



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS-ICUAP
POSGRADO EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**



INCIDENCIA Y PERSISTENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PERSONAS DE 18-35 AÑOS DE EDAD

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

QFB ENRIQUE RODRÍGUEZ ZITLALPOPOCA

ASESORA DE TESIS

D. C. LILIA CEDILLO RAMÍREZ

H. PUEBLA DE ZARAGOZA A 6 DE NOVIEMBRE 2015

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
Clasificación de los virus del papiloma	4
Genoma y estructura del virus	6
Proteínas virales	8
Proteína E1	8
Proteína E2	8
Proteína E4	9
Proteína E5	9
Proteína E6	11
Proteína E7	12
Proteína L1 y L2	14
Ciclo de replicación viral	15
Entrada del virus a la célula huésped	15
Mantenimiento del genoma	16
Fase proliferativa	17
Amplificación del genoma	17
Empaquetamiento del genoma viral y liberación del virus	18
Persistencia del virus	19
Factores de riesgo para la infección	20
Número de parejas sexuales	20
Fumar tabaco	20
Uso de anticonceptivos orales	21
Co-infecciones con otros agentes de transmisión sexual	21
Prevalencia de VPH oral y la historia natural	22
Factores de riesgo de VPH oral	22
Vacuna contra VPH	23
ANTECEDENTES	24
JUSTIFICACIÓN	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34

MATERIALES Y MÉTODOS	35
Criterios de inclusión y exclusión	35
Cuestionario	35
Toma de muestra de exudado faríngeo	36
Toma de muestra de exudado cervical	36
Validación de la muestra	36
Extracción de ADN	36
Cuantificación del ADN	36
PCR gen beta-globina	37
PCR con primer PGMY 09/11	38
Microarreglos	39
Secuenciación	40
Confirmación de VPH tipo 16	41
Confirmación de VPH tipo 18	42
Toma de muestra para tinción de Papanicolaou	43
DIAGRAMA DE TRABAJO	44
RESULTADOS	45
Resultados exudado faríngeo	45
Resultados exudado cervical	51
Resultados de distribución de tipos	57
Resultados de secuenciación	58
Infección múltiple por VPH	58
Confirmación del tipo 16 y 18	59
Resultados de persistencia	60
Resultados del Papanicolaou y asociación el con tipo de VPH	63
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	74
Carta de consentimiento informado	74
Cuestionario para VPH en cavidad oral	75
Aviso de confidencialidad	75
Cuestionario para VPH en órganos sexuales	76

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agencia internacional para la investigación del cáncer)
LCR	Long Control Region (Región larga de control)
MEC	Matriz extracelular
NIC	Neoplasia Cervical Intraepitelial
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Buffer fosfato salino)
PV	Papiloma Virus
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VLPs	Virus-like particles (Partículas similares al virus)
VPH	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

El virus del papiloma humano es el agente causal de una de las enfermedades de transmisión sexual más común alrededor del mundo, especialmente en países en vías de desarrollo, donde la prevalencia de la infección asintomática varía de 2 a 44%, dependiendo de la población y la región estudiada. Basándose en los datos que implica una infección cervical por VPH, el 90% de los casos tendrá un curso asintomático con una eliminación de la infección en 1 o 2 años, y el otro 10% tendrá la infección persistente y un aumento del riesgo del desarrollo de cáncer. Los tipos que son de alto riesgo incluyen al 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Los tipos de bajo riesgo incluyen al 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72 y 81. Hay tipos que aún no han sido clasificados por la IARC, que es la encargada de clasificarlos de acuerdo con datos recabados a nivel mundial, por lo tanto si aún no están clasificados no sabemos el comportamiento que puedan tener en cuanto a su capacidad para producir ciertas lesiones celulares.

El objetivo de este estudio fue determinar la distribución de los tipos y la persistencia del papiloma humano en personas de 18 a 35 años de edad.

Materiales y métodos: Se procesaron 125 muestras de exudado faríngeo (en hombres y mujeres) y 157 muestras de exudado cervical. Las muestras faríngeas y cervicales fueron obtenidas en la ciudad de Puebla, en pacientes de 18 a 35 años de edad entre los meses de junio 2014 a junio 2015. Para la detección del VPH se usó PCR punto final y para la tipificación la técnica de microarreglos, para confirmar los resultados de ciertas muestras se usó la técnica de secuenciación.

Después de analizar las 125 muestras faríngeas, ninguna muestra fue positiva a VPH, todas ellas amplificaron para el gen beta globina.

Para los resultados del estudio en cérvix, 63 pacientes de las 157 fueron positivas a VPH, dando un porcentaje del 40%, de una población de mujeres clínicamente sanas, de las cuales solo 5 fueron vacunadas contra VPH. El tipo 91 es el que se encontró con mayor frecuencia en 12 pacientes (8.4%), seguido por los tipos 90 y 56, en 11 pacientes (7.7%) cada uno, el tipo 52 en 10 pacientes (7%), el tipo 42 en 9 pacientes (6.3%) y el tipo 51 en 8 pacientes (5.6%). El tipo 16 se encontró en 7 pacientes (4.9%) y el tipo 18 en solo una paciente (0.7%). Los tipos 35, 68, 82, 11 y 72, que pueden ser detectados por el microarreglo utilizado, no estuvieron presentes en ninguna muestra analizada.

Conclusión: Actualmente existen dos vacunas contra VPH y una más que está próxima a salir que cubrirá hasta nueve tipos, pero si tomamos en cuenta que existen más de 200 tipos de VPH, aún estamos lejos de una completa protección. Está más que documentado que los tipos 16 y 18 son cancerígenos, pero aún se desconoce mucho de otros tipos, ya que son de reciente descripción, es por ello importante usar las nuevas tecnologías de biología molecular para realizar la detección y el seguimiento del comportamiento de estos virus. Este estudio aporta evidencias de que hay otros tipos con mayor frecuencia que los tipos 6, 11, 16 y 18. También se comprobó que hay pacientes desde los 20 años que ya presentan un NIC-1, esto importante ya que con esto se elimina la idea de que solo las mujeres mayores están en riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino.

INTRODUCCIÓN

El VPH es el agente causal de una de las enfermedades de transmisión sexual más común en el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo, donde la prevalencia de la infección asintomática varía de 2 a 44%, dependiendo de la población y la región estudiada (De Sanjosé y cols., 2007). Basándose en los datos que implica una infección cervical por VPH, el 90% de los casos tendrá un curso asintomático con una eliminación de la infección en 1 o 2 años, y el otro 10% tendrá la infección persistente y un aumento del riesgo de desarrollar cáncer (Zandberg y cols., 2013).

Los PV son ubicuos y se han detectado en una amplia variedad de animales, así como en los seres humanos, siendo específicos para su respectivo huésped; más de 200 tipos de VPH han sido reconocidos con base en secuencias de ADN que muestran diferencias genómicas, 85 tipos están bien caracterizados y unos 120 aislamientos se clasifican como posibles nuevos tipos (Burd., 2003). El doctor Harald Zur Hausen fue el primero en demostrar por medio de experimentos de hibridación, que las verrugas genitales y los tejidos de cáncer de cérvix contienen genomas del virus del papiloma humano (López-Saavedra y Lizano-Soberón., 2006).

Los tipos de VPH se refieren a menudo como de bajo o alto riesgo en función de su potencial para desarrollar cáncer. Los de alto riesgo incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Los de bajo riesgo causan lesiones más benignas que afectan a las áreas anogenitales, causando verrugas genitales (condilomas), neoplasia cervical intraepitelial y papilomas laríngeos. Estos incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72 y 81 (Zandberg y cols., 2013).

Clasificación de los virus del papiloma

El gen L1 es el mejor conservado dentro del genoma del VPH y por lo tanto se ha utilizado para la identificación de nuevos tipos de PV en los últimos 15 años. Un nuevo tipo de PV es reconocido como tal si el genoma completo ha sido clonado y la secuencia de ADN del gen L1 difiere en más de 10% del PV más cercano conocido. Las diferencias entre 2% y 10% de homología definen un subtipo y menos de 2% una variante. Esta definición fue acordada entre los científicos que trabajan en el diagnóstico y taxonomía de PV, en el taller de virus del papiloma celebrado en Quebec en 1995. La evolución del virus se ha debatido por años, utilizando los genes E6, E7 y L1 o las combinaciones de E6-E7-L1; sin embargo, han dado lugar a árboles filogenéticos que establecen relaciones similares o incluso idénticas. La comparación de secuencias entre los genomas completos de 118 PVs revela una gran diversidad entre los virus, pero se observa una distribución similar cuando se compran solo los ORF de L1, un cladograma basado en L1 de 96 VPH y 22 tipos de PV en animales se presenta en la figura 1 (De Villiers y cols., 2004).

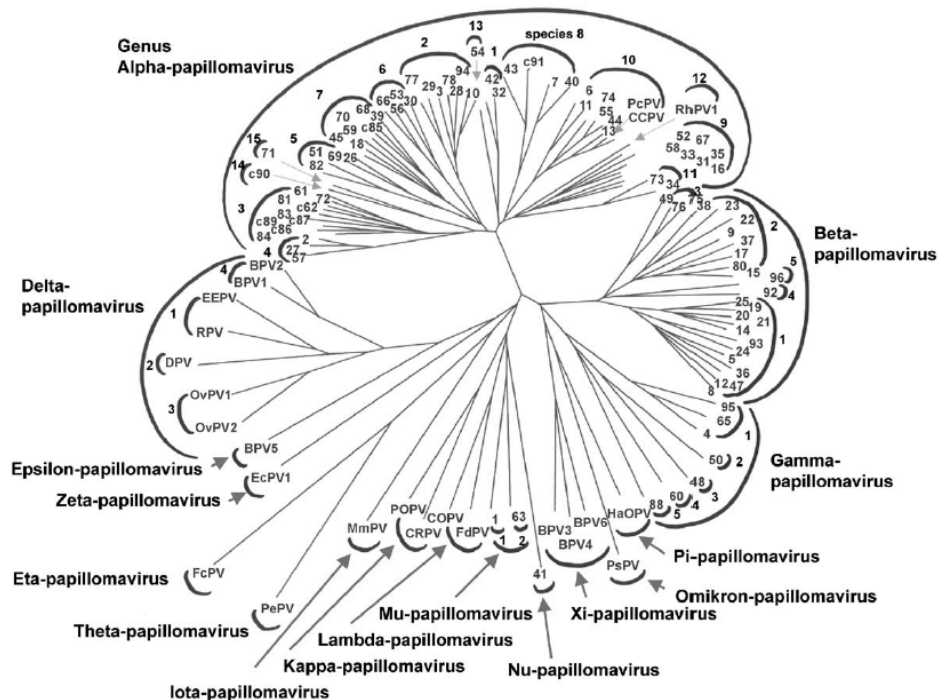


Figura 1. Árbol filogenético que contiene las secuencias de 118 tipos de virus del papiloma (De Villiers y cols., 2004).

