



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN
NIÑOS CON PAPILOMATOSIS
RESPIRATORIA RECURRENTE.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
SUB-ESPECIALISTA EN :

OTORRINOLARINGOLOGÍA
PEDIÁTRICA

P R E S E N T A:

Dr. César José Beato Coa

TUTOR:

Dra. Andrea Orozco Sanchez

ASESORES:

Dr. Carlos de la Torre
Dr. José Arellano Galindo



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2022



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.

TESIS

"IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN NIÑOS
CON PAPILOMATOSIS RESPIRATORIA RECURRENTE"



TUTOR DE TESIS

DR. ANDREA OROZCO SANCHEZ



ASESOR DE TESIS

DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO



ASESOR DE TESIS

DR. CARLOS DE LA TORRE



TESISTA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS:

Mis más sinceros agradecimientos a Dios por hacer este trabajo posible, de no perder la fe y continuar con mi labor.

*A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional
Agradezco al Dr. Carlos de la Torre y al Dr. José Arellano por sus conocimientos y aportes a ésta investigación.*

A la Dr. Andrea Orozco por su colaboración y consejos desde que comencé este proyecto.

Al colectivo de profesores por ayudarme a crecer como persona y a nivel profesional.

A mis compañeros y amigos de la subespecialidad por acompañarme en todo momento.

Gracias a todas las personas que durante este tiempo me han ayudado a llevar a cabo este trabajo.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	5
II.	ANTECEDENTES	8
III.	MARCO TEÓRICO.....	11
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
V.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	26
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	27
VII.	HIPOTESIS.....	28
VIII.	OBJETIVOS	29
IX.	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	30
X.	RESULTADOS.....	38
XI.	DISCUSIÓN.....	41
XII.	CONCLUSIÓN.....	46
XIII.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	47
XIV.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
XV.	LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.....	57
XVI.	ANEXOS.....	58

INTRODUCCIÓN

La Papilomatosis Respiratoria Recurrente (PRR) es causado por el Virus del Papiloma Humano (VPH) esta enfermedad es caracterizada por una proliferación de múltiples papilomas en el tracto respiratorio con tendencia a la recurrencia. Afecta a los individuos de todas las edades con una variada evolución clínica, dependiendo en la edad que inicien los síntomas, se clasifica en Papilomatosis Respiratoria Recurrente Juvenil (PRRJ) y Papilomatosis Respiratoria Recurrente del Adulto (PRRA)¹.

La PRRJ es el tumor laríngeo benigno más frecuente en la edad pediátrica². Durante las últimas dos décadas, la incidencia y prevalencia se han mantenido relativamente constantes con una variabilidad menor al 0.01%³. Es por esto que la incidencia estimada de Papilomatosis laríngea es 4 por 100,000 en niños y 2 por 100,000 en adultos².

Entre los factores de riesgo para desarrollar PRRJ está la transmisión vertical de madres infectadas que contagian al niño ya sea prenatal o perinatal, parto por vía vaginal, ser primogénito y edad materna⁴. En la mayoría de los niños la manifestación inicial de la enfermedad ocurre entre los dos y cuatro años de edad, siendo los cambios de la voz el síntoma inicial, el crecimiento progresivo de las lesiones da lugar a la obstrucción de la vía respiratoria, provocando disnea y estridor⁴.

El lugar más frecuente afectado es la laringe, específicamente en la porción membranosa y en aproximadamente el 30% de los casos estas lesiones se pueden encontrar en sitios extralaríngeos, en particular la cavidad oral y tráquea. Las lesiones Papilomatosis pueden ser sésiles o pediculadas y con frecuencia parecen racimos exofíticos^{3,5,6}

El VPH es un virus encapsulado de doble cadena de ADN que infecta el epitelio cutáneo y mucoso, es causante de múltiples lesiones desde tumores benignos, como verrugas genitales y lesiones verrucosas en la vía aérea hasta enfermedades malignas como cáncer anogenital⁷.

Hay aproximadamente 8000 pares de bases en el genoma del VPH y están divididos en 3 regiones, 6 regiones tempranas (*Early Region* siglas en inglés, E1, E2, E3, E4, E5 y E6), 2 regiones tardías (*Late*, L1 y L2) y región larga de control (*LCR*). De acuerdo a su asociación con el cáncer, se clasifican en bajo (VPH-6 y VPH-11) o alto riesgo (VPH-16,18). El VPH infecta preferentemente a las células basales mitóticamente activas a través de

microdesarreglos en el epitelio mucoso y cutáneo. El ciclo replicativo viral se sincroniza con el programa de diferenciación epitelial uniéndose a los factores de transcripción celular por medio del LCR en las diferentes capas epiteliales^{8,9}.

Ha sido propuesto que la variabilidad de la severidad de la enfermedad es de acuerdo al subtipo de VPH, esto está relacionado con la edad y la habilidad que tenga el sistema inmune en combatir con los diferentes oncogenes del VPH. Buchinsky¹¹ et al. asociaron intervalos cortos de cirugías en pacientes con el serotipo VPH-11 comparado con el serotipo VPH-6^{10,11}, asociándose también a un alto nivel de E6 y E7 en VPH-11¹². Adicionalmente si el paciente se diagnóstica antes de los 24 meses de edad tendrá mas niveles de E7 independientemente del subtipo viral¹².

Se estima que 1% de la población general tiene presente los subtipos VPH-6 y VPH-11 en el epitelio laríngeo, pero una pequeña fracción de estos llega a exponer y desarrollar lesiones papilomatosas, esto puede ser debido a variación y susceptibilidad del sistema inmune¹³.

La respuesta inmunológica de la laringe juega un papel crítico en la adquisición de la infección por VPH y la formación de papilomas. Su localización en la unión entre el tracto respiratorio y digestivo, hace que la laringe sea un punto para mediar la tolerancia inmunológica y la activación inflamatoria en respuesta a los patógenos que pasen por esta vía¹⁴.

Los pacientes con PRRJ presentan niveles altos de linfocitos T CD4+ que expresan citocinas Th2. El aumento de estas citocinas Th2, suprime la producción de interferón gama (IFN- γ), lo cual evita que se elimine el VPH¹⁵. Las células laríngeas infectadas, sobre expresan el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, por *siglas en ingles*) y eso causa una respuesta proinflamatoria con la formación subsecuente de papilomas. Por esto es evidente que la respuesta inmune del tejido laríngeo y la susceptibilidad del sistema inmune contribuye a la formación de papilomas¹⁶.

El diagnóstico de laboratorio de la infección por VPH depende de técnicas moleculares como la hibridación del ADN o la amplificación de ácido nucleicos. La técnica de amplificación de ácido nucleicos por fluorescencia en tiempo real, demostró ser altamente

sensible, rápida y eficiente. Pero actualmente la más utilizada es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus *siglas en ingles*), esta puede distinguir secuencias estrechamente relacionadas sobre la base de la amplificación seguida de análisis de la temperatura de fusión del ADN y puede utilizarse para detección e identificación de diversos tipos de VPH^{17,18}. El aporte de estas pruebas a la clínica es que con la identificación temprana del subtipo viral se podría determinar el probable pronóstico de la enfermedad ¹⁹.

El pronóstico de la enfermedad puede variar desde cuadros leves a severos. Algunos niños experimentan síntomas menores con remisión y recuperación espontánea al llegar a la pubertad mientras que otros requieren múltiples cirugías durante toda la edad pediátrica²⁰. Aunque la PRRJ es fundamentalmente benigna, una transformación maligna puede ocurrir en menos del 1%²¹.

Actualmente no existe un tratamiento curativo, el manejo está basado en tratamiento sistémicos y resecciones quirúrgica repetitivas con el objetivo de permeabilizar la vía aérea y mejorar la calidad de la voz²². Otras opciones de tratamiento utilizadas son la terapia adjuvante y la vacunación, la cual han demostrado una disminución de los cuadros de severidad y recurrencia²³.

ANTECEDENTES

Dentro de las patologías pediátricas más frecuentes de la vía respiratoria, se encuentra La Papilomatosis Respiratoria Recurrente (PRR) ésta es considerada la tumoración laríngea de características benignas más común la edad pediátrica y la segunda causa de disfonía en la infancia^{23,24}. El Virus del Papiloma Humano (VPH) está establecido con el agente etiológico de la PRR con predilección por de la mucosa de la vía aerodigestiva desarrollando así lesiones con características exofíticas de apariencia verrucosa²⁵. Este virus pertenece a la familia papovaviridae constituida por un grupo de virus ADN epiteliotrópicos con gran afinidad por órganos tubulares en contacto con el exterior tales como fosas nasales, cavidad oral, faringe, laringe, tráquea, bronquios, esófago, vagina, etc²⁶. El VPH está clasificado en dos grupos, los de alto riesgo de malignidad (VPH-16, 18 y 31) y bajo riesgo (VPH-6 y 11), los de bajo riesgo son los que causan lesiones benignas, de estos últimos subtipos, la variante VPH-11 es considera la más agresiva por presentar mayor riesgo de recurrencia y está establecido en que a menor edad de presentación peor evolución clínica^{27,28}.

Esta enfermedad tiene una presentación bimodal, en menores de 12 años también conocida como Papilomatosis Respiratoria Recurrente Juvenil (PRRJ) y la que se presenta en la edad adulta, Papilomatosis Respiratoria Recurrente del Adulto – (PRRA, 20-40 años)²⁹. Clínicamente presenta un curso variado, la manifestación clínica dependerá de la localización y progresión de las lesiones, siendo estas más comunes en la laringe específicamente en la porción membranosa de los pliegues vocales, iniciando con cambios de la voz y posteriormente a medida que van creciendo éstas pueden causar obstrucción de la vía aérea requiriendo de forma inmediata tratamiento quirúrgico³⁰. Aún no se comprende en su totalidad el porque algunas personas se mantienen asintomáticos o con síntomas leves sin la necesidad de múltiples intervenciones mientras que otros son afectados de forma recurrente con múltiples episodios de obstrucción respiratoria y con diseminación de la enfermedad más allá de la laringe dejando secuelas significativas, aunque ya existe postulados que puede deberse a las interacciones del sistema inmunológico^{31,32}. Las prevalencias reportadas son muy variables ya que estas dependen de la edad de presentación, país y nivel socioeconómico³³. En un estudio publicado por Peñaloza-Plascencia et al.³⁴ estima que la incidencia de PRR en la población pediátrica en

México es de 3870 casos por año, en Estados Unidos se estima una incidencia de 80 a 1500 casos por año³⁵. Campisi en Canadá desarrolla una base de datos para PRR juvenil definiendo una incidencia de .24/100,000 habitantes, así como una prevalencia de 1.11/100,000 habitantes³⁶. Derkay y cols describen una incidencia de Papilomatosis subdividida en sus grupos de presentación juvenil y adulta, siendo de 4.3/100,000 y 1.8/100,000 respectivamente³⁷. Se ha encontrado una disminución de la incidencia desde la introducción de la vacunación (Gardasil, Merck), el propósito fue el de prevención del cáncer cérvico uterino y de los resultado más prometedores se presentó en Australia donde la vacuna fue incorporada al programa nacional de vacunación y en 5 años desde su introducción (2007) se observó una reducción de la incidencia de 0.16 a 0.02/100,000 habitantes con solo 15 nuevos casos a nivel nacional en ese período de tiempo, resultados similares son esperados en Estados Unidos y Canadá³⁸. La etiología de la PRR en el niño es generalmente debida a la transmisión del virus durante la gestación o a través de la exposición al virus durante el tránsito del niño por el canal de parto al nacimiento, de acuerdo a un estudio de casos y controles en niños daneses el riesgo de PRR aumenta 231 veces más (OR 231 95% CI, 135.5 – 395.3) cuando la madre tiene condiloma genital durante el parte y esto se duplica cuando el parto demora más de 10 horas³⁹. La causa infecciosa como etiología primaria de las verrugas en niños fue identificada desde el siglo 19 y los principales estudios que usaron la técnica molecular de hibridación fue a finales de la década del 1970 y para la época de 1980 se observó como el VPH era causante de la PRRJ y posteriormente en ese mismo período se identificaron los subtipos de VPH (6, 11) más frecuente en la población pediátrica y en los siguientes años se detectaron nuevos subtipos de VPH(13,39,40 y 56)⁴⁰⁻⁴⁴. Los subtipos VPH-6 y VPH-11 se han encontrado que participan en el 95% de las infecciones de PRR, el otro 5% es de los subtipos VPH 16,31,33,35 y 39, el subtipo VPH-11 está asociado a mayor riesgo de severidad, presentación a temprana edad, múltiples intervenciones quirúrgicas y peor calidad de vida⁴⁵. Se ha demostrado la presencia de múltiples infecciones de VPH, en el estudio publicado por Azzimonti et al⁴⁶ de dos a tres tipos de VPH en el 60% de 28 lesiones VPH positivas. Nicollas et al⁴⁷ reportó un caso de PRR en una paciente de 11 años edad con que también presento coinfección con VPH-6 y VPH-16. El riesgo de malignidad en la población pediátrica es raro, Derkay reportó 13 casos de transformación maligna en un total de 1193 pacientes (<1%), este porcentaje aumenta en la población adulta^{6,48}. Actualmente no existe un tratamiento curativo, el manejo esta basado en tratamiento sistémico y múltiples resecciones de las lesiones con el objetivo de permeabilizar la vía aérea⁴⁹. La cirugía es la

opción terapéutica más empleada hoy en día y de estas existen diversas técnicas quirúrgicas para el mejor manejo de las lesiones y evitar su propagación en tejido sano, así como para la prevención de complicaciones que puedan alterar los principios viscoelásticos de los pliegues vocales generando como efecto adverso empeoramiento de disfonía, sinequias glóticas, etcétera ^{2,50}. Otras de las opciones terapéuticas empleadas es la administración del tratamiento adyuvante siendo este utilizada debido a la naturaleza de la enfermedad por su alta recurrencia. Alrededor de un 20% de los pacientes con PRR serán candidatos a uso de terapias adyuvantes. Las indicaciones para esta terapia han sido establecidas cuando existen más de 4 cirugías al año, crecimiento acelerado de las lesiones que causen compromiso ventilatorio, sitios extralaríngeos de diseminación de las lesiones. A pesar de la utilización en conjunto de estas terapias no se ha logrado erradicar esta enfermedad⁵⁰.

