamente en zonas específicas de la República Mexicana, sino que también ya afecta otros estados no descritos en la literatura.

Al encontrar clínicamente la presencia de esta enfermedad fuera de la cavidad oral, en las comisuras labiales, sugerimos estudiar las lesiones que se encuentren en esta zona en un futuro para identificar si el subtipo de VPH corresponde a los propios de la Hiperplasia Epitelial Multifocal o si se encuentra un nuevo subtipo, quizá alguno de los que hayamos identificado en este estudio.

Con base en nuestros resultados, tanto clínicos como de laboratorio, podemos elucidar que esta enfermedad que ha sido llamada como una enfermedad papulonodular que se presenta en la mucosa, también puede estar asociada a lesiones cutáneas, por lo que se debe de considerar una lesión mucocutánea papilomatosa.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Fitzpatrick T. Dermatología en Medicina General. Tercera edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1998; 1914-22.
2. Neville B., Damm D., Allen J. Oral & Maxillofacial Pathology. Segunda Edición. Philadelphia: Saunders Company; 2002. p. 331, 421.
3. Rosa L, Buonsante M, Arias M *et al.* Hiperplasia epitelial focal: ¿por qué enfermedad de Heck?. Avances en Odontoestomatología 2003; 19 (5):239-47.
4. Grinspan D.: Hiperplasia focal epitelial (Enfermedad de Heck o de Soneira-Fonseca-Heck). En: Grinspan D. Enfermedades de la Boca. Semiología, Patología, Clínica y Terapéutica de la mucosa oral. Vol. III, cap. XXXII-E. Edit. Mundi; Buenos Aires; 1976; pp. 1803-1808.
5. Sedano et al. "Clinical Orodental Abnormalities in Mexican Children", Oral Surg.1989; 68 (3) 300-311.
6. Cerón I, Cerón J, Gonzales M. Hiperplasia epitelial multifocal: revisión de 71 casos. Dermatología CMQ. 2011;9(3):176-180.
7. Carrillo-Montiel JE, Conde-Ferrández L, Ayora-Talavera G, Puerto Solís M, Gonzalez-Losa Maria del refugio. Estudio de la hiperplasia epitelial multifocal en tres comunidades rurales del Estado de Yucatán, México. Rev Biomed 2015;26:133-137.
8. Romero CR. Microbiología y Parasitología Humana. México City: Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 203-329.
9. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/infecciones-transmision-sexual.html>
10. Rivera, R, Aguilera J, Larraín A. Epidemiología del Virus Papiloma Humano. Rev Chil Obstet Ginecol 2002;67(6): 501-506
11. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression and post-translational regulation. Front Biosci 2006; 11: 2286-2302.
12. <http://www.hpvcenter.se/>

13. de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27.
14. Bhaskar S. *Patología bucal*. Sexta edición. Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 1984; p. 170
15. Archard, H.O.; Heck, J.W.; Stanley, H.R.: Focal epithelial hyperplasia: an unusual oral mucosal lesion found in Indian children. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 201-212
16. Estrada L. Aporte al estudio odontológico de los Indios Katrios. *Heraldo Dental* 1956; 2:5-11
17. Estrada L. Estudio médico y odontológico de los Indios Katrios del Choco. *Temas Odontológicas* 1960; 7:198-210
18. Ortega C, Gonzalez S, Allevato M *et al*. Hiperplasia epitelial focal Enfermedad de Heck Nuestra casuística y revisión del tema. *Arch. Argent. Dermatol* 2009; 59: 193-99.
19. Helms O. Sifylis i Grönland. *Ugesker Laeg* 1894; 5rk (1bd) 265-276
20. Praetorius-Clausen F, Mogeltoft M, Roed-Petersen B. Focal epithelial hyperplasia of the oral mucosa in a south-west Greenlandic population. *Scand. J. Res.* 1970; 78 287-294
21. Rojas, J. (1971). “Hiperplasia Epitelial Focal y Papilomas. Presentación de 3 casos”. *Revista Mexicana de Dermatología*. 1971; 67 (26): 32-34.
22. Luengas, I. et al. (1987). “Hiperplasia epitelial focal. Informe de un caso familiar”. *P. O.* 1987; 8 (9) 41-44
23. Morales M. et al. (1989). “Estudio comparativo de prevalencia de hiperplasia epitelial focal en tres grupos poblacionales del Estado de Puebla”, *Rev. ADM.* 1989;46 (1) 15-17.
24. González B, Bobadilla A, y González H. “Prevalencia de patología oral y de estructuras relacionadas en paciente geriátrico de la Región I del Estado de México” *Rev. ADM.* 1995; 52 (3) 129-37