La introducción del término "género" es útil, ya que este término reemplazará las expresiones un tanto vagas como "principales ramas" o "súper grupos". A lo largo de la biología, incluyendo la virología, géneros específicos normalmente unen a las especies, que están claramente relacionados filogenéticamente, pero a menudo biológicamente muy diversos. Lo mismo se aplica a los géneros PV. Las propiedades biológicas conocidas para cada género se presentan en la Tabla 1 (De Villiers y cols., 2004).

Género	Propiedad biológica
Alpha-papillomavirus	Lesiones cutáneas y mucosas en seres humanos y primates.
Beta-papillomavirus	Lesiones cutáneas en seres humanos en forma latente, que se activa en condiciones de inmunosupresión.
Gamma-papillomavirus	Lesiones cutáneas en humanos.
Delta-papillomavirus	Lesiones en los ungulados.
Epsilon-papillomavirus	Lesiones cutáneas en bovinos.
Zeta-papillomavirus	Lesiones cutáneas en los caballos
Eta-papillomavirus	Lesiones cutáneas en aves
Theta-papillomavirus	Lesiones cutáneas en aves
Iota-papillomavirus	Lesiones cutáneas en roedores
Kappa-papillomavirus	Lesiones cutáneas y mucosas en conejos
Lambda-papillomavirus	Lesiones cutáneas y mucosas benignas
Mu-papillomavirus	Lesiones cutáneas en humanos
Nu-papillomavirus	Lesiones cutáneas benignas y malignas en humanos
Xi-papillomavirus	Lesiones en bovinos
Omikron-papillomavirus	Aislado de las verrugas genitales en los cetáceos
Pi-papillomavirus	Aislado de hámster

Tabla 1. Propiedades biológicas del género papillomavirus (De Villiers y cols., 2004).

Genoma y estructura del virus

Los virus de VPH son relativamente pequeños, sin envoltura, que contienen un genoma de ADN circular de doble cadena, el ADN está asociado con proteínas *histone-like* y protegida por una cápside formada por dos proteínas L1 y L2. Cada cápside está compuesta de 72 capsómeros, cada uno de los cuales se compone de cinco unidades monoméricas de 55 kDa que se unen para formar un pentámero que está constituido por la proteína principal de la cápside que es la L1. Los pentámeros de L1 se distribuyen formando una red de interacciones disulfuro intra e inter pentamérica que sirve para estabilizar la cápside. Además de la proteína L1, la cápside está formada por la proteína L2 con aproximadamente 75 kDa, esta proteína se encuentra dentro del virión. Así, cada virión contiene 72 capsómeros de L1, el componente principal de la cápside y un número variable de copias de L2, un componente secundario de la cápside viral, formando una partícula con simetría icosaédrica y con aproximadamente 50 a 60 nm de diámetro, en la figura 2 se muestra la estructura del VPH (Conway y Meyers., 2008).

Los genomas virales de todos los tipos de VPH tienen 8 marcos de lectura abiertos. Estos ORFs se expresan a partir de ARNm policistrónico que se transcribe a partir de una sola cadena de ADN. Los 8 ORFs son divididos en genes tempranos y genes tardíos, el genoma también cuenta con una región no codificante llamada LCR. Los ORFs tempranos codifican las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Los ORFs tardíos codifican para las proteínas L1 y L2 que forman parte de la cápside. El genoma del VPH tipo 16, que es el más estudiado se muestra en la figura 3 (Schiffman y cols., 2007).

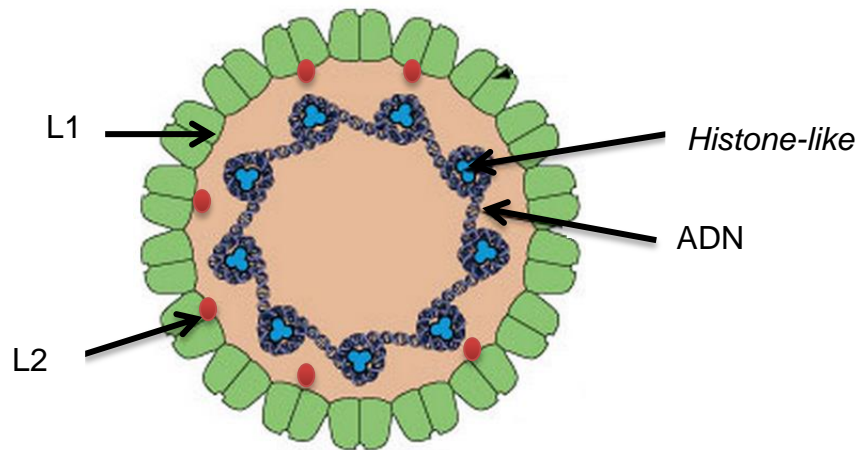


Figura 2. Estructura de HPV (viralzone.expasy.org/all_by_species/5.html).
Modificada.

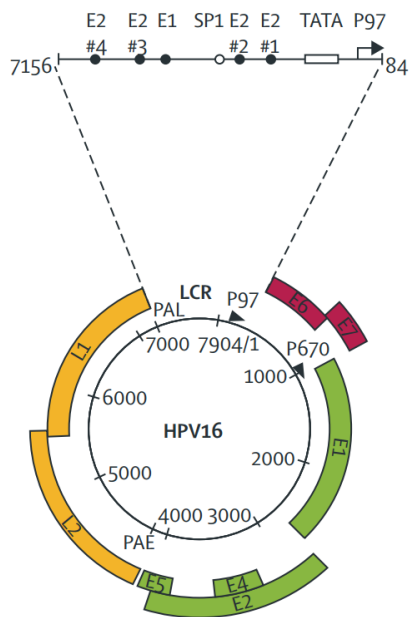


Figura 3. Genoma del VPH tipo 16 (Schiffman y cols., 2007).

Proteínas virales

Proteína E1

E1 representa una de las proteínas mejor conservada entre los diferentes tipos de VPH. Tiene funciones de unión al ADN y un sitio de unión en el origen de replicación localizada en LCR. Se ensambla en un complejo hexamérico, ayudado por la proteína E2, el complejo formado tiene actividad de helicasa que inicia la apertura bidireccional del ADN, elemento necesario para la replicación del ADN viral (Wilson y cols., 2002). El dominio carboxilo tiene actividad helicasa/ATPasa la cual es necesaria y suficiente para la oligomerización. Este dominio también interactúa con la proteína E2 y la subunidad p70 de la polimerasa de ADN. Un segmento de aproximadamente 160 residuos de aminoácidos río arriba del dominio helicasa/ATPasa es el dominio de unión al ADN (White y cols., 2003).

Proteína E2

El ORF de E2 da lugar a múltiples productos génicos mediante *splicing* del ARN, las proteínas derivadas del gen E2 están implicadas en el control de la transcripción viral, la replicación del ADN y la segregación de los genomas virales. Puede unirse a los factores en la cromatina mitótica y unir el genoma viral al genoma del huésped durante la mitosis, esto contribuye a la coordinación de la replicación del ADN del VPH con el cromosoma de la célula huésped, requisito importante para la persistencia del ADN del virus en las células basales no diferenciadas (McPhillips y cols., 2006).

En lesiones que tiene el VPH de forma episomal, la proteína E2 reprime la expresión de genes tempranos como un mecanismo para regular el número de copias. Además, se ha reportado que las proteínas E2 son capaces de reprimir la actividad del promotor de telomerasa mediada por la proteína E6. La integración del genoma en el cromosoma de las células hospederas usualmente interrumpe la expresión de E2, causando una desregulación de varios genes entre ellos E6 y E7, este evento puede ser favorable para la transformación de las células del huésped y la transición a un estado maligno (Romanczuk y Howley., 1992).

Proteína E4

A pesar de ser considerada una proteína temprana, se encuentra exclusivamente en las capas diferenciadas del epitelio infectado. Aunque su expresión se produce en las células altamente diferenciadas que expresan los genes de la cápside y sintetizan nuevos viriones, no se encuentra en partículas de virión. E4 no se requiere para la transformación o la persistencia episomal de ADN viral, pero interactúa con las redes de queratina y provoca su colapso (Doorbar y cols., 1991).

Se ha sugerido que puede tener un papel importante en favorecer y apoyar la amplificación del genoma, además de regular la expresión de genes tardíos, el control de la maduración del virus y facilitar la liberación de viriones. También interactúa y altera la organización de los filamentos intermedios. El papel de E4 en la liberación de virus está soportado por la asociación con la envoltura córnea celular, una estructura altamente resistente debajo de la membrana plasmática de los queratinocitos diferenciados en el estrato córneo (Longworth y Laimins., 2004).

Proteína E5

Es un pequeño péptido hidrófobo, de aproximadamente 83 aminoácidos de tamaño que se localiza principalmente en el retículo endoplásmico. Cuando se expresa solo tiene débiles propiedades oncogénicas. Pero en los ensayos de cultivo de tejidos, E5 puede mejorar la actividad transformadora de E6 y E7, lo que sugiere que puede tener un papel de apoyo en la progresión tumoral. La localización en el retículo endoplásmico sugiere que su actividad puede estar relacionada con el tráfico de proteínas de la membrana citoplásmica a través de este compartimento celular. Se ha reportado que E5 puede alterar la actividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), además de reducir los niveles de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, la modulación de la vía de las MAP cinasas (MAPK) y la alteración de los niveles de caveolina (Moody y Laimins., 2010).

La inducción de la hiperproliferación por la proteína E7 desencadena la apoptosis, que está bloqueada por la acción de la proteína E6. Las acciones de cooperación de E6 y E7 immortalizan de manera eficiente las células y este proceso se ve aumentado por la acción de la proteína E5. La capacidad de E6 y E7 para dirigir reguladores cruciales de la proliferación, apoptosis, immortalización y estabilidad genómica promueve colectivamente la aparición de una población clonal de células con una ventaja de crecimiento y una mayor propensión para la transformación y progresión maligna, el mecanismo se muestra en la figura 4 (Moody y Laimins., 2010).