MARCO TEÓRICO

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano (VPH), se clasifica dentro de la familia *Papillomaviridae*. Medicamente el VPH se ha clasificado en dos tipos de acuerdo con su función⁵¹:

A) El tipo de tejido que infecta, se ha clasificado en dos grandes grupos: I) los que infectan a la piel y II) Aquellos que infectan a las mucosas, los cuales pueden infectar principalmente al tracto genital y ocasionalmente al tracto respiratorio, a la cavidad oral o a la conjuntiva⁵¹.

B) Su capacidad para transformar a la célula infectada, VPH de bajo riesgo, cuando presentan la capacidad de inducir únicamente una neoplasia leve (NIC I); y VPH de alto riesgo, que puede provocar, además, una neoplasia de moderada a severa y promover el desarrollo de cáncer cervical invasivo⁵¹.

Más de 100 genotipos de VPH han sido identificados. Debido a que resulta difícil para crecer *in vitro*, la mayoría de estos virus fueron identificados por clonación directa de su ADN en plásmidos bacterianos, seguido por análisis de secuencia de nucleótidos. Se consideran diferentes genotipos de VPH si las secuencias nucleotídicas de regiones específicas del ADN viral (genes L1, E6, y E7) difieren en más de 10%⁵².

En la Tabla 1 se muestran los genotipos virales más comunes asociados a distintos tipos de lesiones.

Tabla 1. Lesiones causadas por los diferentes tipos de virus de papiloma humano⁵¹.

Grupo	Tipo de lesión	Sitio de infección	Genoipos de VPH
Lesiones predominantemente malignas			
Cutáneo de bajo riesgo	Verrugas comunes	Piel, en varios sitios	2, 4
	Verrugas plantares y palmares	Manos y pies	1, 2, 3
	Verrugas “de los carniceros”	Manos	7
	Verrugas planas	Piel, en varios sitios	3
Mucosa de bajo riesgo	Verrugas de los genitales “condilomas acuminados”	Cuello uterino, varios sitios	6, 11
	Papiloma Laringeo Juvenil	Laringe	6, 11
Cutáneo	Verrugas planas	Piel	10
	Epidermodisplasia verruciforme	Piel, en varios sitios	Muchos genotipos, tales como 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19-29
Lesiones malignas o con potencial maligno			
Mucosa alto riesgo	Papulosis Bowenoide	Vulva, pene, ano	16
	Lesiones intraepiteliales premalignas y malignas	Cuello uterino, pene, ano	Muchos genotipos, tales como 16, 18, 31, 39-45, 51-56
	Papiloma/ carcinoma	Laringe	16

Característica

Los viriones del VPH son icosaédricos, no presentan envoltura y miden 55 nm de diámetro. La cápside está constituida por 72 capsómeros (60 hexaméricos + 12 pentaméricos) de la proteína L1 que es la más abundante. No contiene lípidos ni carbohidratos. Dentro de la cápside se encuentra el material genético, el cual es ADN de doble cadena circularizado⁵³.

El tamaño del genoma de VPH oscila entre 6800 y 8400 pares de bases (pb) El ADN constituye aproximadamente el 10-13% del virión en peso. El contenido G+C es 40-60%. y se encuentra asociado con las histonas H2a, H2b, H3 y H4 del hospedero ⁵⁴.

Genoma y proteínas virales

Contiene ocho marcos de lectura abiertos (ORF's), divididos en tres regiones . La región reguladora (LCR), cuya función es regular la transcripción de los genes E6 y E7. La región temprana (E), que contiene seis ORF's (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), que codifican para proteínas no estructurales relacionadas en la replicación y oncogénesis, y la región tardía (L) que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral ⁵⁵ .

Se sabe que los mRNAs del virus del papiloma son transcritos a partir de sólo una de las cadenas de ADN. Varias regiones codificantes de proteínas se superponen, lo que permite el uso eficiente de un genoma pequeño⁵⁴. Una breve descripción de la función de cada gen viral se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Función de las proteínas del virus de papiloma humano ⁵¹

Gen		Función
No estructurales	E1	Gen más conservado entre los diferentes VPH, codifica para una fosfoproteína de 86 kDa. Presenta actividad de helicasa y ATPasa. Es esencial para la replicación y transcripción.
	E2	Codifica para una proteína de 50 kDa. Esencial en la replicación y la transcripción.
	E4	Se expresa abundantemente en los estratos espinoso y granuloso en una infección productiva. Permite el ensamblaje y la liberación de los viriones, así como la regulación de la expresión genética
	E5	Codifica para una proteína hidrofóbica de 10 kDa. Es la principal proteína transformante de los oncogenes virales E6 y E7 y evade el sistema inmune.
	E6	Codifica para una proteína de 150 aminoácidos. Se une y degrada a la proteína supresora de tumor p53 evitando así la apoptosis.
	E7	Codifica para una proteína de 21kDa. Induce a la célula a proliferar y logra esto interactuando con el antioncogén celular retinoblastoma (RB),
Estructurales	L1	Gen altamente conservado entre los distintos VPH. Representa más del 90% de las proteínas de la cápside. Es el receptor que interactúa con la célula hospedera.
	L2	Gen relativamente conservado, componente menor de la cápside.

Célula blanco y tropismo viral

Los VPH infectan a las células del estrato basal de un epitelio simple y estratificado, lo que le permite infectar a cualquier órgano que contenga dicho tipo de epitelio, es decir, puede infectar piel, mucosa oral, laringe, tráquea, mucosa nasal, senos paranasales, mucosa bronquial y mucosa esofágica. El VPH infecta a las células del estrato basal, porque, además de presentar al receptor específico, también poseen la capacidad de diferenciarse, ya que el ciclo viral depende completamente de la maquinaria celular de síntesis de ADN y del proceso de diferenciación celular para expresar sus genes tardíos. La célula blanco de VPH se localiza en la capa más profunda del epitelio estratificado, por lo tanto, el virus no puede infectar a un epitelio estratificado, a menos que esté presente microlesiones que

expongan al estrato basal o que presente una zona de transición (ZT), que es un epitelio inmaduro estratificado en transición a un epitelio simple⁵¹.

El fuerte tropismo de VPH es el resultado de varios factores: 1) infecta únicamente a células epiteliales que tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse; 2) estas células deben presentar el receptor y correceptor celular específicos y 3) los mecanismos de regulación transcripcional principalmente⁵¹.

Ciclo replicativo

Unión, penetración y desnudamiento. La unión de los viriones a la superficie celular esta mediada por la proteína L1 que interactúa con el receptor primario heparan sulfato y posteriormente con los correceptores sindecano 3, integrinas $\alpha 6/\beta 1$ o $\alpha 6/\beta 4$ cuya expresión se da únicamente en el estrato basal del epitelio. Una vez que el virus interactúa con su receptor, se inicia el proceso de endocitosis y se lleva a cabo el transporte del ADN viral al núcleo, los mecanismos aún se desconocen⁵³.

Transcripción. Cuando el genoma viral llega al núcleo celular los primeros genes en expresarse son E1 y E2, posteriormente se expresa E6 y E7. El genoma viral se establece como un plásmido a bajo número de copias, se amplifica inicialmente a una concentración de 50 a 100 copias por célula. Esta concentración de episomas de ADN viral se mantiene por una replicación limitada (replicación de mantenimiento). A medida que las células se mueven hacia las capas externas de la epidermis y se diferencian, tiene lugar la replicación productiva del genoma viral a miles de copias por célula⁵⁶.

A medida que las células infectadas se dividen, el ADN viral se distribuye entre ambas células hijas. Una de las células hija migra lejos de la capa basal e inicia un programa de diferenciación. La otra célula hija continúa dividiéndose en la capa basal y proporciona un depósito de ADN viral para otras divisiones celulares. Dado que la producción de VPH está restringida a células suprabasales, las células de la capa basal no son lisadas por la producción de viriones, pero continúan proliferando⁵⁷.

En la capa suprabasal se expresan los genes E1, E2, E5, E6 y E7 que inducen la proliferación celular, para aumentar la producción viral. En las células más diferenciadas se

expresa E1 y E2, además inicia la expresión de E4 y E5 que participan en la liberación del virión, mientras que inicia la transcripción de los genes de la cápside L1 y L2, para el ensamblaje y liberación de los viriones. En el estrato granuloso se presentan células vacuoladas o “koilocitos” que expresan abundantemente la proteína E1 y E2 ⁵³.

Ensamblaje y liberación. En los koilocitos se lleva a cabo el ensamblaje de los viriones y cuando las células llegan al estrato córneo, por descamación se desprenden y se liberan los viriones (Figura 6)⁵¹.

Patología viral

La infección latente se da después de la inoculación. El virus está presente en las células, pero no manifiesta signo citopático. El genoma viral se replica solo cuando la célula basal infectada se divide y lo hace en forma autónoma, siendo distribuido en forma homogénea en las células hijas y manteniendo un bajo número de copias. En la infección productiva el virus comienza a replicarse en forma independiente de la división celular y produce un alto número de copias mediante la expresión de los genes tempranos en la capa basal del epitelio. El ensamblado de los genomas y las cápsides da lugar a los viriones, por lo que esta forma de infección resulta altamente transmisible. La infección productiva se manifiesta morfológicamente con la aparición de los signos citopáticos característicos de VPH: koilocitos (células vacuoladas), hiperplasia, acantosis y disqueratosis; y clínicamente con el desarrollo de las lesiones proliferativas ⁵⁸.

Respuesta inmune

La respuesta inmune se inicia en promedio 3 meses después de haber comenzado una infección productiva, aunque puede ser mucho más rápida o nunca ocurrir (Tabla 5). En los casos de lesiones persistentes, las células dendríticas están disminuidas y la actividad de las células NK, CD4, macrófagos y neutrófilos está afectada. La producción disminuida de interferón gamma e Interleucina 2 ha sido detectada en condilomas persistentes. La respuesta inmune normal ocurre en forma natural en el 20-30% de las personas infectadas, conduciendo a la eliminación de la lesión. Aproximadamente un 20% de las lesiones no generan una respuesta inmune y se hacen refractarias a los tratamientos convencionales.

Los agentes inmunomodulares pueden ayudar a estimular y los tratamientos de resección pueden reducir el volumen de la lesión ⁵⁸.

Tabla 3. Algunas razones por las que el Virus de Papiloma Humano es un débil inmunógeno⁵¹.

- VPH es un virus de ADN de doble cadena que no presenta ningún intermediario de RNA de doble cadena, evitando así desencadenar una respuesta inmune innata.
- VPH no codifica para ninguna proteína secretada y consecuentemente no es presentado por células infectadas
- Las proteínas virales no estructurales se expresan en bajos niveles, comparadas con proteínas más inmunogénicas de otros virus.
- VPH únicamente infecta a células epiteliales.
- Durante la infección VPH induce la proliferación celular y no lisis celular, evitando generar señales de daño celular y liberación de antígenos para no desencadenar una respuesta inmune innata.
- La infección con VPH no presenta una fase de viremia.

Papilomatosis Respiratoria Recurrente (PRR)

La Papilomatosis Respiratoria Recurrente (PRR) es una enfermedad causada por el Virus del Papiloma Humano (VPH). Se caracteriza por una proliferación de múltiples papilomas en el tracto respiratorio con tendencia a la recurrencia comprometiendo a los individuos de todas las edades con una variada evolución clínica. La PRR se clasifica en Papilomatosis Respiratoria Recurrente Juvenil (PRRJ) y Papilomatosis Respiratoria Recurrente del Adulto (PRRA) dependiendo la edad en que inicien los síntomas¹.

Factores de Riesgo

El VPH puede ser adquirido por vías no sexuales, y una de ellas es la transmisión de madre a hijo durante el período perinatal. Esta transmisión vertical de VPH, presumiblemente, se puede producir cuando el feto pasa a través del canal de nacimiento infectado o por la infección ascendente, especialmente después de la ruptura prematura de las membranas amnióticas⁵⁹.

Se ha demostrado la presencia de VPH en el líquido amniótico, en las membranas fetales, en los aspirados nasofaríngeos de nacidos por cesárea y en la sangre del cordón lo que sugiere que la contaminación de VPH ocurre antes del nacimiento (intrauterina) por vía transplacentaria. Las implicaciones de estas observaciones todavía no se han establecido claramente. La no concordancia de VPH tipo específico entre la madre y el recién nacido parece sugerir la existencia de otras vías de transmisión, como por fómites (instrumentos contaminados), el contacto entre el niño y las personas (interfamiliares, amigos)⁵⁹.