25. Hernandez-Jauregui P, Eriksson A, Tamayo Perez R, Pettersson U, Moreno-Lopez J. Human papillomavirus type 13 DNA in focal epithelial hyperplasia among Mexicans. Brief report. Arch Virol. 1987;93(1-2):131-7.
26. García-Corona C, Vega-Memije E, Mosqueda-Taylor A, *et al.* Association of HLA-DR4 (DRB1*0404) with human papillomavirus infection in patients with focal epithelial hyperplasia. Arch Dermatol 2004; 140: 1227-31.
27. Guevara A. Prevalencia y Distribución de la hiperplasia epitelial focal en la población escolar de Morrope-Lambayeque-Perú. Folia Dermatol 2003;14(1):15-20
28. Carlos R, Sedano H. Multifocal papilloma virus epithelial hyperplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994;(77) 631-5
29. Falaki F, Amir M, Pakfetrat A *et al.* Detection of human papiloma virus DNA in seven cases of focal epitelial hiperplasia in Iran. J Oral Pathol Med (2009) 38: 773–776
30. Rodriguez M, Guzmán Y, Tejada P, Sanchez R, Rodriguez C. Percepcion y experiencias frente a la hiperplasia epitelial focal en una comunidad indígena Huitoto/Ticuna del Amazonas Colombiano. Rev. Fac. Med. 2008;56 (2):101-108
31. Jayasooriya P, Abeyratne S, Ranasinghe A, Tilakaratne W. Focal epithelial hyperplasia (Heck's disease): report of two cases with PCR detection of human papillomavirus DNA. Oral Dis. 2004;10(4):240-3.
32. de la Teja-Ángeles, E.; Martínez-Sandoval, B.; TéllezRodríguez, J.; Ramírez-Paredes, L. F.; Durán-Gutiérrez, A. & Cadena-Galdós, A. Hiperplasia epitelial multifocal. Manifestaciones bucales en niños. Revisión de la literatura. Acta Pediatr. Mex., 29(1):31-5, 2008.
33. Pietropaolo N, Cabrera H, Rava M, *et al.* Inclusiones virales en la hiperplasia epitelial focal. Sinonimia: enfermedad de Heck; Enfermedad de Soneira-Fonseca-Heck. Rev Argent Dermatol. 1981; 62: 331-37
34. Pizzi N, Fasoli L, Parra V, *et al.* Hiperplasia epitelial focal. Rev Argent Dermatol. 1995; 76: 76-79

35. Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., & Sidransky, D. Pathology and Genetics of Tumours of the Head and Neck. *World Health Organization Classification of Tumours*; 2005. p. 182-184.
36. Pfister, H., Hettich, I., Runne, U., Gissmann, L., & Chilf, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *Journal of virology*, 1983; 47(2): 363-366.
37. Beaudenon S, Praetorius F. Kremsdorf D et al. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J. Invest. Dermatol.* 88: 130-5, 1987
38. Serena-Gomez E, Bologna-Molina RE, Nevarez-Rascon A, Rocha BA. HPV prevalence on malignant lesion process of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Odontostomat.*, 5(1):5-12, 2011.
39. Ledesma-Montes C, Garcés-Ortíz M, Hernández-Guerrero J. Clinicopathological and Immunocytochemical Study of Multifocal Epithelial Hyperplasia. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:2211-17
40. Mordoh A, Sano S, Aguas S, González E, Lanfranchi H. Síndrome de Cowden. Caso Clínico y revisión de la literatura. *Revista de la Facultad de Odontología.* 2010:25(58):44-46
41. Vega U. Síndrome de Cowden. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXVI.* 2012:25(602):309-15
42. Kwiatkowski D, Short M. Tuberous sclerosis. *Arch Dermatol* 1994;130(3):348-54.
43. Arenas R. Atlas, diagnóstico y tratamiento. 3 ed. México: Mc Graw- Hill Interamericana; 2003. p. 230-50.
44. Estrada P Tratamiento crioquirúrgico de la verruga vulgar de la cara. *MEDISAN.*2007; 11(4):1-5.
45. Rocha L. Virus causantes de enfermedades Prevalentes, emergentes y re-emergentes en México: Papiloma. Depto. Biología molecular y biotecnología. Instituto de investigaciones biomédicas UNAM.