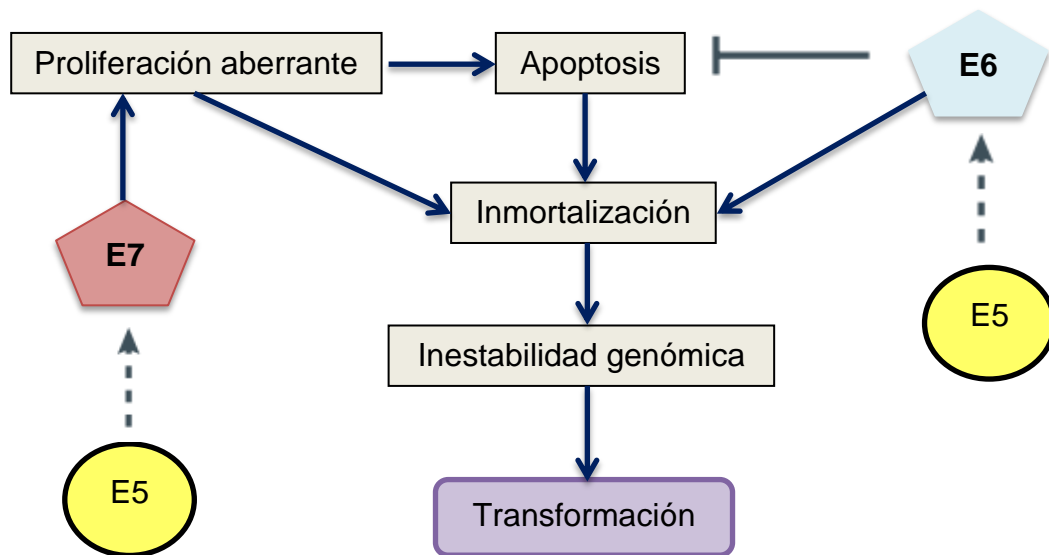


Figura 4. Mecanismos moleculares por los cuales las oncoproteínas de VPH cooperan para inducir la carcinogénesis cervical (Moody y Laimins., 2010).

Proteína E6

La proteína E6 está formada por aproximadamente 150 aminoácidos y contiene dos dedos “zinc-like” unidos por un interdominio de 36 aminoácidos. Una de las interacciones mayormente estudiadas de la proteína E6 es con la proteína supresora de tumores p53, proteína celular que es encargada de la coordinación tras el estrés genotóxico o citotóxico, p53 normalmente está presente en bajos niveles, el daño celular desencadena un aumento en los niveles de p53. Entre las funciones de p53 está iniciar las vías de reparación de ADN, la detección del ciclo celular y si el daño es mayor, tiene la función de inducir la apoptosis. La importancia de p53 en dirigir una respuesta celular hacia el agente citotóxico se puede ver ya que aproximadamente la mitad de todos los cánceres humanos tiene mutaciones en p53 (Howie y cols., 2009). El principal mecanismo por el cual los tipos de alto riesgo de VPH inactivan a p53 es mediante la inducción de su degradación a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma, el mecanismo por el cual se lleva a cabo se muestra en la figura 5 (Thomas y cols., 1999).

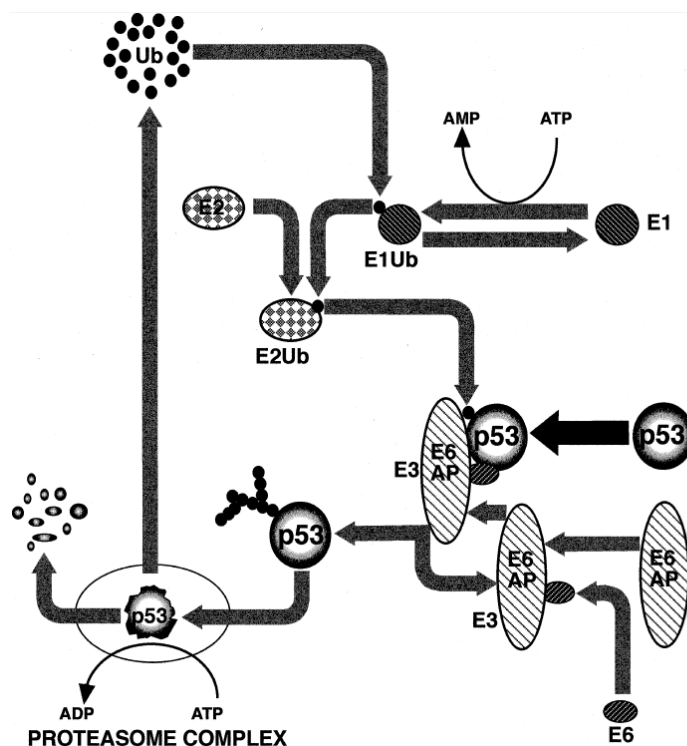


Figura 5. Mecanismo por el cual la proteína E6 induce la degradación de p53 (Thomas y cols., 1999).

Otra función de la proteína E6 de los VPH de alto riesgo que es importante para la immortalización, es su capacidad para activar la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa. La actividad de la telomerasa se encuentra normalmente en las células embrionarias y está ausente en las células somáticas, en cada ciclo de división los telómeros se acortan, con el tiempo se produce inestabilidad cromosómica y senescencia. Sin embargo, en los VPH de alto riesgo se ha demostrado que se mantienen los telómeros a través de la acción de la telomerasa. Curiosamente, la sobre expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa junto con E7 es suficiente para immortalizar a los queratinocitos primarios humanos. Hay poca información sobre la actividad de la proteína E6 en los VPH de bajo riesgo con la actividad de la telomerasa (Hamid y cols., 2009).

Proteína E7

Tiene alrededor de 100 aminoácidos de longitud y contiene tres regiones conservadas, induce la proliferación celular mediante la unión a varios factores celulares, la interacción mejor caracterizada es con la proteína supresora de tumores Rb y miembros de la familia como p107 y p130. Las actividades de supresión de crecimiento de pRb y las proteínas relacionadas pocket p107 y p130 están mediadas por miembros de la familia E2F de factores de transcripción. En G0/G1 pRb hiperfosforilado está unido a E2F. Dado que pRb tiene un dominio represor transcripcional, el complejo pRB/E2F funciona como un represor transcripcional. Después de la fosforilación por quinasas dependientes de ciclina en G1, el complejo pRB/E2F se disocia y E2F actúa como activador transcripcional. Dado que los objetivos transcripcionales de E2F incluyen muchas proteínas que codifican enzimas que son importantes para la entrada a la fase S, la actividad de E2F representa un aspecto importante en la progresión de G1/S. La desregulación de esta red por la proteína E7 de los virus de alto riesgo contribuye a la actividad de transformación de esta oncoproteína viral.

En el caso de la interacción E7/pRB, E7 desestabiliza a pRB dando la señal para activar la proteólisis a través de un mecanismo que implica el proteosoma. E7 codificado por virus de alto riesgo y bajo riesgo que son muy diferentes tanto en propiedades bioquímicas y biológicas. E7 de bajo riesgo se une a pRB con baja eficiencia a diferencia de los virus de alto riesgo que la unión es más estable (Münger and Howley., 2002). Se ha sugerido un mecanismo por el cual la proteína E7 viral induce tumores, el cual se muestra en la figura 6 (Yim and Park., 2005).

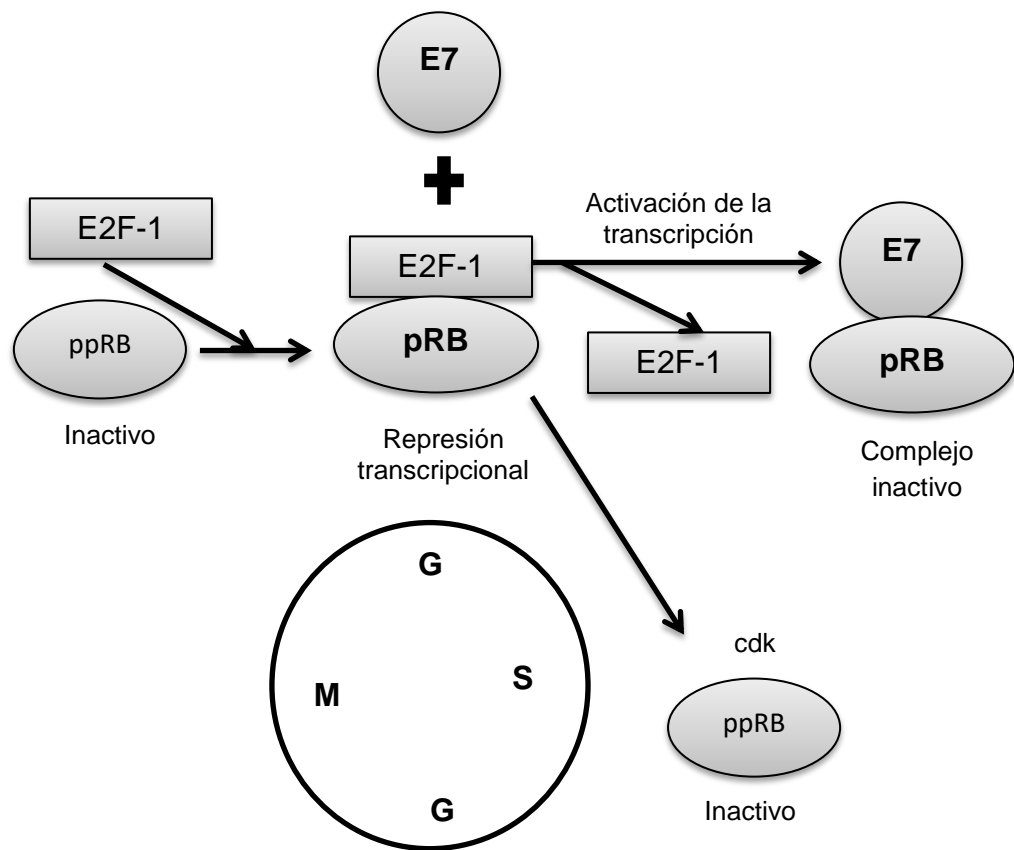


Figura 6. Mecanismo por el cual la proteína E7 inactiva a pRB (Yim and Park., 2005).

Proteína L1 y L2

Se ha reportado que las proteínas presentan actividad de unión al ADN *in vitro*, en donde ambas proteínas de la cápside tienen la capacidad de ayudar en el proceso de encapsidación del genoma mediante la unión directa al ADN sin que tenga una secuencia específica. Esta región putativa de unión al ADN conserva secuencias cortas de residuos básicos cargados positivamente que se encuentran en el extremo carboxilo terminal de L1 y en el extremo amino y carboxilo terminal del L2. La región de unión al ADN de L1 en el VPH tipo 33 es necesaria para la encapsidación del ADN. La delección ya sea de N-terminal o C-terminal en las regiones de unión al ADN en el virus de papiloma bovino tipo1, no tuvo impactos sobre la encapsidación del virus pero los viriones no fueron infecciosos. Sin embargo, el impacto de la eliminación de los dominios de unión de ADN en ambos extremos no se ensayó debido a que estos dominios también pueden funcionar como señales de localización nuclear, complicando la interpretación de los datos (Wang y Roden., 2013).

El virión puede acomodar hasta 72 proteínas de L2. Aunque L2 solamente está expuesta mínimamente en la superficie del virión maduro, emerge del virión durante el proceso de entrada de la infección. Estudios mediante microscopia electrónica de transmisión comparando las VLPs L1 y L1-L2 de VPH tipo 16, reveló que una parte de L2 se encuentra dentro del lumen del capsómero. El punto o puntos a través del cual L2 emerge a la cápside y L1 durante la maduración y la entrada en la infección siguen siendo desconocidos (Bucka y cols., 2013).