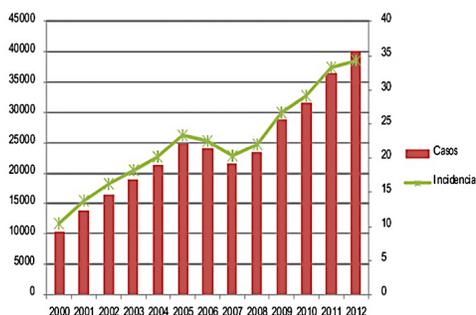
El modo del parto, el orden de nacimiento y la presencia o estatus del VPH genital están asociados a la transmisión VPH. Existen reportes entre la asociación del condiloma genital activo durante el canal de parto y las primíparas en el desarrollo de PRRJ^{10,11}. De acuerdo a un estudio Danés de casos y controles de 3033 nacimientos, el riesgo de desarrollar PRRJ es 231 veces más probable si hay presencia de condilomas durante el canal de parto y este riesgo se dobla si el parto demora más de 10 horas^{60,61}. No está claro si la cesárea sería un factor protector, pero lo demostró Wiatrak et al⁶² y Silverberget al^{63 (13)} es que ambos notificaron que el parto por cesárea presentaba una evolución clínica más severa en los pacientes con PRRJ.

Existe relación entre el número igual o mayor a tres parejas sexuales como factor de riesgo para desarrollar VPH laríngeo⁶⁴. El estatus socioeconómico como factor de riesgo para el desarrollo de la PRR-J no ha demostrado, hasta los estudios recientes, una correlación con la severidad de la enfermedad⁶⁵.

EPIDEMIOLOGÍA

Numerosos estudios han realizado para dilucidar la verdadera incidencia de PRR. La incidencia varía de acuerdo a los factores de riesgo como la edad de presentación y localización geográfica³³. Se estima que alrededor de 20 millones de personas en el mundo están infectadas con VPH. Para conocer la epidemiología del VPH en México se realizó un estudio estadístico de 13 años, (2000 -2012); la información se obtuvo del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) en donde se observa un incremento (Figura 1). En el 2000 la incidencia fue de 10.44 (10 393 casos) mientras que para el 2012 el número de casos es de (40 106) con una incidencia de 34.31 por cada 100 000 habitantes⁶⁶. La prevalencia por VPH mostró un ascenso del 26% en el periodo 2000-2012.⁶⁶

La incidencia de la PRR en niños se estima que es de 4.3 por cada 100 000 personas⁶⁷. Se ha estimado que en los Estados Unidos ocurren 80 y 1500 casos nuevos de PRRJ de inicio en la niñez cada año, aunque la introducción de la vacuna contra el VPH parece ser drásticamente disminuyendo el número de casos nuevos en los Estados Unidos y en el extranjero^{68,69,70}.



FUENTE: SINAVE/DGE/ISSA.
Tasa por 100 000 habitantes

Comportamiento del Virus del Papiloma Humano en el periodo 2000-2012, Población General, México .⁶⁶

Patogenesis de la Papilomatosis Respiratoria Recurrente

El Virus del papiloma humano inicialmente infecta a las células basales de la capa epitelial de la región mucosa o cutánea por medio de una mínima excoriación. Subsecuentemente esta infección activa el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, EGF, siglas en inglés) y desactiva varias proteínas supresoras tumorales, culminando en proliferación celular y diferenciación epitelial. Este mecanismo resulta en lesiones exofíticas de apariencia de “hojas de coliflor”. Estas lesiones ocurren con mayor frecuencia en zonas de transición entre el epitelio escamosos y epitelio columna-ciliar^{71,72}. Los papilomas aparecen como nódulos individuales o múltiples. Los nódulos aparecen como lesiones exofíticas, sésiles o lesiones pedunculadas, generalmente limitada a la laringe, pero con bastante frecuencia afecta a las cuerdas vocales, bandas ventriculares, subglotis y cara laríngea de la epiglotis⁷¹. Sin embargo, pueden producirse en cualquier parte de la vía aerodigestiva y extenderse al árbol traqueobronquial y parénquima pulmonar⁷².

El compromiso de la vía aérea distal ocurre en solo 2-5% de los pacientes con papilomatosis laríngea y el parénquima pulmonar se ve afectado en aproximadamente el 1% de los casos^{73,74}. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la extensión distal de la papilomatosis laríngea, como la extensión de papilomas por contigüidad, contaminación viral difusa y factores iatrogénicos, como por laringoscopia, broncoscopia y traqueostomía^{73,74}. Los factores de alto riesgo para la propagación de RRP hacia el tracto respiratorio inferior incluyen infección por VPH-11, edad <3 años, traqueostomía realizada para evitar la obstrucción de las vías respiratorias y procedimientos invasivos⁷².

Aunque ocurre raramente, la PRR tiene el potencial de ser maligna, principalmente a carcinoma broncogénico de células escamosas^{71,72,75}. Esto puede ocurrir décadas después del inicio de la enfermedad, generalmente en pacientes con diseminación previa al árbol traqueobronquial⁷³. Además, la transformación maligna rara vez ocurre en la laringe sin afectación de la vía aérea distal⁷³. Las tasas de transformación maligna son <1% en niños

y 3-7% en adultos ⁷². Los factores de riesgo incluyen infección con alto riesgo son el subtipo de VPH (16 y 18), tabaquismo, radioterapia previa, tóxicos como el consumo de drogas y mutación del gen p53 ^{72,75}. Los subtipos 6 y 11 de VPH considerados ser de bajo riesgo, en especial el subtipo 11 ha llegado a demostrar también el potencial de degeneración maligna ⁴⁸. La patogenia precisa de la transformación maligna sigue siendo incierta. Sin embargo, el poder oncogénico del VPH se ha atribuido a interferencia en el ciclo celular, que altera el control de la diferenciación ^{71,72,75,76}.

Cuadro Clínico

La edad de aparición de los primeros síntomas es muy variable, los pacientes generalmente se presentan entre las edades de 2 y 6 años, con una distribución por sexos aproximadamente igual, y algunos pacientes presentan recaídas en la adolescencia⁷⁷. Los pacientes que se presentan a menor edad son aquellos relacionados con el subtipo VPH-11 comparado con aquellos que tienen la enfermedad por VPH-6⁷⁷.

La presentación inicial de los síntomas es disfonía progresiva, seguida de estridor y dificultad respiratoria, suele también aparecer otros síntomas inespecíficos de las vías respiratorias, tales como tos crónica, ronquera, sibilancias, cambios de voz, hemoptisis y disnea crónica^{71,73}. En los niños, el perfil clínico característico es la tríada de ronquera progresiva, estridor y dificultad respiratoria⁷³.

Algunos pacientes presentan una remisión espontánea, pero esto se produce en una minoría de los casos. En la mayoría de los casos es agresivo, requiriendo múltiples tratamientos quirúrgicos y tratamiento adyuvante^{71,79}. Debido a la inespecificidad de los escenarios clínicos, la enfermedad puede imitar patologías laríngeas y respiratorias comunes tales como laringitis, asma, bronquitis, croup, por lo que es común mal diagnosticar esa enfermedad especialmente en los niños y pudiendo retrasar el diagnóstico de 1 a 8 años desde el inicio de los síntomas^{80,71}.

La laringe es el sitio más común de afectación, las primeras lesiones suelen aparecer sobre el piso de los ventrículos o en las cuerdas vocales, bandas ventriculares y cara laringea de epiglotis⁸⁰. Otros sitios extralaringeos que pueden estar afectados incluyen la orofaringe, nasofaringe, nariz, cavidad oral y pulmón, siendo la tráquea el sitio extralaringeo más

común⁸⁰. Esta diseminación periférica puede provocar neumonía recurrente, atelectasia obstructiva y degeneración maligna, con síntomas que incluyen fiebre, tos, hemoptisis y disnea progresiva⁸¹.

Cuando el paciente se presenta con dificultad respiratoria causada por obstrucción de vía aérea causada por los papilomas a menudo se debe realizar una traqueostomía. Shapiro et al⁸² señalaron que estos pacientes tienden a ser más jóvenes y tener una enfermedad más agresiva. Se ha documentado que la traqueotomía puede contribuir a la propagación de enfermedades en las vías respiratorias inferiores y que mas de la mitad de los pacientes con pacientes desarrollar papilomatosis traqueal^{83,84}.

Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante la observación directa de los papilomas, ya sea mediante nasofibrolaringoscopia o laringoscopia directa. Con este estudio se puede determinar, la localización, extensión de las lesiones. Una vez identificadas las lesiones se plantea la toma de biopsia para el estudio histopatológico el cual aportara a la confirmación diagnóstica y tipificación del VPH⁸⁵.

Macroscópicamente los papilomas se observan como lesiones exofíticas, masas pedunculadas que pueden ser únicas o múltiples. Histológicamente los papilomas aparecen como proyecciones de epitelio escamoso estratificado queratinizado, que cubre un núcleo fibrovascular. Con frecuencia está ausente la maduración epitelial normal de los tejidos epiteliales y se ve una zona basal hiperplásica. También suelen encontrarse disqueratosis o paraqueratosis, así como los coilocitos, que aparecen como células vacuoladas con un citoplasma claro que indican papilomatosis⁸⁶.

Existen también las técnicas de moleculares esas se usan para la detección y tipificación de VPH, tales como reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o la hibridación in situ (HIS) estas pruebas son herramientas de gran potencial diagnóstico y pronóstico. También se recurre a ellas para determinar la presencia de virus en las lesiones premalignas o malignas ya tratadas, lo cual constituye un factor de riesgo de recurrencia⁸⁶.

La hibridación in situ (HIS) es una técnica de amplificación que utiliza sondas de ADN marcadas, complementarias a unas secuencias determinadas del ADN viral. La HIS ha sido optimizada para poder llevar a cabo con material parafinado, en tanto que la PCR cuenta con mayor eficacia al utilizarla sobre tejido fresco⁸⁶.

La detección del genotipo viral por reacción en cadena de la polimerasa(PCR), Con este metodo se logra la amplificación de un fragmento específico de ADN a la multiplificación exponencial del mismo. Empleando cebadores genéticos específicos de los genotipos virales 6, 11, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 66, y el cebador de albumina que se encuentra en todos los individuos independientemente de la presencia o no de genotipos de VPH. por lo que constituye un control interno de la reacción. Es posible detectar mediante esta manera un amplio espectro de VPH que habitualmente afectan el trato aerodigestivo. El producto de esta amplificación puede verse como múltiples bandas en un gel de Agarosa⁸⁶.

Tratamiento

En cuanto se establece el diagnóstico hay que hacer saber a los pacientes y sus familias que no existe actualmente ningún tratamiento curativo de la papilomatosis laríngea, que las recidivas son practicamente constantes tras la excéresis de las lesiones y que la evolución de la enfermedad es muy variable⁸⁷.

La cirugía sigue siendo el pilar del tratamiento y el objetivo principal de esta es asegurar el funcionamiento de la vía aérea , mantener la calidad defonación y preservarlas las estructuras adyacentes⁸⁸. En formas leves debe preferirse un tratamiento lo menos enérgico posible, para limitar los efectossecundarios y sus secuelas⁸⁷ . En las formas graves la frecuencia de las cirugías es muy alta, incluso si la extensión y volumen de las lesiones son grande habrá que recurrir a traqueostomía⁸⁷.

La reducción del volumen de los papilomas se puede realizar con técnica frías con el uso de pinzas de copa, así como también el uso de diferentes tipos de laser (CO₂, KTP, PDL) y microdebridador, la técnica empleada depende de la preferencia del cirujano y el equipo/instrumento disponible⁴⁹. En países en vía de desarrollo la técnica fría puede ser que sea la única herramienta disponible⁸⁹.

El laser CO₂ tiene la particularidad de que selectivamente por disparos muy precisos llega a vaporizar las lesiones sin afectar a los tejidos sanos. El microdebridador laríngeo es una alternativa al uso de laser, este equipo incorpora un dispositivo de succión que aspira los papilomas y los desintegra, haciendo más fácil la remoción de estos últimos. Este tiene la ventaja que conserva más los tejidos adyacentes, mejor preservación de la calidad de la voz, menor costo y es útil en pacientes que requieren múltiples cirugías^{87,88,90}.

A pesar de la adopción de nuevas técnicas y equipos quirúrgicos cada vez más modernos, complicaciones quirúrgicas graves, como sinequias de la laringe y estenosis glótica, todavía ocurren, particularmente en pacientes que se someten a múltiples procedimientos⁸⁸. Recurrencia de la lesión después de procedimientos quirúrgicos es parte de la evolución de la enfermedad y se cree que el genoma viral persiste en los tejidos resecaados⁷¹.

Se han intentado todo tipo de tratamientos con fines curativos, entre estos esta el tratamiento con coadyuvantes (Bevacizumab, Cidofovir) han mostrado resultados prometedores en cuanto a mejoría de control de la papilomatosis, si bien ninguna puede erradicar el genoma del VPH de los tejidos de mucosa⁸⁶. Aproximadamente el 20% de los pacientes con PRR requerirán tratamiento con coadyuvantes⁷¹. Los criterios más ampliamente adoptados para iniciar la terapia adyuvante son la necesidad de 4 procedimientos quirúrgicos por año, rebrote rápido de la enfermedad , con compromiso de las vías respiratorias o multiples diseminaciones distales de las lesiones papilomatosas³⁷.