46. Flores J, Strauss M. Papilomas orales: un análisis clínico en pacientes que acuden a la clínica odontológica Univalle-La paz. Rev Inv Inf Salud. 2010;5(12):14-23
47. Esperanza G. Diagnostico anatomopatológico: Papiloma escamoso. Etiopatogenia. MAXILLARIS. 2010; (1):69-70
48. López M, Pulido N, Rentería I. Enfermedad de Darier. Informe de caso familiar y revisión bibliográfica. Dermatol Rev Mex. 2010;54(4):206-209
49. Gotlib N, Barros M, Raimondo N. Hiperplasia epitelial focal. Rev. Argent Dermatol 1982; 63: 59-63
50. Harris J, Rebolledo M, Camacho F, Carmona M, Díaz A. Ácido tricloroacético, una opción terapéutica en la hiperplasia epitelial focal. Presentación de un caso. Avances en Odontoestomatología 2010; 26 (6) 323-28
51. Elizondo A, Del Pino G, López M. Hiperplasia epitelial focal: Actualidades y tratamiento. Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial 2010;6 (3): 111-115
52. Alonso de Ruiz P, Lazcano E, Hernández M. Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. 2001. Ed. Panamericana. 57-64
53. Lupiani M. Fraga M. Vacunas del Papiloma Humano: Se amplía el calendario vacunal. Canar Ped. Enero-Abril 2008;32(1): Disponible en: http://www.comtf.es/pediatria/Bol_2008_1/Papiloma_Humano_vacuna_PLupiani.pdf
54. Gutiérrez R. Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención del cáncer cervicouterino. AMATGI 2011;3(5):16-23
55. Kit para captura de híbridos. **Digene corporation**. 2005. pp. 2-29
56. Alejos L., Aragón M.C. y Cornejo A. Extracción y Purificación de ADN. En A. Cornejo (Comp.) *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-25). México: SEMARNAT
57. Serrato A., Flores L., Aportela J. y Sierra E. PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa. En A. Cornejo (Comp.) *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 53-74). México: SEMARNAT

58. Soto Y. et al. Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus humano. Rev cubana Med Trop. 1998; 50(3): 191-98
59. www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf
60. Gutiérrez R. Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención del cáncer cervicouterino. AMATGI 2011;3(5):16-23.
61. Güitekin SE, Tokman Yildirim B, Sansoy S. Oral Focal Epithelial Hyperplasia: Report of 3 cases With Human Papillomavirus DNA Sequencing Analysis. Pediatric Dentistry. 2011; 33 (7); 522-524.
62. González-Loza MR, Suarez-Allén RE, Canul-Canche J, Conde-Ferrández L, Eljure-López N. Multifocal epithelial hiperplasia in a community in the Mayan área of Mexico. International Journal of dermatology. 2011;50:304-309.
63. Henke R-P, Guerin-Reverchon I, Milde-Langosch K, Strömme-Koppang H, Löning T. *In situ* detección of human papilomavirus Types 13 and 32 in focal epithelial Hyperplasia of the oral mucosa. J Oral Pathol Med 1989; 18: 419-421.
64. Bolatti EM, Chouhy D, Casal PE, et al. Characterization of novel human papillomavirus types 157, 158 and 205 from healthy skin and recombination analysis in genus γ -Papillomavirus. Infection, Genetics and Evolution 42 (2016) 20–2
65. Yu J.M, Ao Y-Y, Zhao G, Li L-L, Wang D, Duan Z-J. 2013 Identification of a novel strain of human papilomavirus from children with diarrhea in China. Genome Announc. 1(5):e00761-13. Doi:10.1128/genomeA.00761-13.
66. Mitsuishi T, Ohsawa I, Kato T, Egawa N, Kiyono T (2013) Molecular Cloning and Characterisation of a Novel Type of Human Papillomavirus 160 Isolated from a Flat Wart of an Immunocompetent Patient. PLoS ONE 8 (11): e79592. Doi:10.1371/journal.pone.0079592
67. Elizondo, A. D. P., del Pino, G. T., & Salgado, M. L. L. (2010). Hiperplasia epitelial focal: Actualidades y tratamiento. Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial, 6(3), 111-115.

11. ANEXOS

11.1 Anexo A

Formato de Biopsias

SECRETARIA DE LA DEFENSA NACIONAL. DIRECCION GENERAL DE SANIDAD. UNIDAD DE ESPECIALIDADES ODONTOLÓGICAS. DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.				
				