Ciclo de replicación viral

Entrada del virus a la célula huésped

El virus penetra a las células del epitelio a través de microabrasiones y así accede a las capas basales. Éstas son las únicas células del epitelio capaces de dividirse, por lo que constituyen el blanco obligado del virus que intenta inducir lesiones proliferativas en las que pueda persistir (Münger y cols., 2004) (Evander y cols., 1997). La entrada del virus a las células del huésped se inicia mediante la unión de partículas virales a los receptores celulares como se muestra en la figura 7. Se ha sugerido que los viriones se unen inicialmente a la membrana basal antes de la transferencia a la superficie celular de los queratocitos basales. Todo apunta a que los proteoglicanos de heparán sulfato son los receptores de VPH, estas moléculas están en la MEC de muchos tipos celulares por lo tanto están involucradas en varias funciones biológicas y debido a su ubicación son moléculas adecuadas para la infección viral. Otro receptor que se ha identificado en la MEC es la laminina-5; sin embargo, la interacción con este receptor parece ser de menor importancia para una infección productiva. El receptor $\alpha 6$ -integrina se ha sugerido como receptor secundario aunque su aceptación aun es bastante controversial (Horvath y cols., 2010). La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina o caveolina. El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, se permite el transporte del ADN viral al núcleo de esta (Day y cols., 2003) (Horvath y cols., 2010).

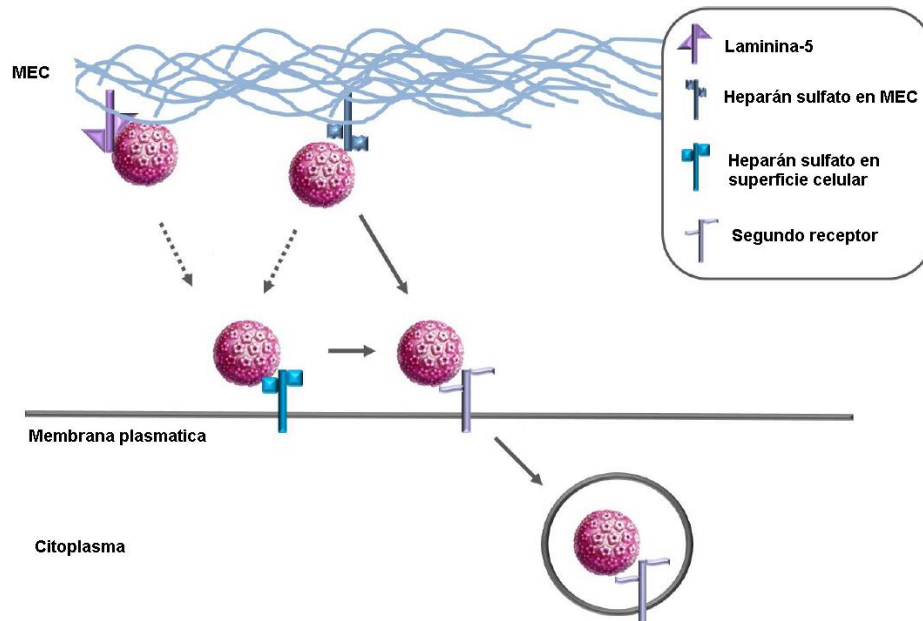


Figura 7. Modelo putativo de la interacción de cápsides de VPH con la MEC y la superficie celular (Horvath y cols., 2010).

Mantenimiento del genoma

Después de que el virus penetra a la célula, existe un período extremadamente variable, entre 1 a 8 meses, conocido como latencia. El virus está presente en las células pero no manifiesta ningún signo citopático. El genoma viral se replica sólo cuando la célula basal infectada se divide; lo hace en forma autónoma y se distribuye homogéneamente en las células hijas, manteniendo un bajo número de copias de 10 a 200 por célula y de forma episomal (Wilson y cols., 2002). El patrón de expresión génica viral en estas células no está bien definido, pero se cree generalmente que las proteínas E1 y E2 virales se expresan a fin de mantener el ADN viral como un episoma y para facilitar la segregación correcta de los genomas durante la división celular (Doorbar., 2005).

Fase proliferativa

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. A medida que el epitelio se va diferenciando, el virus inicia la expresión de los genes tardíos en las capas intermedias y superficiales, mediante la síntesis de las proteínas de la cápside viral. El ensamblado de los genomas y las cápsides da lugar a las partículas virales completas o viriones, por lo que esta forma de infección es altamente transmisible. El VPH no mata a la célula que infecta, por el contrario, convive con ella mientras va ocurriendo la maduración natural del epitelio, el virus se va multiplicando. Finalmente, la descamación de estas células que contienen viriones de VPH sirve como vector de transmisión de la infección. La infección productiva se manifiesta morfológicamente con la aparición de los signos citopáticos característicos del HPV (coilocitosis, hiperplasia, acantosis, disqueratosis, etc.) y clínicamente con el desarrollo de las lesiones proliferativas (Doorbar y cols., 1991).

Amplificación del genoma

Para la producción de viriones infecciosos, el virus debe amplificar su genoma y empaquetarlo en partículas infecciosas. Para los tipos 16, 11 y 2 esto ocurre en la capa epitelial media o superior, a raíz de un aumento de la actividad del promotor tardío. El promotor tardío reside dentro del marco de lectura abierto E7 y se piensa que su regulación conduce al aumento de la expresión de proteínas implicadas en la replicación del ADN viral (es decir, E1, E2, E4 y E5) sin afectar directamente la expresión de E6 y E7. La amplificación de genomas virales comienza en un subconjunto de células en el compartimiento proliferativo y requiere la expresión de todos los productos de los genes tempranos virales incluyendo E4 y E5. La unión de E2 a la región reguladora río arriba de VPH es necesario para la replicación del ADN viral y recluta la ADN helicasa E1 al origen viral de replicación. El montaje del complejo de iniciación de E1/E2 en el origen de replicación viral es el inicio de la replicación de los genomas virales.

Durante todo el ciclo del virus, los niveles relativos de diferentes proteínas virales son controlados por el uso de un promotor con un aumento en el nivel de E1 y E2 que permite un aumento en el número de copias virales en las capas epiteliales superiores. Los modelos actuales sugieren que un modesto aumento en la activación del promotor durante la diferenciación puede conducir a un aumento en el nivel de E1 y E2 (también E4 y E5) y un posterior aumento en el número de copias del genoma (Doorbar y cols., 1991).

Empaquetamiento del genoma viral y liberación del virus

La finalización del ciclo de replicación del virus implica la expresión de la proteína L2, la salida de la célula del ciclo celular y la expresión de la proteína principal de la cápside la proteína L1, para permitir el empaquetamiento del genoma. La encapsidación del genoma implica el reclutamiento de L2 a las regiones de replicación a través de E2, antes de la expresión de L1 y el ensamblaje de la cápside icosaédrica en el núcleo. La maduración se produce en los queratinocitos que mueren en las capas más superficiales del epitelio, que pierden la fosforilación oxidativa mitocondrial y se convierten en un ambiente oxidante justo antes de la liberación del virus. Esto permite la acumulación de enlaces disulfuro entre las proteínas L1, lo que lleva a la producción de viriones infecciosos extremadamente estables. Aunque no está definido con precisión, se piensa que la abundancia de la proteína E4 puede contribuir con la liberación de los viriones (Doorbar y cols., 2012).

Persistencia del virus

La persistencia es un estado latente que requiere el mantenimiento del genoma viral en la célula infectada, ya sea como un episoma o integrado en el ADN de la célula huésped. Persistencia en ausencia de enfermedad clínica no excluye necesariamente actividades víricas necesarias para el mantenimiento del genoma, tales como la replicación del genoma viral de bajo nivel y la producción de proteínas virales. El conejo de rabo blanco fue uno de los primeros modelos para estudiar la persistencia, en este sistema, la inoculación en la piel de conejo con altas concentraciones de virus conduce rápidamente a la formación de grandes papilomas. Por el contrario, la inoculación con bajas concentraciones de virus no conduce a la formación de papiloma, aunque el ADN viral puede ser detectado en el sitio de inoculación hasta 18 semanas después de la infección (Maglennon y Doorbar., 2012).

Aunque la infección por VPH de alto riesgo es común, el cáncer de cuello uterino se presenta sólo en raras ocasiones como resultado de la infección. La mayoría de las infecciones se eliminan como resultado de una respuesta inmune mediada por células y no persisten el tiempo suficiente para la expresión génica desregulada y la acumulación de errores genéticos. VHP 16 tiene una longitud media de persistencia que es mayor a la de otros, esto puede contribuir a su mayor riesgo de cáncer. Estudios recientes han sugerido que la infección de células específicas en la región de la unión entre el endo y exocérvix puede ser la base del desarrollo de muchos tipos de cáncer de cuello uterino. La mayoría de las personas que desarrollan lesiones benignas finalmente montan una efectiva respuesta inmune y las lesiones van retrocediendo. La regresión de verrugas ano-genitales es acompañada por una respuesta por linfocitos T CD4+. El fracaso para desarrollar una inmunidad mediada por células para eliminar o controlar la infección, da como resultado una infección persistente y en el caso de los VPH oncogénicos un aumento en la probabilidad de progresión a una neoplasia cervical intraepitelial o carcinoma invasivo. Las primeras etapas del ciclo viral son exclusivamente intraepiteliales por lo tanto no hay viremia, citólisis, muerte celular ni inflamación (Doorbar y cols., 2012).

Factores de riesgo para la infección

Número de parejas sexuales

El principal factor de riesgo para la infección, es el mayor número de parejas sexuales, tanto en mujeres como en hombres. Un intervalo de tiempo más corto entre conocer a una nueva pareja y tener relaciones sexuales también aumenta el riesgo de infección por VPH en mujeres. Un estudio reciente de la infección por VPH en mujeres adolescentes encontró que cuando el hombre es 1.5 años mayor que ella, aumenta el riesgo en infectarse, probablemente atribuible a la relación entre el aumento de la edad de la pareja masculina y un mayor número de parejas sexuales (Baseman y Koutsky., 2005).

Fumar tabaco

La IARC ha clasificado el tabaquismo como causa de cáncer cervical. La colaboración internacional de estudios epidemiológicos de cáncer de cuello uterino encontró que las fumadoras actuales, tiene un riesgo significativamente mayor de desarrollar carcinoma de células escamosas de cuello uterino en comparación con las no fumadoras (Riesgo relativo = 1.60; 95% intervalo de confianza). En las fumadoras actuales, el riesgo aumenta con el número de cigarrillos por día (riesgo relativo= 1.98; intervalo de confianza del 95%, 1.78-2.21 por 15 o más cigarrillos por día versus ninguno). Los posibles mecanismos para el efecto del tabaquismo incluyen una reducción de la respuesta inmune en el cuello uterino, los efectos relacionados con el metabolismo de las hormonas femeninas y daño genético directo causado por sustancias cancerígenas relacionadas con el tabaco (Muñoz y cols., 2006).