El Cidofovir es un análogo de la citosina que bloquea la replicación del ADN viral inhibiendo el ADN polimerasa viral. Puede administrarse por vía intravenosa, a través de nebulizaciones o por inyección intralesional. En estudios prospectivos, La administración adyuvante de cidofovir intralesional ha dado lugar a la a la regresión total de las lesiones y la reducción de la frecuencia de procedimientos quirúrgicos otros han demotrasdo una efectividad de un 50% en la remisión de la enfermedad^{88,91,92}. La administración intralesional tiene la ventaja de mantener los niveles plasmáticos por debajo del nivel de toxicidad con la gran ventaja de no provocar efectos secundarios locales^{88,92}.

El bevacizumab es un anticupero monoclonal humanizado recombinante que bloquea la angiogénesis al unirse e inhibir la actividad biológica del factor de crecimiento del endotelio

vascular⁹³. La inyección intralesional ha demostrado prolongar los intervalos quirúrgicos mientras que la administración sistémica demostró beneficios en los casos con mayor agresividad y compromiso pulmonar^{93,94}.

La vacunación es prometedora para la reducción de la incidencia de PRR, las vacunas disponibles son la vacuna bivalente (Cervarix®), vacuna cuatrivalente (Gardasil®) y vacuna novalente (Gardasil® 9), estas últimas dos (Gardasil® y Gardasil® 9) protegen contra el VPH-6 y VPH-11³⁸. Dado la mayor incidencia de PRRJ en los países en vía de desarrollo, la introducción de estas vacunas probablemente tendría un mayor impacto en la incidencia, como lo observado en Australia, donde se observó una disminución significativa en la incidencia de PRRJ después de introducir la vacuna cuatrivalente al programa de vacunación nacional⁷⁰.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La papilomatosis respiratoria recurrente (PRR) se considera la neoplasia laríngea benigna más frecuente en la edad pediátrica, el curso de esta enfermedad es muy variable presentado cuadros clínicos desde leves a severos. La Infección por el Virus del Papiloma Humano es en la actualidad un problema de salud pública, si bien no resulta letal a corto plazo trae como consecuencias lesiones de por vida.

Los estudios locales de la secretaria de salud en México plantean el crecimiento que ha tenido esta enfermedad en los últimos años⁶⁶. Debido a la naturaleza de la enfermedad, los pacientes afectados están expuestos a pasar por recurrencias y múltiples procedimientos quirúrgicos, esto no solo afecta la calidad de vida del paciente, sino que también tiene un impacto económico en la familia y el sistema de salud. El Hospital Infantil de México Federico Gómez aun no dispone de bases estadísticas sobre la tipificación de la PRR por lo que con este trabajo plantea identificar y determinar el genotipo viral para así relacionarlo con la evolución de la enfermedad. La importancia de este estudio es que sirva de base comparativa para el manejo óptimo y educativo sobre el virus, de esta manera se ofrece una sustentación científica para la toma de decisiones.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el subtipo predominante de Virus de Papiloma Humano asociado a Papilomatosis Respiratoria Recurrente en el Hospital Infantil de México Federico Gómez en el periodo 2010-2016?

JUSTIFICACIÓN

El Hospital Infantil de México es de los principales centros pediátrico que se destaca por el alto volumen de pacientes y el tratamiento de patologías con evoluciones complejas como la papilomatosis respiratoria recurrente. Al servicio de Otorrinolaringología de dicho hospital se tratan los pacientes todo la República Mexicana y a pesar de lo raro que puede ser esta patología en otros centros hospitalarios, cada año acuden varios pacientes con esta enfermedad. Las consecuencias de la PRR radican en su alta recurrencia y las secuelas respiratorias que esta podría dejar tales como la obstrucción de la vía aérea la que pondría en peligro la vida de estos pacientes y arriesgar más su condición de vida. El conocimiento de los genotipos asociados a la PRR y las variables que influyen en esta patología como la edad de inicio de cada paciente podría ayudar a diferenciar entre la efectividad real de las modalidades del tratamiento y el curso natural, como a predecir mejor el curso clínico de la enfermedad. Es por lo anterior que es útil investigar acerca de los genotipos de VPH que se asocian a dicha patología en la población del HIM, existe escasa evidencia científica en los artículos mexicanos sobre el subtipo viral , por lo que es necesario mas estudios acerca del tema

HIPOTESIS

Los subtipos más frecuentemente encontrados serán el 6 y el 11, pero no se descartar la participación de subtipos de alto riesgo en los niños diagnosticados con papilomatosis respiratoria recurrente en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar y tipificar el Virus del Papiloma Humano (VPH) en niños con Papilomatosis Respiratoria Recurrene

Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia de subtipos de VPH
2. Analizar bioinformaticamente las variabilidades esperadas para un ensayo RFLP.
3. Describir extracción de ADN de tejidos incluidos en parafina.
4. Optimizar la PCR de punto final para la detección de VPH.
5. Optimizar las condiciones de restricción de la ampliación con la enzima RsaI.
6. Correlacionar los resultados obtenidos con los datos clínicos básicos

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, transversal y descriptivo con el objetivo de determinar la identificación y tipificación del VPH en pacientes con papilomatosis respiratoria recurrente.

Universo de trabajo

Material biológico

Se contó con 11 muestras de tejido incluido en parafina de pacientes de 1 a 9 años recolectadas del 2010 al 2016 del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico previo de papilomatosis mediante análisis histopatológico del tejido o diagnóstico clínico

Criterios de exclusión

Pacientes que no tengan diagnóstico previo de papilomatosis por histopatología .

Criterios de eliminación

Muestras insuficientes.

Diagrama general de trabajo

Aquí se muestra el diagrama general de trabajo que se siguió.



Recolección de muestras.

Se obtuvieron 11 muestras del departamento de patología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” con diagnóstico histopatológico de papilomatosis. Se proporcionaron los tejidos en el cubo de parafina los que se procedieron a cortar para obtener el tejido necesario para hacer la desparafinación y extracción.

A partir del número de expediente de los pacientes se realizó un análisis de la historia clínica.

Análisis bioinformático de las variabilidades genéticas del producto amplificado y análisis de los cortes con la enzima de restricción RsaI de los genotipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 39.

De la base de datos del *Gen Bank* se obtuvieron los genomas completos de los genotipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 39, se realizaron las alineaciones mediante el programa *CLUSTAL OMEGA* del Instituto Europeo de Bioinformática. Donde se analizaron las variabilidades del producto amplificado por los iniciadores CP para VPH, que amplifican un fragmento del gen E1 (Tabla 1, ANEXO 1).

Para obtener el patrón de restricción del producto amplificado se usó el programa *NEBcutter V2.0* de *New England BioLabs*, donde se obtuvo el patrón de corte para cada genotipo.(Tabla1, ANEXO 1)

Optimización de la desparafinación y la extracción de ADN a partir de tejidos incluidos en parafina.

Las muestras de tejido se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, se añadió 1 mL de xilol absoluto se homogenizó por inversión y se centrifugó a 8000 x g por 1 min. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de etanol absoluto, se agitó por inversión y se

centrifugó a 10000 x *g* por 1 min. Se repitieron estos pasos hasta que ya no se observaron residuos de parafina.

La rehidratación del tejido se llevó a cabo mediante un gradiente de etanol 70 y 30%, y agua inyectable estéril. Se adicionaron 500 µL de etanol al 70%, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 10 000 x *g* por 1 min, se retiró el sobrenadante y se adicionó alcohol a la siguiente concentración. Se realiza esto con todas las concentraciones de etanol y al final se realizarán varios lavados con agua destilada estéril para rehidratar por completo el tejido.

Una vez hidratado el tejido se adicionaron 200 µL de regulador de lisis ATL (QIAGEN, EUA) y 200 µL de proteinasa K (AMRESCO, 20 mg/mL, EUA), se dejó en agitador térmico (LABNET, Vortemp 56, EUA) a 90 rpm, 56 °C por 24 h.

Una vez digerido el tejido, la extracción de ADN se llevó a cabo por el método de Boom⁹⁶, donde se adicionan 50 µL de regulador AT (QIAGEN, EUA) y 100 µL de etanol absoluto y se incubó a 56°C por 10 min, posteriormente se adicionan 100 µL de silica y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente homogenizando continuamente. Pasado el tiempo se centrifugó 2 min a 8000 x *g* y se eliminó el sobrenadante, posteriormente se adicionaron 500 µL del regulador Aw1 (QIAGEN, EUA) se homogenizó y centrifugó a las condiciones ya mencionadas. Se decantó y adicionó 500 µL de regulador Aw2 (QIAGEN, EUA) y se repitió el mismo procedimiento. Posteriormente se realizaron dos lavados con 500 µL de etanol absoluto, una vez realizado esto se adicionan 1000 µL de acetona absoluta, se centrifugó y decantó, para secar la silica se colocó en un agitador térmico a 70 °C los tubos destapados y revisó continuamente hasta que la silica se observó seca. Una vez que la silica estuvo totalmente seca, se adicionaron 200 µL de regulador AE (QIAGEN, EUA), se centrifugó y recuperó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento, pero con regulador AE calentado previamente a 70°C. El sobrenadante recuperado se puso a secar.

Para confirmar la extracción de ADN, se realizó una PCR para gen constitutivo humano para el gen β-globina de 268 pb (Tablas 2 y 3, ANEXO 2 Y 3).

Desparafinación y extracción de ADN de los tejidos

Los tejidos se desparafinaron de acuerdo con el método estandarizado de Karlsen⁹⁵ y se extrajo el ADN por el método de Boom⁹⁶. Se corroboró la extracción de ADN por PCR de punto final para un gen constitutivo humano.

Optimización de PCR de punto final para la detección de VPH

Para obtener el control positivo para la PCR, se propagaron células HeLa en medio MEM al 5%, en una atmósfera de CO₂ del 5%. Una vez llegando a la confluencia se cosecharon las células y se extrajo ADN por el método de Boom⁹⁶. Se probaron las condiciones descritas en el trabajo de Karlsen⁹⁵ (Tabla 4, ANEXO 4) y dependiendo de las bandas obtenidas se modificaron las condiciones.

Detección de la infección por VPH por PCR-RFLP

Con las condiciones ya estandarizadas se realizó la PCR de punto final con las muestras para la identificación molecular de VPH, se corrieron 10 µL del producto de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para observar las muestras positivas.

Una vez obtenidas las muestras positivas a VPH, el restante del producto de PCR se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 1% por una hora para su purificación. Una vez lograda la separación del fragmento se cortó la banda del gel y el fragmento se digirió con yoduro de sodio para su posterior purificación por el método de Boom.

Una vez obtenida la banda se realizó la restricción con la enzima RsaI (Promega, EUA) utilizando las siguientes condiciones: 10 µL del purificado, 10 U de enzima y regulador a 1X llegando a un volumen final de 15 µL, la mezcla de reacción se incuó a 37°C por 24 h. Para observar el patrón de restricción se corrió el volumen total en un gel de agarosa de alta fidelidad (AMRESCO, EUA) al 5% con regulador TAE, tenido con SYBR (INVITROGEN, EUA) a 110 V por 45 min, y se observó en un transiluminador de luz UV.

Análisis bioinformático.

Se realizó un coeficiente de similitud entre las bandas con el programa NTSYS 2.0 utilizando un coeficiente de correlación cofenética, prueba de Mantel.

Operacionanilización de las variables

A continuación, se expone la operacionalización de las variables que se estudiaron para dar salida a los objetivos: Edad, Sexo, porcentaje de obstrucción, años de tratamiento, sitio anatómico, vía de nacimiento

Variable	Tipo	Descripción	Unidad de medición
Edad diagnóstico	Cuantitativa discreta	Años de vida cronológicamente	Edad al momento del diagnóstico
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	Género del paciente/ Según Sexo biológico	Femenino/ Masculino
Porcentaje de obstrucción de vía aérea	Cuantitativa discreta	Disminución de la luz glótica o reducción del aérea glótica	Porcentaje
Años de tratamiento	Cuantitativa discreta	Tiempo mediante el cual recibió o ha recibido tratamiento al momento del diagnóstico	Años
Sitio Anatómico	Cualitativa nominal	Estructura implicada con la presencia de lesiones papilomatosas	Nariz Faringe Laringe Esófago Pulmón
Vía de nacimiento	Cualitativa nominal	Vía Vaginal: Es el paso del recién nacido a través del canal de parto, desde el útero hasta el exterior Cesárea: Es un procedimiento quirúrgico que consiste en realizar una incisión abdominal y uterina para extraer al bebé.	Vaginal Cesárea
Prueba PCR	Cualitativa nominal	Consiste en la amplificación de un fragmento específico de ADN viral. Empleando cebadores genéticos específicos de los genotipos virales 6, 11, 16,18, 31, 33, 35 y 39,	Presente Ausente
Genotipos/Subtipos virales	Cualitativa nominal	Información genética viral que se detecten PCR, 6, 11, 16,18, 31, 33, 35 y 39,	Presente Ausente

Consideraciones éticas

Para realizar este estudio, se tuvo en cuenta los principios éticos, y el respeto a las personas como rige una investigación, no se reflejaron datos que puedan atentar contra la integridad o autonomía de los pacientes, donde solo se tuvo acceso a la base de datos el autor y el tutor de este proyecto, y la información solo se reveló en presentaciones relacionadas con temas de fines médicos y de investigación

Análisis estadístico

Se realizó la captura de información mediante fuentes pasivas, donde se revisarán los expedientes de cada paciente utilizando un modelo de recolección de datos considerando: nombres, género, edad al diagnóstico, porcentaje(%) de obstrucción , años de tratamiento, sitio anatómico de la lesión, reporte de patología y resultados de la pruebas de tipificación viral. Se recopilaron los datos encontrados por las pruebas de detección de genoma viral según lo reportado por las pruebas PCR

Esta recolección de datos fue tabulada en una base de datos en Excel. Se analizaron las variables mediante el cálculo de media y desviación estándar o mediana y rango intercuartilar como medida de resumen para las variables continuas de acuerdo a su distribución; y porcentajes (%), como medidas de resumen para variables cualitativas (dicotómicas y categóricas). Se usó el programa NTSYS 2.0, para aplicar un coeficiente de correlación cofenética-prueba de Mantel.