GRADO, NOMBRE Y TEL:	MATRICULA	EDAD	SEXO	No. de control
PROCEDENCIA:	RAZA, LUGAR DE NAC.		SITUACION:	
MEDICO TRATANTE	FECHA RECEPCION		FECHA DE REPORTE	
INFORMACION CLINICA DE LA LESION				
NUMERO:				
LOCALIZACION:				
FORMA:				
COLOR:				
TAMAÑO:				
CONSISTENCIA:				
BASE Y/O BORDES:				
TIPO DE BIOPSIA:				
SINTOMATOLOGIA:				
PROBABLE CAUSA:				
INFORMACION MEDICA RELEVANTE:				
TIEMPO DE EVOLUCION:				
ESTUDIOS O TRATAMIENTOS PREVIOS:				
DIAGNOSTICO CLINICO:				
DESCRIPCION MACROSCOPICA:			FECHA:	
PROSECTOR:				
DESCRIPCION MICROSCOPICA:			FECHA:	
DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO:				
PATOLOGO:				

11.2 Anexo B

Protocolo de uso: QIA Symphony DSP DNA Mini Kit

1. Realizar un corte de tejido de cada biopsia con un peso de 0.04 grs.
2. Colocar cada corte en un tubo de 2 ml.
3. A cada tubo añadir 180 µl de Buffer/ tampón ATL
4. Añadir 20 µl de Proteinasa K por cada tubo, mezclar golpeando ligeramente el tubo.
5. Llevar los tubos al termociclador e incubar a una temperatura de 56°C agitándolos a 900 rpm aproximadamente 3 horas, hasta que el tejido esté lisado completamente.
6. Mantener los tubos en el termociclador aproximadamente 16 horas para eliminar trozos de material insoluble antes de la extracción de ADN.
7. Mantener los tubos en una congelación de -80°C.

11.3 Anexo C

Protocolo de uso ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (USB)

1. Mantener el tubo de ExoSAP-IT en hielo mientras se ocupe.
2. Mezclar 2ul de ExoSAP-IT por cada 5ul de muestra post-PCR, añadir proporcionalmente.
3. Incubar las muestras en termociclador a una temperatura de 37°C durante 15 minutos para degradar sobrantes de primers y nucleótidos.
4. Incubar las muestras en termociclador a una temperatura de 80°C durante 15 minutos para inactivar el producto ExoSAP-IT.
5. Congelar los productos listos a una temperatura de -20°C hasta nuevo uso.

11.4 Anexo D

Protocolo de purificación de muestras Post secuenciación DTCS-Quick Start Kit (Genome Lab)

1. Preparar tubos de 1.5 ml estériles para cada muestra
2. Preparar la Solución (Fresh Stop Solution) mezclando 2 μ l de 3M Acetato de Sodio pH 5.2 (NaOAc), 2 μ l de Na₂-EDTA (100mM) y 1 μ l de Glicógeno. Colocar 5 μ l de Fresh Stop Solution a cada tubo.
3. Transferir las reacciones de PCR de secuencia a los tubos correspondientes y mezclar generosamente.
4. Añadir a cada tubo 60 μ l de etanol/agua al 95% congelado a -20°C y mezclar generosamente. Inmediatamente centrifugar a 14,000 rpm a 4°C por 15 minutos. Remover cuidadosamente el sobrenadante con micropipetas. La perla (pellet) debe ser visible.
5. Resuspender la perla (pellet) dos veces con 200 μ l de etanol/agua a 70% congelado a -20°C. Por cada re suspensión, centrifugar inmediatamente a 14,000 rpm a 4°C por un mínimo de 2 minutos. Remover el sobrenadante con micropipetas.
6. Después de remover todo el etanol posible, colocar las muestras en vacuum durante 40 minutos (sin temperatura).
7. Resuspender la muestra en 40 μ l de Sample Load Solution (SLS)

11.5 Anexo E

Secuencias

1E F GP

CACTCTCTATCAANACACTAGATAATACTCTCTGGAGAAAGATACTAACCAAAG
CACACATGATGAAAAAGTAGATCGAGANATGCNTACAANGAATATCATTAAAG
AGTTTGTATTAGTAAAAAAGATNGTGCCAATCTACGCGGCATAGGACGGGGA
CGNATAAGCGGTGCGNGACAGNAGGACCGACCCACCCGGCCCCNGACCG
CCCCCGCCCCCGCCGCCCCCCCCCCCGCCCCCCCCCCCC

1E R GP

TTATCTGTATATCTCCTCGTGGCCATATCTCGTCTAGACCAGAGCTAGCC
TCGTCCGTCGGCTCAGCACACACNTGTACGCTCGTACCCGATCCCTCGCGTA
GATCCGCGATCCTCCATCCACACANGATAACAACGCGGGGGGGCGGTGG
TGGCCGGCCCCACAGACCCACCCNCCGGCGCAAAGCCGCACGGAGCCG
NGCGAGGCCAAACCAGACAGCGCCACCAGCCGGCCACGCTGGCAGACGCT
GGCCAGCCAGCCGGCCAGCCCACGAGCACC