Uso de anticonceptivos orales

La reciente monografía de la IARC clasificó a la combinación de estrógenos-progestágenos como cancerígenos en el cuello del útero. Un meta-análisis de cáncer de cuello uterino y los anticonceptivos hormonales, encontró que el riesgo de cáncer de cuello uterino invasor aumenta en relación directa con la duración del uso de anticonceptivos orales, de tal manera que 10 años de su uso se asocia con aproximadamente el doble de riesgo en comparación con los no usuarios. Los limitados datos disponibles sugieren que este riesgo disminuye después de que se suspende la administración de los anticonceptivos orales, pero el riesgo sigue siendo significativamente elevado aun cuando hayan pasado más de ocho años. El uso prolongado de anticonceptivos orales es un factor de riesgo, ya que se ha demostrado que la LCR en el genoma del virus, contiene elementos de respuesta a hormonas esteroidales como la progesterona (Muñoz y cols., 2006).

Co-infecciones con otros agentes de transmisión sexual

Los agentes infecciosos de transmisión sexual más estudiados para establecer una relación con el cáncer cervical han sido el virus del herpes simple tipo 2, *Chlamydia trachomatis* y el VIH. Los individuos con inmunosupresión causada por la infección con VIH o trasplante de órganos tienen un mayor riesgo de cánceres ano-genitales asociados al VPH en comparación con individuos heterosexuales sanos de la misma edad. Las mujeres VIH positivas han demostrado estar en un mayor riesgo de cáncer cervical en comparación con sus contrapartes VIH negativas. Esta asociación parece ser más fuerte para las mujeres con un bajo recuento de los linfocitos T/CD4. Las mujeres infectadas con el VIH/VPH tienen un mayor riesgo de lesiones intraepiteliales escamosas que las mujeres infectadas con cualquiera de los dos virus por separados. Los hombres y las mujeres infectados por el VIH presentan mayores tasas de incidencia de la infección anal por VPH y cáncer anal (Muñoz y cols., 2006).

Prevalencia de VPH oral y la historia natural

Si bien es claro que el VPH es una causa importante de cáncer orofaríngeo, los factores de riesgo para la infección por VPH oral y la historia natural de la infección no son bien comprendidos. La infección oral es poco frecuente con tasas de menos de 1% de prevalencia en niños. La adquisición del VPH parece aumentar en torno a la edad del inicio de la vida sexual, estudios en adolescentes encontraron una prevalencia de 1.5% en adolescentes de 12 a 15 años de edad y de 3.3% en adolescentes de 16 a 20 años (Smith y cols., 2007). Los estudios sugieren que la persistencia oral es similar a la conocida por la infección anogenital y que las infecciones más prevalentes se eliminan dentro de un año sin necesidad de tratamiento. Se necesita más investigación longitudinal para comprender mejor la transmisión de infecciones de VPH oral, cómo las infecciones son eliminadas y qué factores se asocian con la persistencia (D'Souza y cols., 2007).

Factores de riesgo de VPH oral

La prevalencia del VPH oral se asocia consistentemente con la práctica de sexo oral con un mayor número de parejas; sin embargo, se necesitan mayores estudios para entender qué tan común es la transmisión y si el VPH se puede transmitir a la boca por otros medios. Actualmente no está claro si el VPH se puede transmitir por besos (beso francés) por lo tanto hacen falta mayores estudios. La infección oral es poco común en los niños incluyendo los nacidos de mujeres con infección vaginal por VPH. Se sugiere que la auto inoculación de la infección de un sitio a otro dentro de los mismos individuos es poco común; sin embargo, un estudio encontró que la infección oral por VPH persistente en las madres se asoció con un mayor riesgo de infección oral por VPH persistente en sus hijos, lo que sugiere que puede ocurrir la transmisión no sexual. Las parejas de las mujeres con cáncer de cuello uterino también tienen una mayor incidencia de cáncer de amígdalas que la población general, apoyando de nuevo la posibilidad de transmisión de una mujer infectada a la cavidad orofaríngea de su pareja a través del coito oral (D'Souzaa y Dempseyb., 2011) (Chung y cols., 2014).

Vacuna contra VPH

Las vacunas para prevenir la infección con el virus del papiloma humano son las primeras desarrolladas específicamente para prevenir un cáncer humano. Cuando se expresa *in vitro* el ORF L1 en células eucariotas, la proteína que se produce es de aproximadamente 55 kDa, esta se auto ensambla para formar los VLPs. Estos VLPs semejan el virus nativo inmunológicamente y administrado con o sin adyuvante, puede inducir anticuerpos neutralizantes para el tipo del virus correspondiente.

Dos vacunas profilácticas contra el VPH utilizando VLPs de L1 como inmunógenos están autorizadas actualmente en la mayoría de países de todo el mundo. Una vacuna bivalente incorpora los dos VPH responsables de aproximadamente el 70% del cáncer cervical (HPV16 y HPV18) y una vacuna tetravalente además incorpora HPV 6 y HPV 11 que juntos son responsables de aproximadamente el 90% de las verrugas genitales.

La vacuna tetravalente se potencia con hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo. La vacuna bivalente se potencia con hidróxido de aluminio y monofosforil lípido A, una endotoxina modificada y agonista de los receptores *Toll-like receptor 4*, por lo tanto esta vacuna produce un título mayor de anticuerpos (Frazer y cols., 2011). Actualmente ya existe la vacuna nonavalente, que protegerá contra los tipos 16, 18, 31, 33, 45, 52 58, 6 y 11. En la figura 8 se muestra el proceso para la producción de las vacunas para VPH.

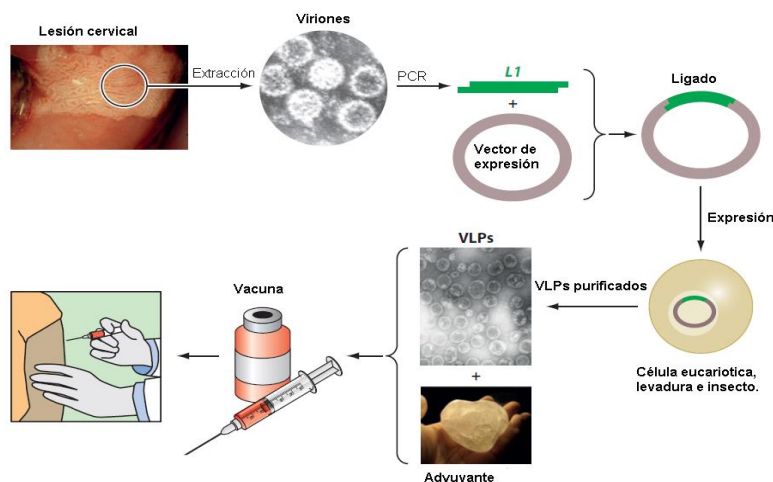
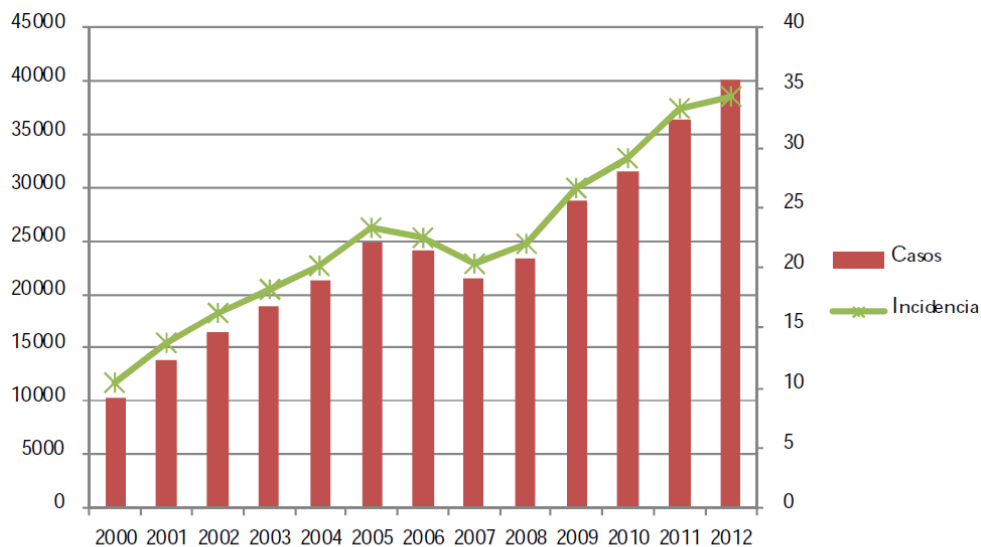


Figura 8. Producción de vacunas a partir de VLPs (Frazer y cols., 2011).

ANTECEDENTES

La incidencia del VPH en los últimos años ha cambiado, los datos que a continuación se presentan son producto de diversos trabajos de investigación realizados en México.

Para conocer el comportamiento del VPH se realizó un análisis estadístico de 13 años (2000 -2012), la información se obtuvo del sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, en la gráfica 1 se observa un incremento notable, en el 2000 la incidencia fue de 10.44 (10 393 casos) mientras que para el 2012 la incidencia fue de 34.31 (40106 casos) por cada 100 000 habitantes (Boletín epidemiológico, semana 16).



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

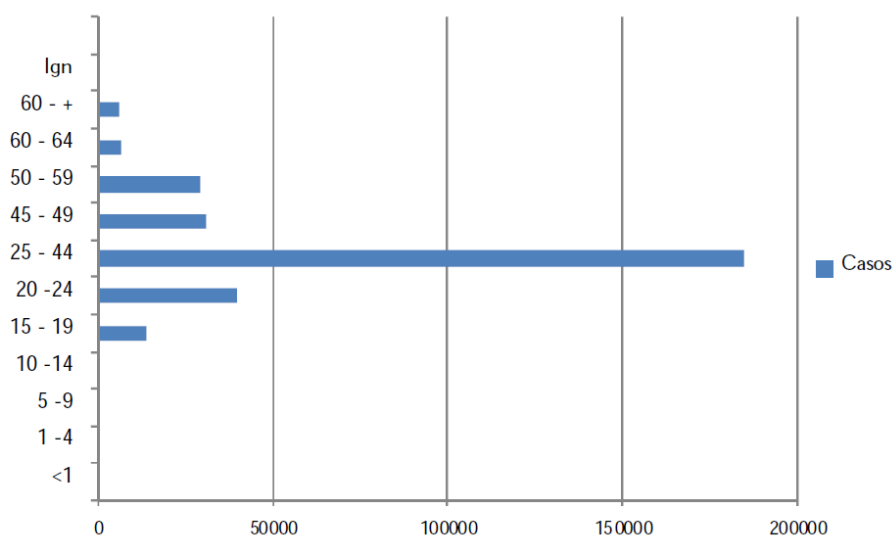
Gráfica 1. Comportamiento del virus del papiloma humano en el periodo 2000-2012, población general, México.