RESULTADOS

Las muestras se recolectaron en el departamento de patología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Se recolectaron 11 muestras de niños con intervalo de edad de 1 a 9 años. Se realizó el análisis de los datos clínicos de los pacientes obtenidos de los expedientes obteniéndose los resultados de la Tabla 5(ANEXO 5).

Análisis bioinformático de las variabilidades genéticas del producto amplificado y análisis de los cortes con la enzima de restricción RsaI de los genotipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 39.

Se realizó el análisis de los genotipos 6, 11, 16, 31, 33, 35 y 39, ya que, de acuerdo al trabajo de Peñaloza y col. en el 2000, son los genotipos mayormente encontrados en papilomatosis laringea. El genotipo 16 y 18 se analizaron ya que se utilizó como control positivo para la PCR de punto final células HeLa. Estas células son epiteliales obtenidas de un adenocarcinoma de cérvix, se ha documentado que en su genoma se encuentra insertado el genoma de VPH tipos 16 y 18 (ATCC, n.d.). Los resultados del análisis muestran que los iniciadores Cp alinean con la secuencia de la proteína E1 de los diferentes genotipos (Figura 1,ANEXO 7).

Posteriormente para saber el patrón de restricción de cada uno de los genotipos, el fragmento amplificado se cortó con la enzima RsaI que corta el sitio GT-AC en el programa NEBcutter obteniéndose los fragmentos de la restricción mostrados en la Tabla 6 (ANEXO 7).

Optimización de la desparafinación y extracción de ADN a partir de tejidos incluidos en parafina

Una vez realizada la desparafinación y extracción de ADN de los tejidos en prueba, se realizó una PCR para gen constitutivo humano, para el gen α -globina de 268 pb, donde en el carril 1 se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb, en el 2 el control negativo, en el 3 el control positivo y de los carriles 4 al 7 se colocaron las muestras de tejido en prueba donde se observan dos bandas claras en el carril 4 y 7, mientras que en el carril 5 la banda es muy tenue, y se encuentra ausente en el carril 6 (Figura 2, ANEXO 8).

Desparafinación y extracción de ADN de los tejidos

Se llevó a cabo la desparafinación y extracción de ADN de las muestras de tejido incluido en parafina, se realizó la PCR de punto final para el gen constitutivo humano y se observó en un gel de agarosa al 2% (Figura 3, ANEXO 9), donde se observan las 11 muestras positivas, observándose inespecificidades observadas como bandas de 400 y 600 pb adicionales a la banda de 268 pb del gen α -globina que se busca.

Optimización de PCR de punto final para la detección de VPH

Para obtener el control positivo para la PCR, se propagaron células HeLa y obteniéndose la confluencia observándose como células rectangulares (Figura 4, ANEXO 10) se cosecharon para la extracción del ADN y este fue usado como control positivo para la estandarización.

De acuerdo con el trabajo de Karlsen y col. se trabajaron las condiciones de PCR que se sugieren en su trabajo y se obtuvieron los productos de amplificación de 188 pb para los iniciadores Cp (Figura 5, ANEXO 11). De acuerdo con la banda obtenida se realizó una curva de temperaturas (figura 6, ANEXO 12), probándose 58, 59, 60 y 61°C para obtener una banda intensa, ancha y sin inespecificidades para poder llevar a cabo la purificación de esta. De estos resultados se seleccionó la temperatura de 61°C como la temperatura de alineamiento idónea ya que presentaba menos bandas inespecíficas lo que facilitó la purificación del producto.

Detección de la infección por VPH por PCR-RFLP

Una vez optimizada la PCR, se realizó la detección de las muestras, donde solo se observó positiva la muestra 4 (Figura 6, ANEXO 12) por lo que se decidió realizar una doble PCR con las mismas condiciones partiendo de la mezcla de reacción de la primer PCR; el volumen utilizado para la segunda PCR fue de 5 μ L y las muestras positivas se observaron en la Figura 7 (ANEXO 13).

Realizada la PCR doble se procedió a purificar los fragmentos y realizar la restricción con la enzima RsaI donde se obtuvieron los patrones de corte observados en la Figura 8 (ANEXO 14), donde se corrió por 60 min en un gel de agarosa de alta fidelidad al 5 % con TAE teñidos con SYBR. Se utilizó como marcador de tamaño molecular el marcador de 50 pb y el ADN de bacteriófago Φ X174 digerido con HaeIII.

Análisis bioinformático

Una vez tenido el patrón de restricción, se procedió a realizar la identificación del genotipo de acuerdo con el patrón de bandas, obteniéndose que el control positivo corresponde al genotipo 18, la muestra 6 y 7 al genotipo 33 y la muestra 2 y 4 al genotipo 6 de VPH..

También se realizó una relación de similitud entre las bandas por medio del programa NTSYS 2.0 (Figura 9, ANEXO15), de acuerdo con el patrón de bandas obtenidas por una matriz de datos de ausencia y presencia, se aplicó un coeficiente de correlación cofenética-prueba de Mantel obteniendo una R de 0.90139.

DISCUSIÓN

El Hospital Infantil de México “Federico Gómez” no se conoce la prevalencia de los genotipos predominantes del virus del papiloma humano que estén asociados a papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), que es un padecimiento que afecta la calidad de vida de los pacientes, debido a la necesidad de múltiples intervenciones quirúrgicas ya que el tumor que se desarrolla en la vía aero-digestiva tiende a reaparecer a pesar de su recisión quirúrgica e inclusive de tratarse un caso de PRR generada por un VPH de alto riesgo como los genotipos 16, 18, 31, 33, 39, 45, etc.,⁵¹ podría derivar en un cáncer laríngeo. Por tal motivo surge la necesidad de tipificar el genotipo asociado, dándole la oportunidad al médico tratante un parámetro para una buena prognosis.

Para llevar a cabo este proyecto se decidió comenzar con un análisis bioinformático obteniendo los genomas de los diferentes genotipos de VPH a través del *Gen Bank*⁹⁸, posteriormente con el programa *CLUSTAL OMEGA* del Instituto Europeo de Bioinformática se realizó el alineamiento de los iniciadores Cp con los diferentes genotipos, ya que estos iniciadores son dirigidos contra la proteína E1 de expresión temprana, ya que es una de las más conservadas dentro de los más de 100 genotipos de VPH, estos iniciadores han resultado eficientes en la identificación de este virus⁹⁵. Como se observa en la Figura 1, todos los genotipos estudiados comparten una región específica donde los iniciadores empleados en este estudio podrán alinearse permitiendo una correcta amplificación del gen de interés, logrando así identificar cuando menos los genotipos reportados por Peñaloza³⁴ et al. en el 2000, los cuales identificaron siete genotipos principales asociados a la papilomatosis laríngea en niños atendidos en el servicio pediátrico de otorrinolaringología del Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS en Guadalajara Jalisco.

Una vez realizando el alineamiento se procedió a realizar el análisis bioinformático de la restricción de los amplicones con la enzima RsaI por medio del programa NEBcutter V2.0 de New England BioLabs, a pesar de que el fragmento amplificado es pequeño (188 pb aproximadamente), ningún genotipo comparte el patrón de bandas (Tabla 6), por lo que resulta adecuado emplear esta enzima en un análisis RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), aunado a esto, la enzima RsaI ha sido reportada por diversos autores como la idónea para realizar el análisis RFLP para los amplicones obtenidos a través de los iniciadores Cp^{34,99}.

Una parte importante de este trabajo es la obtención de ADN a partir de muestras de tejidos incluidos en parafina, dentro de estos tejidos se encuentra conservado el material genético para realizar múltiples estudios para diagnóstico e investigación, sin embargo, cuando estos tejidos son fijados en formol y embebidos en parafina, se presentan dificultades para su posterior desparafinación, ya que si este tejido será usado para extracción de ADN, el formol al no tener un regulador de pH, tiende a oxidarse formándose ácido fórmico provocando una disminución del pH incluso por debajo de 4, provocando que los enlaces β -glicosídicos de las purinas se hidrolicen¹⁰⁰.

Por otra parte, la desparafinación también es una etapa crítica en la extracción de ADN ya que se usan solventes que pueden dañar el material genético, por tal motivo antes de procesar las muestras objetivo de este estudio se llevó la estandarización de la técnica para evitar estos contratiempos. Se emplearon cuatro tejidos embebidos en parafina provistas por el grupo de trabajo, el método que se empleó para la eliminación de la parafina de los tejidos es por medio de lavados con xilol y etanol, esta metodología ha reportado buenos resultados con respecto a la calidad de ADN obtenido¹⁰¹. El propósito del xilol es remover la parafina, para posteriormente llevar a cabo una rehidratación gradual del tejido con etanol a diferentes concentraciones¹⁰¹, de acuerdo con lo observado en el grupo de trabajo, este procedimiento es crítico ya que el exceso de xilol o la exposición prolongada a este solvente degrada el ADN además, que los residuos de xilol pueden interferir en análisis posteriores.

Una vez retirada la parafina del tejido, se lleva a cabo la extracción de ADN. Actualmente existen muchos métodos para llevar a cabo este procedimiento, sin embargo, se llevó a cabo por el método de Boom⁹⁶, el cual se fundamenta en la unión del ADN a las partículas de sílice. Este método ha sido modificado a través de los años, pero ha demostrado la obtención de ADN libre de inhibidores, íntegro y con buenos rendimientos¹⁰². Posterior a la extracción del ADN se realizó una PCR dirigida hacia un gen constitutivo humano, β -globina para corroborar que los procedimientos anteriores se habían realizado de una forma adecuada permitiendo la obtención de ADN, en la cual se observó un resultado positivo para las cuatro muestras procesadas que se utilizaron durante la estandarización (Figura 6), lo cual nos lleva a inferir que el ADN obtenido a partir de esta metodología se encuentra en buenas condiciones para su estudio⁹⁹.

Una vez que ya se había estandarizado la marcha de trabajo por aplicar en los tejidos de estudio se procedió a su desparafinación. Se procesaron 11 muestras que fueron proporcionadas por el departamento de patología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", a cargo del Dr. Pedro Mayoral. A estas muestras se les eliminó la parafina y se llevó a cabo la extracción de ADN y posteriormente se realizó la PCR para el gen constitutivo humano β -globina el cual se observa en la Figura 7, y podemos apreciar que la cantidad de ADN obtenida es de baja cantidad si se compara con el control positivo comparándose la luminiscencia, por lo tanto, al verse comprometida la integridad del ADN de las muestras es menor la cantidad de copias obtenidas de la amplificación del gen constitutivo de la β -globina, por tal motivo la calidad de la extracción de ADN del tejido parafinado depende en gran medida de la manera en que este fue fijado, por lo cual se hace necesario monitorear el pH del formol empleado para la fijación de tejidos, facilitando la obtención de ADN con mejores características para investigaciones posteriores. A pesar de que se obtuvieron bandas muy tenues o en algunas muestras no se observaba la banda, aun así se decidió continuar con el estudio ya que se sabe que el virus puede insertar su genoma en el del huésped o mantenerlo de forma episomal¹⁰³, si se encuentra de forma episomal, esto le confiere al ADN más resistencia a la

degradación ya que al estar de forma circular no tiene extremos libres que puedan empezar a degradar las enzimas (ADNasa)¹⁰⁴.

Después de realizar la PCR para gen constitutivo humano, se llevó a cabo la identificación viral por PCR de punto final, en la primera reacción realizada, solo se obtuvo una muestra positiva de las 11 analizadas (Figura 7), por lo que se decidió realizar una doble PCR a partir del primer producto de PCR, obteniéndose cuatro muestras positivas de las 11 analizadas (Figura 8), esto se pudo haber debido a lo ya mencionado con los problemas que se encuentran al trabajar con tejidos en parafina, una forma de evitar estos inconvenientes sería correr de manera paralela el estudio histopatológico y el molecular dividiendo la muestra obtenida a través de la biopsia y así evitar la parafinación, arriesgando el material genético. De esta manera también se evita el contacto del ADN con el xilol y solventes que pueden llevar a cabo su degradación.