3E F GP

ACTGTGTGTGACAGACCACTACATACATACTACTTTACAGACACATATAAGGA
CCACAGAATATAAACAGTACATGCGACATGTAGAAGAGTATGATTTACAGTTTA
TATAAACANGTGGCTGTAGAATAGGGAAGGGAGAGAGAGGGGGAAAGNNNN
NNNNNNNN

3E R GP

TACTGTGTTATATTCTGTGGCCTTATATGTGTCTGAAAGAGATGATGTAGTGG
CTGCACACACAGTCATGTTAGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA
GGGGGGGGGGGGGAAGATNGAGAGGAAGGGGAAGAGANCGAGAGGAAGAG
AGAGAGAGNN

5E F GP

AATGACTGTGTGTGCAGCCACTACATCATCTCTTTTCAGACACATATGAAGGCC
ACAGAATATAAACAGTACATGCGACATGTAGAAGAGTATGATTTACAGTTTATG
ATAACAGGGTGTGCTGTGGGGCATATGGGGGGGATAGGGCGGGAGAGGGG
GGGGGGNNGGGGGGGGGG

5E R GP

ATCGNGATNCGNTGGGATGCTATGCATTTCGTCTCGTTTCAGGTCGGGCCCCNT
ATCATTTCCTTTTCGATTCGATNCATAGAACATGATGAATGGGTTAGTACCGTCG
GACAGACACACACNGATNGCTNGATTAGTACACTAGACGTAGTAGTCTAACTA
ACACACAGATAAAACAGGNNGGGGGCGNNGGGTGGGTNGNCGNNGNCACAA
CACAGGGACCTTTCCCACGCCGTTTCGCCAAGGAACCAACCCGACGCGGACN
GCGGACTCTCGACCGTCACGGGGTGCACGGGAGGGAGCACAACAAAACGGG
GCGACAAACAAAGGCGGCTAAACNCGATGGGACTCTGATTACAATCAATGTA
ACAACAAGCGCCCTGCGTACCGACAGCTGTCTGCATACGNAGTGCCGTNCTA
CATGCCTCGCNTGGGNAN

9E F GP

TGGACTGTCGTGTGTAGCACGAGATCATCTACTGCTGAGAGACATCATGAGG
TGCCACGAATATAGAAACGTAACGTCAACTGTAGAAGAGTATGATTAACGTT
ATAAAAGGGNTGGGAAAGGGGAAGGGAGGGNNNNNNNNNN

9E R GP

CATGTA CTGTGTATATCCTCGTGGCCTTATATGTGTGCACGAAAGAGATGATGT
CAGTGGCTGCACACACAGTCATGTCCAGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGT
CAACAAAACCC
CCCCCCCCCCCCCGCCCCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
CCCCCCCCACCC
CCCCCCCCCCCCCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCCC
CCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGTCCNCCCCCCCCCCTGCCCTGCC

3E F BG

AAGCTTAGAACTCGATAGTATGGAGGCCACACCCGTAGGGTTGGCCAATCTA
CTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGG
CAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACA ACTGTGTTCACTAGCAAC
CTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTAC
TGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTA

3E R BG

TTCGCTCACGTC ACTTCTCCTCCGGAGTACGGTGCCCTGGTGTCTGTTTGAG
GTTGCTAGTGACCGTTGTGTCTGAAGCATGTGAGCCTGGATGGCTCTGCCCTG
ACTTTTATGCCCGCCCTGGCTCCTGCCCTCCCTGCTCCTGGGAGTAGATTGG
CCCCCTAGGGTGTGGCTCCNCNNGGGT GAGGTCTCGTGATGGACCGCGTT
CCTGTCCTTGGCTCTTC

11S F BG

AACTAGAACTCGATGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAG
GAGACAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGA
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTACTGACACAACCTTGTTACACTACGACAAC
CTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTAC
TGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTT

11S R BG

TTCTACAAGCAAACCTTCTACCTCAGGAGTACAGAGTGCACCATGGTGTCTGTT
TGAGGTTGCTAGTGAACACAGTTGTGTCAGAAGCAAATGTAAGCAATAGATGG
CTCTGCCCTGACTTTTATGCCCAGCCCTGGCTCCTGCCCTCCCTGCTCCTGG
GAGTAGATTGGCCAACCCTAGGGTGTGGCTCCACAGGGTGAGGTCTAAGTGA
TGACAGCCGTACCTGTCCTTGGCTCTACAA