El cuadro 1 y la gráfica 2, muestran el número de casos de VPH por grupos de edad en el periodo de 2000-2012. Se muestra el análisis de datos en donde los mayores grupos de riesgo son de 25 a 44 años con 184,949 y el de 20 a 24 años con 39,351.

Grupo de edad	Casos
<1	23
1 -4	84
5 -9	99
10 -14	348
15 - 19	13 958
20 -24	39 351
25 - 44	184 949
45 - 49	30 731
50 - 59	29 477
60 - 64	6 682
60 - +	5 869
Ign	89
Total	311 660

FUENTE: SINAVE/DGE/SSA.

Cuadro 1. Casos por grupo de edad, del virus del papiloma humano, población general 2000-2012.



FUENTE: SINAVE/DGE/SSA.

Gráfica 2. Casos por grupo de edad del virus del papiloma humano, población general 2000-2012.

A partir del 2003 en México el sistema de información incluyó al sexo masculino en el reporte de VPH. En el cuadro 2 y 3 se muestran los casos por año del virus del papiloma humano tanto en población femenina como masculina del 2003 a 2012.

Año	Casos	Incidencia
2003	18142	34.64
2004	20554	38.81
2005	24008	44.86
2006	23212	42.92
2007	20526	38.21
2008	22365	41.25
2009	27400	50.09
2010	30 249	54.83
2011	34 885	62.71
2012	38 611	64.55
Total	259952	-

FUENTE: SINAVE/DGE/SSA.

Cuadro 2. Casos por año del virus del papiloma humano, población femenina 2003-2012.

Año	Casos	Incidencia
2003	851	1.64
2004	812	1.55
2005	772	1.46
2006	919	1.72
2007	1013	1.95
2008	1053	2.01
2009	1334	2.52
2010	1 268	2.38
2011	1 448	2.70
2012	1 495	2.62
Total	10 995	-

Cuadro 3. Casos por año del virus del papiloma humano, población masculina 2003-2012.

Piña-Sánchez y colaboradores en el 2006, analizaron la prevalencia de los tipos de VPH y determinaron su asociación con lesiones cervicales en la población Mexicana. Analizaron muestras de exudados cervicales normales, con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, de alto grado y con cáncer cervicouterino. La tipificación la realizaron por secuenciación. Detectaron 11 tipos de alto riesgo, 4 tipos de bajo riesgo, 3 no determinados y 2 probablemente de alto riesgo. En los exudados cervicales normales estuvo presente el VPH en el 12%, en la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado estuvo presente en 57%, en la de alto grado estuvo presente en 88% y en muestras de cáncer el VPH se presentó en 92%. El tipo 16 estuvo presente en 6 pacientes y el 18 en una paciente, todas ellas con citología normal. En pacientes con citología normal no se encontraron los tipos VPH 31, 35, 33, 67, 39, 53, 56 y 11. Los tipos con mayor prevalencia en las pacientes con cáncer fueron 16 y 18, con 78 y 5 pacientes respectivamente. En la tabla 2 se muestra la prevalencia de tipos virales de VPH en mujeres mexicanas con lesiones cervicales (Piña-Sánchez y cols., 2006).

Sp	Type	EC	Normal, n (%)	LGSIL, n (%)	HGSIL, n (%)	CC, n (%)	Total
	16	HR	6 (3.8)	24 (25.3)	25 (42.2)	78 (72.22)	133
	31	HR	0 (0)	4 (4.2)	2 (3.4)	2 (1.9)	8
	35	HR	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	1 (0.9)	2
	52	HR	2 (1.3)	1 (1.1)	2 (3.4)	0 (0)	5
	58	HR	1 (0.6)	5 (5.3)	11 (18.6)	2 (1.9)	19
	33	HR	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)	1 (0.9)	2
	67	ND	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	1
A9			9 (5.6)	35 (36.8)	42 (71.1)	84 (77.7)	170
	18	HR	1 (0.6)	4 (4.2)	4 (6.7)	5 (4.6)	14
	45	HR	2 (1.3)	4 (4.2)	1 (1.7)	1 (0.9)	8
	59	HR	3 (1.9)	2 (2.1)	0 (0)	2 (1.9)	7
	70	LR	2 (1.3)	2 (2.1)	0 (0)	0 (0)	4
	39	HR	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)	1 (0.9)	2
A7			8 (5.0)	12 (12.6)	6 (10.16)	9 (6.5)	38
	66	PHR	1 (0.6)	1 (1.1)	1 (1.7)	0 (0)	3
	53	PHR	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.9)	2
	56	HR	0 (0)	4 (4.2)	2 (3.4)	0 (0)	6
A6			1 (0.6)	5 (5.2)	3 (5.08)	2 (1.9)	11
A10	11	LR	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)	1
A10	6b	LR	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.8)	3
A11	73	ND	1 (0.6)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	2
A5	69	ND	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)	1
A3	CP8304	LR	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)	1
Other			1 (0)	2 (2.1)	1 (0)	4 (0.9)	8
Positive			19 (11.9)	54 (56.8)	52 (88.1)	99 (91.6)	224
Total			159 (100)	95 (100)	59 (100)	108 (100)	421

Sp, species; EC, epidemiologic classification; HR, high risk; LR, low risk; PHR, probably high risk; ND, not determined.

Tabla 2. Prevalencia de tipos virales de VPH en mujeres mexicanas con lesiones cervicales.

Velázquez-Márquez y colaboradores en el 2009, determinaron la prevalencia de VPH de los tipos 6, 11, 16, 18 y 31 en mujeres mexicas de una zona rural en Puebla, México. Los resultados se muestran en la tabla 3, solo se encontraron 2 pacientes con citología normal positivas para el tipo 16 y 18. Los tipos de mayor prevalencia en las pacientes con cáncer fueron el tipo 16 con seis pacientes y el 18 con una paciente (Velázquez-Márquez y cols., 2009).

Cytological diagnosis	No. of samples	HPV16	HPV18	HPV31	HPV6	HPV11
Normal ^a	34	2 (5.9)	2 (5.9)	0	1 (2.9)	0
LGSIL	233	30 (12.9)	23 (9.9)	4 (1.7)	5 (2.1)	3 (1.3)
HGSIL	51	7 (13.7)	5 (9.8)	4 (7.8)	2 (3.9)	1 (2.0)
CC	8	6 (75)	1 (12.5)	0	0	0
Total	326	45 (54.2) ^b	31 (37.3) ^b	8 (9.6) ^b	8 (9.6) ^b	4 (4.8) ^b

Results are *n* (%). HPV, human papillomavirus; LGSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; HGSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; CC, cervical carcinoma.
^a Samples were classified as normal if they did not present alterations either at cytology or colposcopy.
^b Results included co-infections.

Tabla 3. La prevalencia de genotipos del VPH en Puebla, México.

En este mismo estudio, se evaluó la co-infección del tipo 16 con los tipos 18, 31, 6 y 11. Los resultados se muestran en la tabla 4, encontrándose dos pacientes con los tipos 16/18 y tres pacientes con los tipos 16/6.

Diagnosis	Number of samples presenting mixtures of HPV genotypes							
	<i>n</i> ^a	16	16/18	16/31	16/6	16/11	16/31/6	16/18/31
Normal	2	2	0	0	0	0	0	0
LGSIL	30	22	2	1	3	1	0	1
HGSIL	7	4	1	1	0	0	1	0
CC	6	6	0	0	0	0	0	0
Total	45	34	3	2	3	1	1	1

HPV, human papillomavirus; LGSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; HGSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; CC, cervical carcinoma.
^a Total of HPV type 16-positive samples.

Tabla 4. VPH tipo 16 y de otros tipos en co-infecciones de muestras cervicales.

Aguilar-Lemarroy y colaboradores en el 2015, estudiaron las tasas de prevalencia de VPH de tipo específico y co-infecciones en mujeres mexicanas en edades de 18 a 87 años. Las infecciones por VPH se encontraron en 12,4% de las pacientes control, 46,0% en pacientes con NIC 1 y el 100% en pacientes con NIC 3 y pacientes con cáncer de cuello uterino. Se detectaron un total de 35 tipos de VPH. El tipo 16 fue el que se encontró con mayor frecuencia en todos los grupos, estando presente en 3.1% en pacientes control, 9.8% en pacientes con NIC 1, 40% en pacientes con NIC 3 y 62.8% en pacientes con cáncer de cuello uterino. Los resultados completos se muestran en la tabla 5 (Aguilar-Lemarroy y cols., 2015).

HPV Type	Oncogenic risk		Control, % (n)	Cervical intraepithelial neoplasia grade 1, % (n)	Cervical intraepithelial neoplasia grade 3, % (n)	Cervical cancer, % (n)
	NM	IARC				
6	LR	3	0.6 (2)	2.2. (7)	10.0 (3)	2.5 (3)
11	LR	3	0.3 (1)	0.6 (2)	3.3 (1)	0.0 (0)
16	HR	1	3.1 (11)	9.8 (31)	40.0 (12)	62.8 (76)
18	HR	1	1.7 (6)	4.4 (14)	13.3 (4)	11.6 (14)
26	PHR	2B	0.0 (0)	0.0 (0)	3.3 (1)	0.0 (0)
31	HR	1	0.3 (1)	3.8 (12)	16.7 (5)	1.7 (2)
33	HR	1	0.0 (0)	1.3 (4)	3.3 (1)	2.5 (3)
35	HR	1	0.6 (2)	1.9 (6)	6.7 (2)	2.5 (3)
39	HR	1	0.3 (1)	4.1 (13)	3.3 (1)	5.8 (7)
40	LR		0.0 (0)	1.0 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)
42	LR		0.6 (2)	2.2 (7)	6.7 (2)	0.8 (1)
45	HR	1	0.8 (3)	1.3 (4)	0.0 (0)	8.3 (10)
51	HR	1	2.0 (7)	3.8 (12)	10.0 (3)	2.5 (3)
52 ^a	HR	1	1.1 (4)	3.2 (10)	3.3 (1)	6.6 (8)
53	PHR	2B	1.4 (5)	3.8 (12)	3.3 (1)	3.3 (4)
54	LR		1.1 (4)	1.0 (3)	0.0 (0)	0.8 (1)
55	UD		1.1 (4)	1.0 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)
56	HR	1	0.8 (3)	3.2 (10)	6.7 (2)	1.7 (2)
58	HR	1	0.6 (2)	6.7 (21)	6.7 (2)	6.6 (8)
59	HR	1	0.6 (2)	5.7 (18)	10.0 (3)	0.8 (1)
61	LR		0.8 (3)	2.9 (9)	6.7 (2)	0.0 (0)
62	UD		3.1 (11)	5.1 (16)	6.7 (2)	0.8 (1)
66	PHR	2B	0.8 (3)	4.1 (13)	10.0 (3)	3.3 (4)
67	UD	2B	0.3 (1)	0.3 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
68	HR	2A	0.6 (2)	1.3 (4)	0.0 (0)	3.3 (4)
69	2B		0.3 (1)	1.3 (4)	3.3 (1)	1.7 (2)
70	LR	2B	1.1 (4)	3.8 (12)	13.3 (4)	2.5 (3)
71	UD		0.3 (1)	2.5 (8)	3.3 (1)	2.5 (3)
72	LR		0.0 (0)	1.0 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)
73	HR	2B	0.3 (1)	2.5 (8)	0.0 (0)	0.0 (0)
81	LR		0.8 (3)	1.0 (3)	6.7 (2)	0.8 (1)
82	HR	2B	0.0 (0)	1.0 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)
83	UD		0.6 (2)	1.0 (3)	0.0 (0)	0.8 (1)
84	UD		2.0 (7)	7.6 (24)	3.3 (1)	0.8 (1)
CP6108 ^b	LR		1.4 (5)	3.2 (10)	10.0 (3)	0.0 (0)
			12.3 (44)	46.0 (146)	100.0 (30)	100.0 (121)

NM: Epidemiologic classification according to Nubia Muñoz et al. (2003). International Agency for Research on Cancer (IARC) classification (2009). LR, Low risk; HR, High risk; PHR, probably high risk; UD, undetermined risk. Control, without cervical lesion. 1, carcinogenic; 2A, probably carcinogenic; 2B, possibly carcinogenic to humans.