Una vez que se tenía el fragmento de interés amplificado, se llevó a cabo la purificación por el método de Boom⁹⁶ con la finalidad de realizar la restricción del amplicon, la cual se puede observar en la Figura 9. Una vez teniendo el patrón de bandas, éstas se compararon con las obtenidas a través de un análisis bioinformático realizado previamente (Tabla 6) pudiendo obtener dos genotipos, uno de bajo riesgo el genotipo 6 en las muestra dos y cuatro, y uno de alto riesgo el genotipo 33 en las muestras seis y siete. Adicional a esto, el patrón de bandas obtenido se analizó para obtener un estudio de correlación de similitud con el programa NTSYS 2.0, aplicando un coeficiente de correlación cofenética-prueba de Mantel (Figura 9) obteniéndose una R de 0.90139, lo que nos quiere decir que los genotipos pertenecen al mismo tipo viral y los genotipos 6 tienen una similitud del 100% entre ellos, por otro lado las muestras 6 y 7 tienen una similitud de 85%, lo que sugiere que, a pesar de ser el mismo genotipo son subtipos diferentes, pero para poder asegurarlo es necesario realizar su secuenciación, como el recientemente método de secuenciación aprobado publicado por Wagner et al¹⁰⁵ ,.

Para poder realizar un análisis más amplio se obtuvieron algunos datos clínicos de los pacientes para correlacionarlos con los datos obtenidos durante este trabajo. Se observa como el paciente M-1 con el subtipo VPH-33 se diagnosticó temprana edad pero presentó menos porcentaje de obstrucción comparada con los pacientes M-2 y M4, esto sugiere la variabilidad clínica que puede tener esta enfermedad, en que hay pacientes que pueden debutar la enfermedad temprana edad relacionando esto con subtipos virales de alto riesgo. Las cuatro muestras positivas tenían diagnóstico clínico y/o patológico de papilomatosis laríngea, y las siete muestras restantes, a pesar de tener un diagnóstico presuntivo de papilomatosis el estudio histológico del tejido reportó en varios casos esofagitis. Esto nos plantea la necesidad de confirmar el diagnóstico mediante el análisis molecular, para saber así que genotipo tiene el paciente y poder tratarlo de manera oportuna e identificar a los pacientes que tengan potencial de desarrollar algún proceso maligno por estar infectados con un genotipo de alto riesgo. De las 11 muestras analizadas únicamente se sabía que en la muestra 6 la madre era portadora de VPH vaginal, se podría realizar un seguimiento de las madres de los pacientes para ver si están infectadas por el virus y si corresponde con el encontrado en los pacientes, de ser así se confirma lo ya reportado que la transferencia de este virus se da por vía vertical durante el embarazo.

Con base en lo encontrado en este trabajo, las perspectivas serían poder realizar un análisis más completo con un mayor número de pacientes para poder realizar la prevalencia de esta enfermedad, teniendo así en México más datos sobre el virus y esta enfermedad que afecta a los niños.

CONCLUSIONES

El subtipo más encontrados fueron VPH-33 y VPH-6. La presencia de un subtipo de alto riesgo(VPH-33) hace sugerir que en los pacientes con papilomatosis es posible también encontrar genotipos de alto riesgo que pueden predisponer al paciente a un proceso tumoral maligno. El análisis clínico y patológico debe hacerse correctamente para el diagnóstico diferencial, ya que se pueden presentar casos que simulan papilomatosis. Nuestros resultados preliminares muestran la necesidad de evidenciar con mayor claridad los genotipos de VPH que están infectando a la población infantil mexicana. Los resultados sugieren la necesidad de confirmar molecularmente aquellos diagnosticados de papilomatosis por histopatología.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha	Actividad
Diciembre 2020	Selección del tema a investigar
Enero 2021	Revisión bibliográfica
Febrero 2021	Elaboración de protocolo
Marzo 2021	Recolección y procesamiento de las muestras
Abril 2021	Análisis y discusión de los resultados
Mayo 2021	Terminación y presentación del trabajo de investigación

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope*. 2008 Jul;118(7):1236-47.
- 2- Fortes H.R.; von Ranke, F.M.; Escuissato, D.L.; Araujo Neto, C.A.; Zanetti, G.; Hochhegger, B.; Souza, C.A.; Marchiori, E. Recurrent respiratory papillomatosis: A state-of-the-art review. *Respir. Med.* 2017, 126, 116–121.
- 3- Larson DA, Derkay CS. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS* 2010; 118:450
- 4- Gerein V, Schmadt S, Babkina N, Barysik N, Coerdt W, Pfister H. Human papilloma virus (HPV)-associated gynecological alteration in mothers of children with recurrent respiratory papillomatosis during long-term observation. *Cancer Detection and Prevention* 31 (2007) 276-281.
- 5- Armstrong LR, Derkay CS, Reeves WC. Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999; 125: 743-748.
- 6- Derkay CS. Task Force on recurrent respiratory papillomatosis: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995; 121 (12): 1386-1391.
- 7- Derkay CS. Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 2001; 111 (7): 57-69
- 8- Doorbar, J.; Quint, W.; Banks, L.; Bravo, I.G.; Stoler, M.; Broker, T.R.; Stanley, M.A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012, 30 (Suppl. 5), F55–F70.
- 9- Woodman, C.B.; Collins, S.I.; Young, L.S. The natural history of cervical hpv infection: Unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer* 2007,7, 11–22.
- 10- Ribeiro, A.L.; Caodaglio, A.S.; Sichero, L. Regulation of hpv transcription. *Clinics (Sao Paulo)* 2018, 73, e486s.
- 11- Tjon Pian Gi REA, San Giorgi MRM, Slagter-Menkema L, et al. Clinical course of recurrent respiratory papillomatosis: comparison between aggressiveness of human papillomavirus-6 and human papillomavirus-11. *Head Neck*. Vol 37. New Jersey: Wiley Periodicals, LLC; 2015: 1625-1632
- 12- Buchinsky FJ, Valentino WL, Ruzskay N, et al. Age at diagnosis, but not HPV type, is strongly associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. *PLoS One*. 2019;14:e0216697.

- 13- Shehata BM, Otto KJ, Sobol SE, et al. E6 and E7 oncogene expression by human papilloma virus (HPV) and the aggressive behavior of recurrent laryngeal papillomatosis (RLP). *Pediatr Dev Pathol.* 2008;11:118-121
- 14- Welschmeyer A, Berke GS. An updated review of the epidemiological factors associated with recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology.* 2021;6:226–233
- 15- Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. *Apmis.* 2010;118(6–7):455-470
- 16- Ivancic R, Iqbal H, de Silva B, Pan Q, Matrka L. Immunological tolerance of low-risk HPV in recurrent respiratory papillomatosis. *Clin Exp Immunol.* 2020;199:131-142
- 17- H.A. Cubie, A.L. Seagar, E. McGoogan, J. Whitehead, A. Brass, M.J. Arends, et al. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18, *Mol. Pathol.* 54 (2001) 24—29.
- 18- K. Szuhai, E. Sandhaus, S.M. Kolkman-Uljee, M. Lemaitre, J.C. Truffert, R.W. Dirks, et al. A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with SYBR Green and molecular beacon polymerase chain reaction, *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 1651—1660
- 19- F.L. Rimell, D.L. Shoemaker, A.M. Pou, J.A. Jordan, J.C. Post, G.D. Ehrlich, Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors, *Laryngoscope* 107 (1997) 915—918.
- 20- J.-F. Gelinias, J. Manoukian, A. Co^{te}, Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 72 (April (4)) (2008) 433–452.
- 21- J.-F. Gelinias, J. Manoukian, A. Co^{te}, Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 72 (April (4)) (2008) 433–452.
- 22- Scatolini ML, Labeldz G, Cocciaglia A, Pérez CG, Nieto ME, Rodriguez DA. Laryngeal sequelae secondary to surgical treatment for recurrence respiratory papillomatosis in children. *Int. J. Pediatr. Otorrhinolaryngol.* 130 (2020) 109815.
- 23- Marsico M, Mehta V, Chastek B, Liaw KL, Derkay C. Estimating the incidence and prevalence of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis in publicly and privately insured claims databases in the United States. *Sex Transm Dis* 2014;41: 300–5.

- 24- Morgan AH, Zitsch RP. Recurrent respiratory papillomatosis in children: a retrospective study of management and complications. *Ear Nose Throat J* 1986;65:19.
- 25- J. Bodily, L.A. Laimins, Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression, *Trends Microbiol.* 19 (2011) 3339.
- 26- Bello de Alford M, Caibe R G. Tipificación del Virus del Papiloma Humano en Papilomatosis Laríngea Recurrente Juvenil. *RFM [Internet]*. 2001; 24(1): 62-65. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079804692001000100009&lng=es.
- 27- Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, et al (2010). Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and-11
- 28- Gallagher TQ, Derkay CS. Recurrent respiratory papillomatosis: update 2008. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;16(6):536–42.
- 29- Y.T. Long, A. Sani, Recurrent respiratory papillomatosis, *Asian J. Surg.* 26 (2003) 112—116.
- 30- Benedict PA, Ruiz R, Yoo M, et al. Laryngeal distribution of recurrent respiratory papillomatosis in a previously untreated cohort. *Laryngoscope* 2018;128(1): 138–43.
- 31- San Giorgi MRM, Aaltonen L-M, Rihkanen H, et al. Quality of life of patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope.* 2017;127(8):1826-1831.
- 32- W.C. Reeves, S.S. Ruparelia, K.I. Swanson, C.S. Derkay, A. Marcus, E.R. Unger, National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 129 (9) (2003) 976–982
- 33- Reyes LM, Aguilar JL, Villamor P, De La Torre C, Álvarez A, Mantilla E, Álvarez-Neri H. Clinical and sociodemographic characteristics associated with disease severity in juvenile recurrent respiratory papillomatosis: A study of 104 patients in a tertiary care pediatric hospital. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2018 May;108:63-66
- 34- Peñaloza-Plascencia M, Montoya-Fuentes H, Flores-Martínez SE, Fierro-Velasco FJ, Peñaloza González JM, Sánchez-Corona J. Molecular identification of Human Papillomavirus Types Recurrent Respiratory Papillomatosis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000; 126: 1119-1123.
- 35- Donne AJ, Keltie K, Cole H, Sims AJ, Patrick H, Powell S. Prevalence and management of recurrent respiratory papillomatosis (RRP) in the UK: cross-sectional study. *Clin Otolaryngol.* 2017;42(1):86-91.

- 36- Campisi P, Hawkes M, Simpson K, et al. The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. *Laryngoscope*. 2009;120(6):1233-1245.
- 37- Derkay CS, Bluher AE. Recurrent respiratory papillomatosis: Update 2018. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;26(6):421-425.
- 38- Derkay CS, Bluher AE. Update on Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Otolaryngol Clin North Am*. 2019 Aug;52(4):669-679
- 39- M.J. Silverberg, P. Thorsen, H. Lindeberg, L.A. Grant, K.V. Shah, Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, *Obstet. Gynecol.* 101 (April (4)) (2003) 645–652.
- 40- Pfister H and zur Hausen H: Seroepidemiological studies of human papilloma virus (HPV-1) infections. *Int J Cancer* 21: 161-165, 1978.
- 41- Costa J, Howley PM, Bowling MC, Howard R and Bauer WC: Presence of human papilloma viral antigens in juvenile multiple laryngeal papilloma. *Am J Clin Pathol* 75: 194-197, 1981.
- 42- Braun L, Kashima H, Eggleston J and Shah K: Demonstration of papillomavirus antigen in paraffin sections of laryngeal papillomas. *Laryngoscope* 92: 640-643, 1982.
- 43- Mounts P, Shah KV and Kashima H: Viral etiology of juvenile- and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5425-5429, 1982.
- 44- Mamas IN, Sourvinos G, Vakonaki E, Giamarelou P, Michael C and Spandidos DA: Novel human papilloma virus (HPV) genotypes in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Eur J Pediatr* 169: 1017-1021, 2010.
- 45- Niyibizi J, Rodier C, Wassef M, Trottier H. Risk factors for the development and severity of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014 Feb;78(2):186-97
- 46- Azzimonti B, Hertel L, Aluffi P, Pia F, Monga G, Zocchi M, Landolfo S, Gariglio M (1999) Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesions using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol* 59:110–116
- 47- Nicollas R, Henry M, Triglia JM, Tamalet C (2007) HPV type 6 and 16 co-infection in a 11-year-old girl presenting laryngeal papillomatosis. *J Clin Virol* 40:252–254
- 48- Donne AJ, Hampson L, Homer JJ, Hampson IN. The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010 Jan;74(1):7-14

- 49- Lawlor C, Balakrishnan K, Bottero S, et al. International Pediatric Otolaryngology Group (IPOG): Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis consensus recommendations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2020;128:109697
- 50- Avelino MAG, Zaiden TCDT, Gomes RO. Surgical treatment and adjuvant therapies of recurrent respiratory papillomatosis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79(5):636-642.
- 51- Molina J, Manjarrez E, T. J. (2010). Familia Papillomaviridae. In M. Editores (Ed.), *Microbiología. Bacteriología y Virología.* (pp. 768–794). México.
- 52- Acheson, N. H. (2011). Papillomaviruses. In I. John Wiley & Sons (Ed.), *Fundamentals of molecular virology* (2°, pp. 263–271)
- 53- Santos L, Marquez D, Reyes L, V. R. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 53(244), S166–S171.
- 54- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). Family Papillomaviridae. In Elsevier (Ed.), *Virus Taxonomy. In: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 235–239)
- 55- Beltrán, L. F. (2014). Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 45(2), 108–118.
- 56- Flint S.J., Enquist L.W., Racaniello V.R., S. A. M. (2009). Genome Replication Strategies: DNA Viruses. In A. Press (Ed.), *Principles of Virology* (3°, pp. 324–329). Washington. DC
- 57- Stubenrauch, F., & Laimins, L. a. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology*, 9(6), 379–386.
- 58- Picconi M, T. A. (2014). Papilomavirus humanos. In C. E. y Distribuidora (Ed.), *Virología médica* (pp. 589–598). Buenos Aire, Argentina.
- 59- Rombaldi, R. L., Serafini, E. P., Mandelli, J., Zimmermann, E., & Losquiavo, K. P. (2008). Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virology Journal*, 5, 106.
- 60- M.J. Silverberg, P. Thorsen, H. Lindeberg, L.A. Grant, K.V. Shah, Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, *Obstet. Gynecol.* 101 (April (4)) (2003) 645–652.
- 61- K.V. Shah, W.F. Stern, F.K. Shah, D. Bishai, H.K. Kashima, Risk factors for juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17 (May (5)) (1998) 372–376.