^aThe prevalence of HPV 52 could be underestimated due to possible coinfection with viral types 33, 35, and 58.

^bHPV 89.

Tabla 5. La prevalencia cruda de los tipos de VPH en mujeres control, con lesiones precancerosas y cáncer de cuello uterino (Aguilar-Lemarroy y cols., 2015).

Sánchez-Vargas y colaboradores en el 2010, estudiaron la prevalencia de VPH en la cavidad oral de mujeres con prácticas de sexo oral y lesiones cervicales. El estudio se realizó en la clínica de displacias de Ciudad Juárez, 46 muestras fueron tomadas, se excluyó del estudio a mujeres que fumaban e ingerían bebidas alcohólicas. Estas mujeres tuvieron un diagnóstico de NIC en algún momento entre los seis meses anteriores. La detección se enfocó en VPH genérico, tipo 16 y 18. El 72% de las pacientes declaró tener prácticas sexuales orales con regularidad, cabe señalar que todas fueron positivas para VPH, ya sea en saliva, paladar/encías o ambos. De las pacientes positivas el 35% tuvo VPH tipo 16, de las cuales el 26% admitió practicar sexo oral con regularidad y el 9% declaró que no practica sexo oral. El VPH tipo 18 no se detectó. La frecuencia de VPH 16 fue mayor en la mucosa bucal (23%) contra paladar/encía (16%) (Sánchez-Vargas y cols., 2010).

González–Ramírez y colaboradores en el 2013 estudiaron la prevalencia de VPH en un grupo de pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad bucal y un grupo control, en una población mexicana. La prevalencia de VPH fue de 5% en los pacientes con carcinoma de células escamosas y el 2.5% con los pacientes control. Los tipos detectados fueron 16, 18 y 56. Además de estos resultados, en el mismo artículo hicieron una revisión sobre estudios realizados en diferentes partes del mundo sobre la prevalencia de VPH en el carcinoma oral de células escamosas. Si se revisan los resultados de los estudios en México se puede ver que son muy variados ya que Ibieta y colaboradores en el 2005 encuentran VPH 16 en el 42% de los pacientes, Anaya-Saavedra y colaboradores en el 2008 encuentran 56% del VPH tipo 16 y 18% del tipo 18, González–Ramírez encuentra 25% del tipo 16 y 50% del tipo 18. Los datos completos se pueden observar en la tabla 6 (González-Ramírez y cols., 2013).

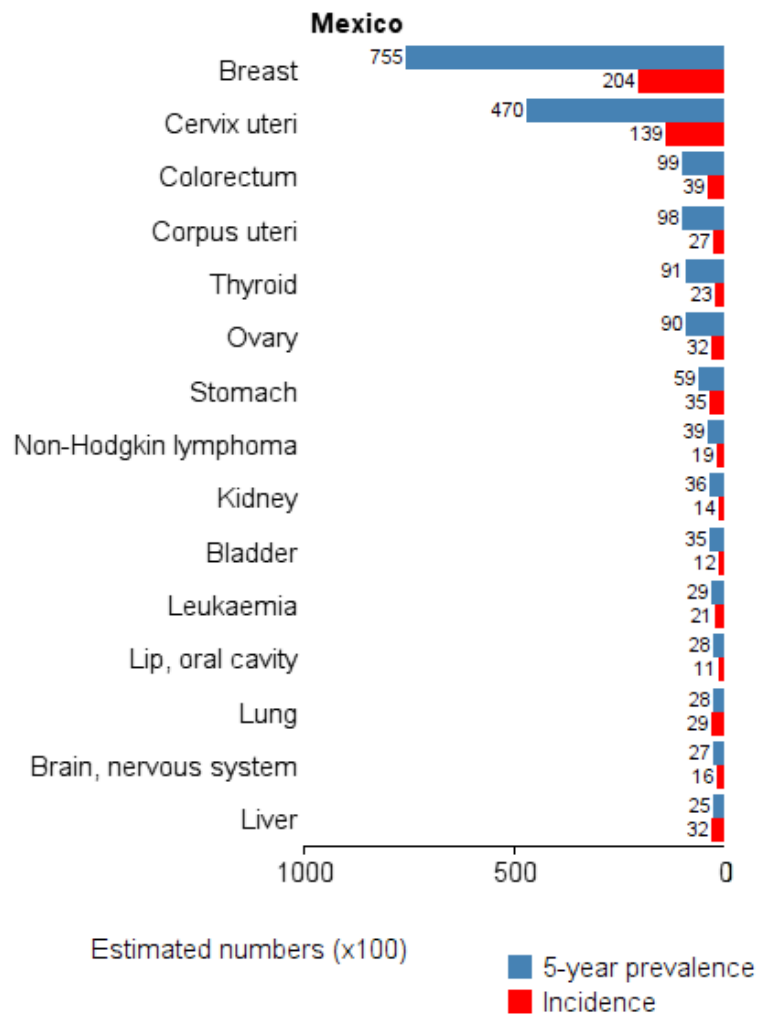
References	Country	Sample	HPV	Method	HPV16	HPV18
Gillison <i>et al</i> (2000)	USA	Tissue	12%	PCR	-	-
Sisk <i>et al</i> (2000)	USA	Tissue	50%	PCR	82%	9%
Premoli-De-Percoco and Ramirez (2001)	Venezuela	Tissue	60%	PCR	50%	16%
El-Mofly and Lu, (2003)	USA	Tissue	0%	PCR	-	-
Herrero <i>et al</i> (2003)*	Multicenter	Tissue	4%	PCR	89%	5%
Braakhuis <i>et al</i> (2004)	Holland	Tissue	50%	PCR	100%	NT
Dahlgren <i>et al</i> (2004)	Sweden	FFPET	11%	PCR	75%	-
Hansson <i>et al</i> (2005)	Sweden	Tissue	36%	PCR	81%	NT
Ibieta <i>et al</i> (2005)	Mexico	Tissue	42%	PCR	67%	NT
Tachezy <i>et al</i> (2005)	Czech Republic	Tissue	25%	PCR	NT	NT
Slebos <i>et al</i> (2006)	USA	Tissue	0%	PCR	-	-
Luo <i>et al</i> (2007)	Taiwan	Cytobrushing	21%	PCR	NT	NT
Anaya-Saavedra <i>et al</i> (2008)	Mexico	Tissue & cytobrushing	43%	PCR	56%	18%
Chuang <i>et al</i> (2008)	USA	Tissue & rinses	0%	PCR	-	-
Khovichunkit <i>et al</i> (2008)	Thailand	Tissue	3%	PCR	NT	NT
Liang <i>et al</i> (2008)	USA	Tissue	2%	PCR	100%	NT
Pintos <i>et al</i> (2008)	Canada	Exfoliated cells	19%	PCR	NS	NT
Simonato <i>et al</i> (2008)	Brazil	FFPET	17%	PCR	NT	NT
Saheljamee <i>et al</i> (2009)	Iran	Rinses	41%	PCR	27%	NY
Szarka <i>et al</i> (2009)	Hungary	Tissue	47%	PCR	NT	NT
Machado <i>et al</i> (2010)	Canada	Tissue	4%	PCR	50%	50%
Elango <i>et al</i> (2011)	India	Tissue	48%	PCR	100%	NT
St. Guily <i>et al</i> (2011)	France	Tissue	10%	PCR	95%	NT
Kulkarni <i>et al</i> (2011)	India	Rinses	71%	PCR	46%	54%
Lopes <i>et al</i> (2011)	UK	Tissue & FFPET	2%	PCR	100%	NT
Ribeiro <i>et al</i> (2011)	France	Tissue	0%	PCR	-	-
Laco <i>et al</i> (2011)	Czech Republic	Tissue	13%	PCR	-	-
De Freitas Cordeiro-Silva <i>et al</i> (2011)	Brazil	Tissue	6%	PCR	100%	NT
Ibieta-Zarco <i>et al</i> (2012)	Mexico	Tissue	13%	PCR	-	-
Kaminagakura <i>et al</i> (2012)	Brazil	FFPET	19%	PCR	100%	NT
Kabeya <i>et al</i> (2012)	Japan	Tissue	0%	ISH	-	-
Lingen <i>et al</i> (2013)	USA	FFPET	6%	RT-PCR	4%	NT
Present study	Mexico	Tissue & cytobrushing	5%	PCR	25%	50%

*Nine countries.

FFPET, formalin-fixed paraffin-embedded tissue; PCR, polymerase chain reaction; ISH, in-situ hybridization; NT, not tested.

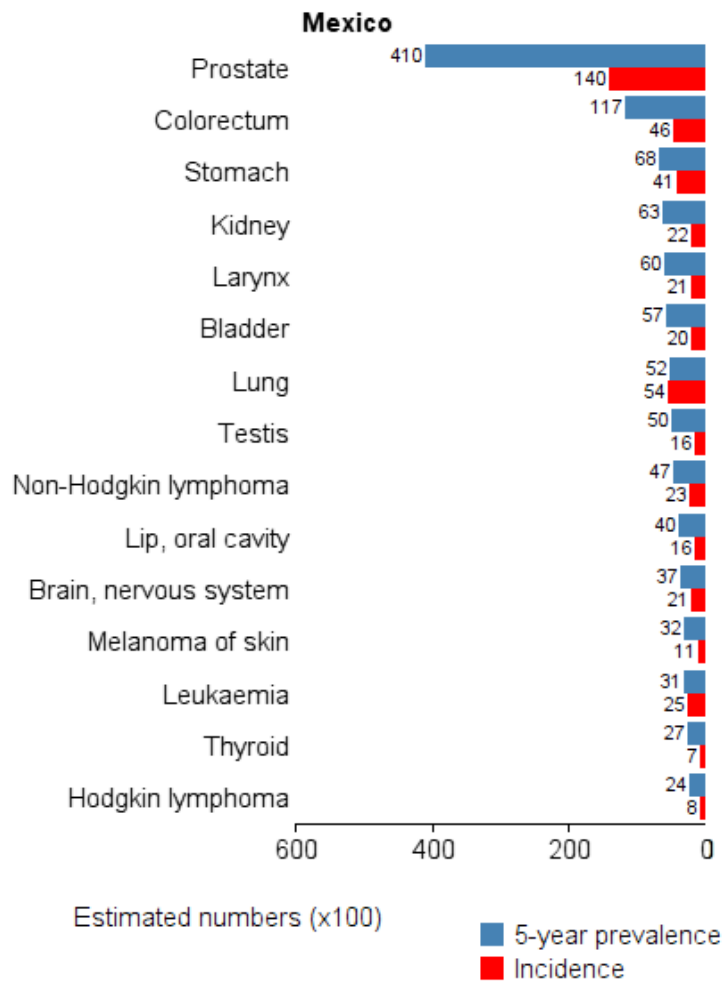
Tabla 6. La prevalencia de VPH en el carcinoma oral de células escamosas (González-Ramírez y cols., 2013).