- 62- B.J. Wiatrak, D.W. Wiatrak, T.R. Broker, L. Lewis, Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population, *Laryngoscope* 114 (November (11 Pt 2 Suppl. 104)) (2004) 1–23.
- 63- M.J. Silverberg, P. Thorsen, H. Lindeberg, L. Ahdieh-Grant, K.V. Shah, Clinical course of recurrent respiratory papillomatosis in Danish children, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 130 (June (6)) (2004) 711–716.
- 64- Serrano Saénz, J. E. (2018). Papilomatosis laríngea asociada a número de parejas sexuales, en pacientes intervenidos en el Hospital Eugenio Espejo (Master's thesis, Quito: UCE)
- 65- R. Leung, M. Hawkes, P. Campisi, Severity of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis is not associated with socioeconomic status in a setting of universal health care, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 71 (June (6)) (2007) 965–972.
- 66- Secretaria de salud. (2014). Desarrollo, Evolución y Estadística del Virus del Papiloma Humano. *Boletín Epidemiológico*, 1–68.
- 67- P. Campisi, M. Hawkes, K. Simpson, The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database, *Laryngoscope* 120 (June (6)) (2010) 1233–1245.
- 68- Reeves WC, Ruparelia SS, Swanson KI, et al. National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129:976.
- 69- Armstrong LR, Preston EJ, Reichert M, et al. Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle. *Clin Infect Dis* 2000;31:107.
- 70- Novakovic D, Cheng ATL, Zurynski Y, et al. A prospective study of the incidence of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis after implementation of a National HPV Vaccination Program. *J Infect Dis* 2018;217(2):208–12.
- 71- S. Katsenos, H. Becker, Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: a propos of two cases and a brief literature review, *Case Rep. Oncol.* 4 (1) (2011)162-171.
- 72- M. Fusconi, M. Grasso, A. Greco, et al., Recurrent respiratory papillomatosis by HPV: review of the literature and update on the use of cidofovir, *Acta Otrhinolaryngol. Ital.* 34 (6) (2014) 375-381.

- 73- E. Marchiori, C. Araujo Neto, G.S. Meirelles, et al., Laryngo tracheobronchial papillomatosis: findings on computed tomography scans of the chest, *J. Bras.Pneumol.* 34 (12) (2008) 1084-1089.
- 74- L. A_ggünlü, G. Erbas, Recurrent respiratory papillomatosis with lung involvement, *Diagn Interv. Radiol.* 15 (2) (2009) 93-95.
- 75- C.H. Chang, H.C. Wang, M.T. Wu, et al., Virtual bronchoscopy for diagnosis of recurrent respiratory papillomatosis, *J. Formos. Med. Assoc.* 105 (6) (2006) 508-511.
- 76- P. Goon, C. Sonnex, P. Jani, et al., Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 265(2) (2008) 147-151.
- 77- Seedat RY, Schall R. Age of diagnosis, incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis-A South African perspective. *Clin Otolaryngol.* 2018;43(2):533–537.
- 78- Matinhira N, Soko ND, Bandason T, et al. Human papillomavirus types causing recurrent respiratory papillomatosis in Zimbabwe. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2019;116:147–152.
- 79- E.L. Shiau, M.F. Li, J.H. Hsu, et al., Recurrent respiratory papillomatosis with lung involvement, *Thorax* 69 (3) (2014) 302-303.
- 80- Ilboudo M, Zohoncon TM, Traore IMA, et al. Implication of low risk human papillomaviruses, HPV6 and HPV11 in laryngeal papillomatosis in Burkina Faso. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg.* 2019;40(3):368–371
- 81- E. Marchiori, A.S. Pozes, A.S. Souza Junior, et al., Diffuse abnormalities of the trachea: computed tomography findings, *J. Bras. Pneumol.* 34 (1) (2008) 47-54.
- 82- Shapiro AM, Rimell FL, Shoemaker D, et al. Tracheotomy in children with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: the Children's Hospital of Pittsburgh experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996;105:1–5.
- 83- Blackledge FA, Anand VK. Tracheobronchial extension of recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109:812–818.
- 84- Cole RR, Myer CM III, Cotton RT. Tracheotomy in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck.* 1989;11: 226–230.
- 85- Díaz Gómez, D. E. (2017). Detección y tipificación del genotipo del virus de papiloma humano en pacientes con papilomatosis laríngea recurrente atendidos en el Hospital Antonio Lenin Fonseca en el período comprendido Enero-Diciembre 2017 (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua).

- 86- Bauman NM, Smith RJH. Papilomatosis respiratoria recurrente. *Clinicas pediátricas de Norteamérica*. 1996, Vol 6:1299-1316.
- 87- Rodríguez, V., & Michalski, D. (2010). Papilomatosis laríngea infantil. *Revista faso año*, 17, 16-22
- 88- M. Carifi, D. Napolitano, M. Morandi, et al., Recurrent respiratory papilomatosis: current and future perspectives, *Ther. Clin. risk Manag.* 11 (2015) 731-738.
- 89- Malick N, Cheikh NI, Arnaud IOF, et al. Laryngeal papillomatosis in children. *Oto-Rhino-Laryngologie Française*. 2008;94:379–381.
- 90- Holler T, Allegro J, Chadha NK, et al. Voice outcomes following repeated surgical resection of laryngeal papillomata in children. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;141(4):522–526.
- 91- Valera F, Maldonado L, Lima J, et al. Efficacy of cidofovir in recurrent juvenile respiratory papillomatosis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(6):713–717.
- 92- R.A. Tasca, R.W. Clarke, Recurrent respiratory papillomatosis, *Arch. Dis. Child.*(8) (2006) 689-691.
- 93- Maturo S, Hartnick CJ. Use of 532-nm pulsed potassium titanyl phosphate laser and adjuvant intralesional bevacizumab for aggressive respiratory papillomatosis in children: initial experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(6):561–565.
- 94- Mohr M, Schliemann C, Biermann C, et al. Rapid response to systemic bevacizumab therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Oncol Lett.* 2014;8(5):1912–1918.
- 95- Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G., Holm, R., ... Hagmar, B. (1996). Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2095–2100
- 96- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-vanDillen, P. M. E., & Noordaa, J. van der. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 495–503.
- 97- Vazquez, G. C., Distefano, A. L., & Mural, J. (2000). Variantes moleculares de Virus de Papiloma Humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cervix, 889–894.
- 98- NCBI. (2017). Gen Bank. Retrieved June 14, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- 99- Aedo A, S., Melo A, A., García, P., Guzmán G, P., Capurro V, I., & Roa S, J. C. (2007). Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones

preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Revista Medica de Chile*, 135(2), 167–173

- 100- Bielawski, K., Zaczek, A., Lisowska, U., Dybikowska, A., Kowalska, A., Falkiewicz, B. (2001). The suitability of DNA extracted from formalin-fixed , paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis, 573–578.
- 101- Sierra, G. Z., Flórez, Ó. V., & González, C. (2004). Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. *Salud UIS*, 36(29), 73–79.
- 102- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Comparison and optimization of ancient DNA extraction, 42(3), 343–352.
- 103- Avendaño, L., Ferrés, M., & Spencer, E. (2011). *Virología Clínica. Mediterraneo*.
- 104- Lorente, J. (1997). Nuevas perspectivas en paleopatología a través de la genética. In J. P. M. Macias (Ed.), *La enfermedad en los restos humanos arqueológicos : actualización conceptual y metodológica : actas del IV Congreso Nacional de Paleopatología* (Servicio d, pp. 125–137). Cádiz, España.
- 105- Wagner S, Roberson D, Boland J, Kreimer AR, Yeager M, Cullen M, Mirabello L, Dunn ST, Walker J, Zuna R, Porras C, Cortes B, Sampson J, Herrero R, Rodriguez AC, Quint W, Van Doorn LJ; CVT Group, Hildesheim A, Schiffman M, Wentzensen N. Evaluation of TypeSeq, a Novel High-Throughput, Low-Cost, Next-Generation Sequencing-Based Assay for Detection of 51 Human Papillomavirus Genotypes. *J Infect Dis*. 2019 Oct 8;220(10):1609-1619

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El diseño del estudio es retrospectivo limitando la capacidad de realizar un análisis clínico y patológico de las muestras procesadas en los pacientes. Por otra parte existieron pérdidas considerables al momento de conservación de los tejidos lo cual se tradujo en una disminución de la determinación del genotipo viral, el cual era el objetivo principal del estudio. La variabilidad de los resultados pueden ser secundaria a la forma características de la medición así como a la intervención en el análisis de varios investigadores y participantes. El tamaño de la muestra es muy pequeño por lo que los resultados obtenidos se pueden considerar solo preliminar

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Iniciadores usados para la identificación de VPH ⁹⁵ .					
Tipo	Iniciador	Secuencia del iniciador	Posición	pb	Gen
Cp	CPI	5'-TTA TCW TAT GCC CAY TGT ACC AT-3'	1942-1964	188	E1
	CPIIG	5'-ATG TTA ATW SAG CCW CCA AAA TT-3'	1777-1799		

ANEXO 2

Tabla 2. Iniciadores usados para la PCR de gen constitutivo humano ⁹⁷		
	Secuencia del iniciador	Tamaño
β -globina	Fw 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'	268 pb
	Rv 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'	

ANEXO 3

Tabla 3. Condiciones para la PCR de punto final para el gen de la β-globina ⁹⁷			
Ciclos	Pasos	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	94 °C	5 min
35	Desnaturalización	94 °C	30 seg
	Alineamiento	58 °C	30 seg
	Extensión	72 °C	30 seg
1	Extensión	72 °C	5 min

ANEXO 4

Tabla 4. Condiciones para la PCR de punto final para la detección de VPH ⁹⁵			
Iniciadores	Reactivo	Concentración	Condiciones del termociclador
CP	Regulador	1X	Un ciclo
	MgCl ₂	3 mM	Desnaturalización 94 °C por 5 min
	dNTP's	200 μ M	35 ciclos
	Iniciadores	25 pmol	Desnaturalización 95 °C por 30 s
	CPI		Alineamiento 55°C por 30 s
	CPIIG		Extensión 72°C por 130 s
	Taq polimerasa	5 U	Un ciclo Extensión 72°C por 5 min

ANEXO 5

Tabla 5. Datos clínicos de pacientes.

Muestra	Lugar de procedencia	Sexo	Edad de diagnóstico	% obstrucción	Años en tratamiento	Sitio anatómico de la lesión	Vía nacimiento*	Diagnostico y/o reporte de patología
M-1	Hidalgo	F	3	95	3	Laringe	E	Papilomatosis laríngea
M-2	Edomex.	M	1	100	2	Esófago	E	Papilomatosis laríngea
M-3	Edomex.	M	2	80	2	Laringe	C	Esofagitis crónica moderada, reporte de patología con 80% de obstrucción por papilomatosis con diagnostico final de esofagitis
M-4	Edomex.	M	2	90	2	Laringe	E	Papilomatosis laríngea
M-5	Campeche	F	5	70	Cont.	Laringe	E	Papilomatosis laríngea
M-6	CDMX	M	1	70	2	Laringe	E	Papilomatosis laríngea
M-7	Sinaloa	M	7	95	1	Laringe	E	Papilomatosis laríngea, madre portadora de VPH vulvar.
M-8	Edomex.	M	4	95	5	Laringe	C	Estenosis esofágica por ingesta de pila con quemadura
M-9	Edomex.	F	7	90	4	Laringe	E	Papilomatosis laríngea
M-10	CDMX	M	7	-**	2	Esófago	C	Alergia a la proteína de la vaca, reporte de patología con esofagitis crónica leve secundaria a reflujo
M-11	CDMX	F	6	40	5	Esófago	C	Hemihipertrofia cruzada, linfadenoma reporte de patología: cambios mínimos no diagnosticados.

*= E (eutócico), C (cesárea).

**= No tenía obstrucción, biopsia por esofagitis.

ANEXO 6

188 pb



Figura 1. Alineamiento de los iniciadores con los genotipos de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 39. Se muestra de azul el iniciador CPIIG y de verde el CPI, dando un producto de 188 pb.

ANEXO 7

Tabla 6. Patrón de restricción de los diferentes genotipos de VPH con la enzima RsaI.

Genotipo	Número de cortes	Sitios de corte	Fragmentos
VPH-6	2	57, 78	110,57,21
VPH-11	1	78	110, 78
VPH-16	3	30, 147, 170	117, 30, 23, 18
VPH-18	1	170	170, 18
VPH-31	3	30, 52, 170	118, 30, 22, 18
VPH-33	3	83, 90, 170	83, 80, 18, 7
VPH-35	2	170, 30	140,30, 18
VPH-39	1	162	162, 26

ANEXO 8

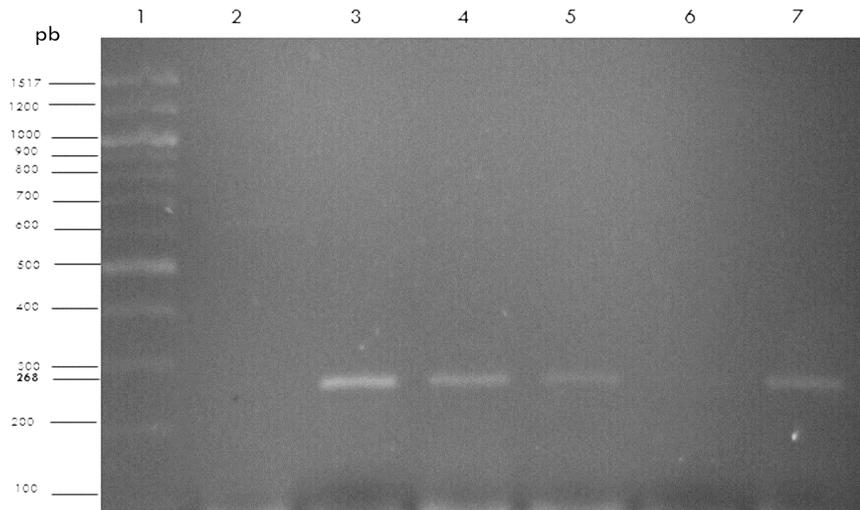


Figura 2. Gel de agarosa al 2% de PCR para el gen constitutivo b-globina de 268 pb. En el carril 1 se muestra el marcador de tamaño molecular de 100 pb, en el 2 el control negativo, en el 3 el control positivo y del 4 al 7 muestras de tejido incluido en parafina del cual se extrajo ADN.

ANEXO 9

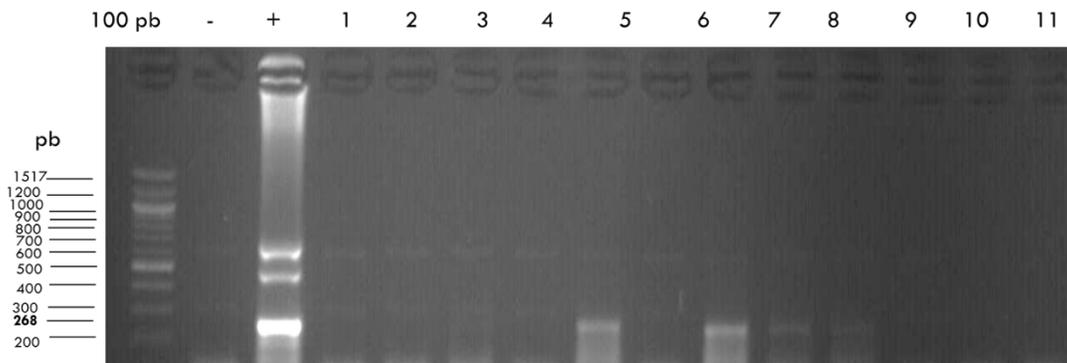


Figura 3. Gel de agarosa al 2% de PCR de gen constitutivo de las muestras. Se observa el marcador de 100 pb, el control negativo, control positivo y las muestras. Se observan todas las muestras positivas y dos bandas inespecíficas de 400 y 600 pb

ANEXO 10

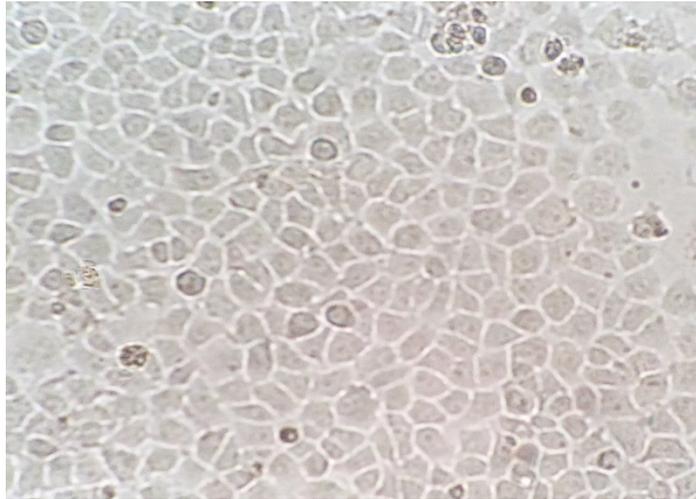


Figura 4. Células HeLa confluentes. Observadas a 40X con microscopio invertido.

ANEXO 11

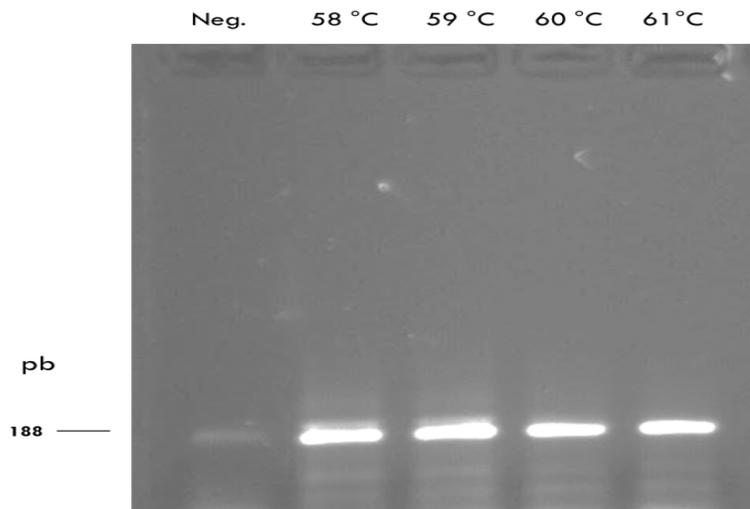


Figura 5. Gel de agarosa al 2% de diferentes temperaturas de alineamiento para la PCR. Se observa el control negativo en el primer carril, posteriormente una temperatura de alineamiento de 58, 59, 60 y 61°C.

ANEXO 12

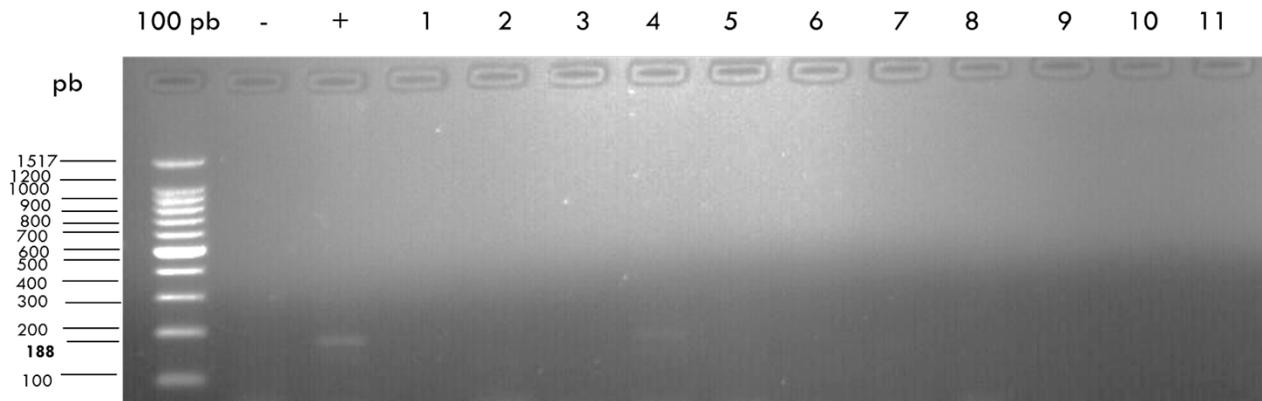


Figura 6. Gel de agarosa al 2% de la PCR de las muestras. Se observa el control negativo y positivo, posteriormente las muestras obteniéndose positiva únicamente la 4

ANEXO 13

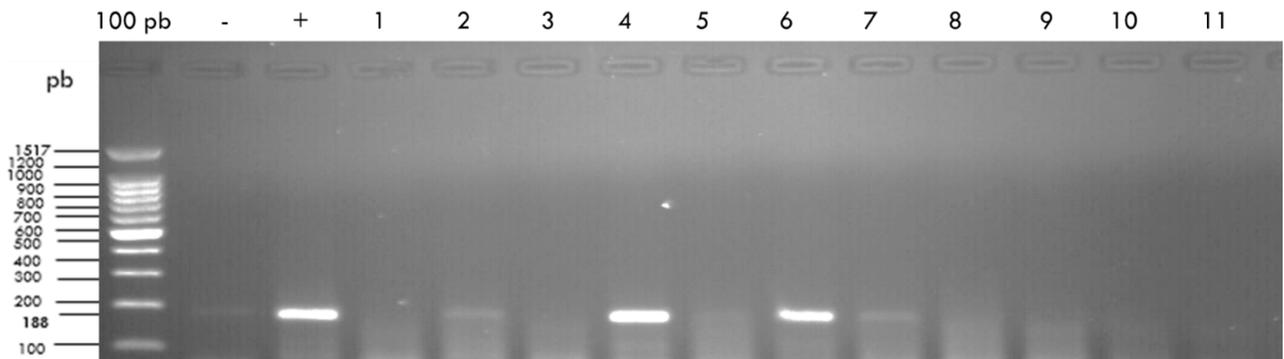


Figura 7. Gel de agarosa al 2% de doble PCR de las muestras. Se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb, control negativo y positivo, se muestra el resultado al colocar 5 μ l obteniendo cuatro muestras positivas

ANEXO 14

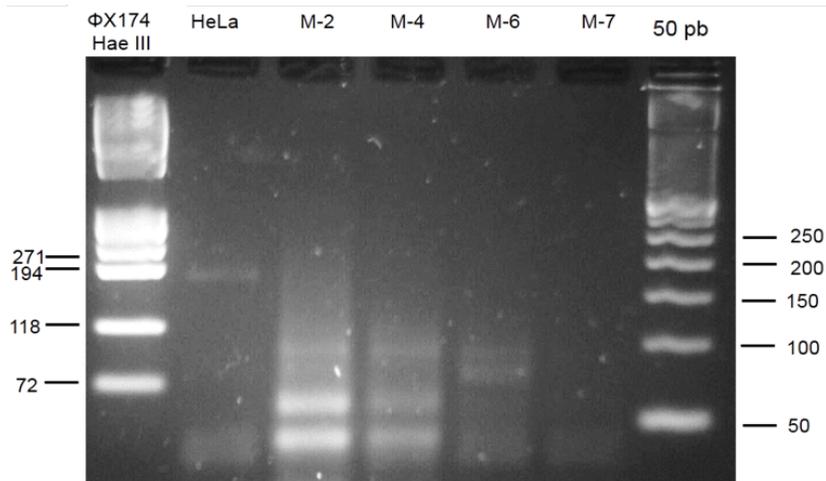


Figura 8. Restricción con la enzima RsaI de las muestras positivas a VPH. Gel de agarosa de alta fidelidad al 5% con TAE 1X teñido con SBYR. En el carril uno se observa el marcador de tamaño de 50 pb, posteriormente el control positivo de células HeLa, las muestras y finalmente el marcador del ADN de bacteriófago Φ X174 digerido con HaeIII.

ANEXO 15

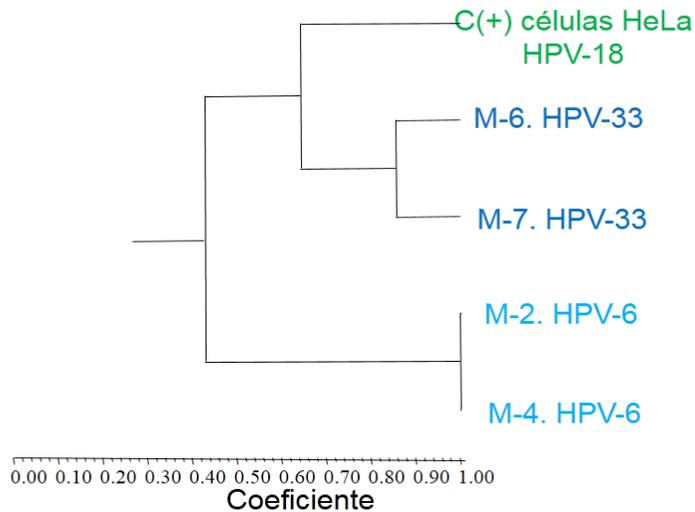


Figura 9. Correlación de similitud del patrón de bandas. Realizado por medio del programa NTSYS 2.0. Se aplicó un coeficiente de correlación cofenética-prueba de Mantel obteniendo una R de 0.90139