En el reporte del 2012 de GLOBOCAN, el cáncer cervicouterino ocupa el segundo lugar en prevalencia e incidencia en mujeres en México, solo después del cáncer de mama, el cáncer de cavidad oral se ubica en el doceavo lugar, como se muestra la gráfica 3 (GLOBOCAN 2012, IARC).



Gráfica 3. Prevalencia e incidencia del cáncer en mujeres en México (GLOBOCAN 2012, IARC).

En los hombres el cáncer con mayor prevalencia e incidencia en México fue el cáncer de próstata, el cáncer de laringe ocupa el quinto lugar y el cáncer en cavidad oral ocupa el décimo lugar, como se muestra en el gráfica 4 (GLOBOCAN 2012, IARC).



Gráfica 4. Prevalencia e incidencia del cáncer en hombres en México (GLOBOCAN 2012, IARC).

JUSTIFICACIÓN

La infección causada por el virus del papiloma humano es una de las enfermedades de transmisión sexual más común alrededor del mundo, si bien, la gran mayoría de las infecciones son eliminadas en un lapso de dos años, se sabe que ciertos tipos de VPH pueden persistir y por lo tanto aumentar el riesgo de desarrollar cáncer.

Actualmente el Papanicolaou es uno de los métodos mayormente utilizados para el diagnóstico de VPH, pero debido a su baja sensibilidad y a las variaciones que pueden existir dependiendo del conocimiento del patólogo, puede haber resultados tanto falsos positivos como falsos negativos. Es por ello que se propone el diagnóstico y la tipificación molecular del VPH.

Los sistemas de salud en México, dirigen principalmente el diagnóstico de VPH a mujeres mayores de 35 años, por lo que consideramos relevante enfocar nuestro estudio en jóvenes de 18 a 35 años de edad.

Diversos reportes señalan que el VPH puede infectar faringe y por lo tanto conducir a desarrollo de cáncer; sin embargo, en nuestro país existen muy pocos reportes que establecen la presencia del VPH en faringe, es por ello que se propuso también realizar la detección y tipificación molecular de VPH en faringe en mujeres y hombres que practiquen sexo oral.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución de los tipos y la persistencia de virus del papiloma humano en personas de 18 a 35 años de edad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar y tipificar VPH en cérvix y faringe.
2. Determinar la distribución de tipos de VPH.
3. Determinar persistencia de los tipos de VPH.
4. Asociar la presencia de lesiones con algún genotipo de VPH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 125 muestras de exudado faríngeo en hombres y mujeres. Y 157 muestras de exudado cervical. Las muestras faríngeas y cervicales fueron obtenidas en la ciudad de Puebla, en pacientes de 18 a 35 años de edad en los meses de junio 2014 a junio 2015.

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión y exclusión para VPH en faringe	
Inclusión	Exclusión
<ul style="list-style-type: none">• Haber practicado sexo oral alguna vez en su vida.• Edad de 18 a 35 años.	<ul style="list-style-type: none">• No haber practicado nunca sexo oral.• Personas que no estén entre las edades de 18-35 años.

Criterios de inclusión y exclusión para VPH en cérvix	
Inclusión	Exclusión
<ul style="list-style-type: none">• Haber tenido relaciones sexuales.• Edad de 18-35 años	<ul style="list-style-type: none">• No haber tenido nunca relaciones sexuales.• Mujeres que estén en su periodo menstrual.• Mujeres que no estén entre las edades de 18-35 años.• Mujeres en tratamiento médico con óvulos o cremas vaginales.

Cuestionario

A todos los pacientes se les realizó un cuestionario con el objetivo de recabar información sobre su vida sexual, número de parejas sexuales, uso de métodos anticonceptivos, edad de inicio de la vida sexual activa, estudios previos sobre Papanicolaou, prácticas sexuales orales y anales. Además del cuestionario se les entregó una carta de consentimiento informado para participación en el protocolo de investigación clínica y un aviso de confidencialidad (Anexo), como lo marca la NOM-012-SSA3-2012.

Toma de muestra de exudado faríngeo

Las muestras se tomaron con un hisopo estéril, el cual fue colocado en un tubo con 2 ml de PBS 1X, que se usó como medio de transporte.

Toma de muestra de exudado cervical

Las pacientes se colocaron en posición ginecológica y por medio de un espejo vaginal se tomó la muestra con *cytobrush*, el cual se introdujo en el conducto cervical, girando 5 vueltas completas y posteriormente se colocó en un tubo con 2 ml de PBS 1X (Anexo).

Validación de la muestra

A la llegada al laboratorio se verificó que la muestra no se hubiera derramado y se les asignó un folio interno del laboratorio.

Extracción de ADN

La extracción del ADN de las muestras faríngeas y cervicales se realizó mediante el kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche®), el proceso de extracción fue realizado de acuerdo a las instrucciones establecidas por el fabricante. El ADN fue eluído en 50 µl de buffer proporcionado por el fabricante.

Cuantificación del ADN

Para la cuantificación se tomaron 2 µl de ADN de los 50 µl obtenidos previamente y se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (NanoPhotometer®), en el mismo aparato y con la misma muestra se hizo la relación 260/280 y 260/230 para verificar la posible contaminación con proteínas y carbohidratos. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

PCR gen beta-globina

Se verificó la integridad del ADN extraído, mediante la amplificación del fragmento de 268 pb dentro del gen beta globina, usando los primers PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') y GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') (Nayler y cols., 1999).

La mezcla de reacción utilizada para la amplificación fue la siguiente:

Reactivo Concentración inicial	Volumen por reacción (µl)	Reactivo Concentración final
Buffer 10X	2.5	Buffer 1X
MgCl ₂ 25 mM	3.0	MgCl ₂ 3 mM
dNTPs 10 mM	1.0	dNTPs 0.4 mM
Primer PCO4 10 µM	1.0	Primer PCO4 0.4 µM
Primer GH20 10 µM	1.0	Primer GH20 0.4 µM
5 U/µl FastStart Taq DNA polymerase	0.2	1 U de FastStart Taq DNA polymerase
Agua grado biología molecular	15.3	
ADN 5-100 ng/µl	1.0	
Volumen total	25 µl	

La PCR fue realizada en el termociclador Veriti[®] (Applied Biosystems[®]) y la programación fue la siguiente:

3 min	95 °C	} Por 35 ciclos
1 min	95 °C	
1 min	55 °C	
1 min	72 °C	
3 min	72 °C	

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador 212 Pro (Carestream).

PCR con primer PGMY 09/11

Los primer PGMY 09/11 (Gravitt y cols., 2000) se usaron para la detección de VPH mediante PCR punto final, dando un amplificado de 450 pb. Esta técnica fue usada como tamizaje, las muestras positivas pasaron a microarreglos y las muestras que no amplificaron se consideraron negativas a VPH.

La secuencia de los primers se muestra a continuación:

Primer	Secuencia del primer (5' - 3')
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

La mezcla utilizada en la reacción para la amplificación fue la siguiente:

Reactivo Concentración inicial	Volumen por reacción (µl)	Reactivo Concentración final
Buffer 10X	2.5	Buffer 1X
MgCl ₂ 25 mM	3.0	MgCl ₂ 3 mM
dNTPs 10 mM	1.0	dNTPs 0.4 mM
Primer PGMY09 10 µM	1.0	Primer PGMY09 0.4 µM
Primer PGMY11 10 µM	1.0	Primer PGMY11 0.4 µM
5 U/µl FastStart Taq DNA polymerase	0.2	1 U de FastStart Taq DNA polymerase
Agua grado biología molecular	15.3	
ADN de 5-100 ng/µl	1.0	
Volumen total	25 µl	

La PCR fue realizada en el termociclador MultiGene OptiMax (Labnet international Inc) y la programación fue la siguiente:

3 min	95 °C	} Por 35 ciclos
1 min	95 °C	
1 min	55 °C	
1 min	72 °C	
3 min	72 °C	

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador 212 Pro (Carestream).

Microarreglos

Los microarreglos se utilizaron para la tipificación de las muestras que resultaron positivas a VPH por los primers PGMY 09/11. Se utilizó el kit de microarreglo HPV 3.5 (Chipron®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada chip contiene 3 controles de hibridación y detecta hasta 32 tipos diferentes del VPH, cada prueba se realizó por duplicado.

La clasificación de los tipos de VPH del fabricante es la siguiente:

Grupo	Característica	Tipos de VPH
1	Tipos carcinogénicos para humanos	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
2 ^a	Probablemente cancerígenos para humanos	68
2B	Posiblemente cancerígenos para humanos	53, 66, 67, 70, 73 82.
3	Tipos no clasificados como cancerígenos	6 y 11
No clasificados	Tipos no clasificados por IARC, OMS. 2011.	42, 44, 54, 61, 62, 72, 81, 83, 84, 90 y 91.

Secuenciación

Debido a que una muestra no pudo tipificarse por microarreglos, se decidió someterla a secuenciación para determinar el tipo de VPH que estaba presente. Cabe señalar que cuatro muestras que si fueron tipificables por microarreglos también se les realizó secuenciación para verificar el resultado del microarreglo. Para la amplificación se usaron los primers GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') y GP6+ (3'-CTTATACTAAATGTCAAAT AAAAAG-5') (De Roda y cols., 1995), los cuales dan un amplificado de 150 pb.

La mezcla de reacción utilizada para la amplificación fue la siguiente:

Reactivo Concentración inicial	Volumen por reacción (µl)	Reactivo Concentración final
Buffer 10X	10.0	Buffer 1X
MgCl ₂ 25 mM	12.0	MgCl ₂ 3 mM
dNTPs (10 mM)	4.0	dNTPs 0.4 mM
Primer GP5+ (10 µM)	4.0	Primer GP5+ 0.4 µM
Primer GP6+ (10 µM)	4.0	Primer GP6+ 0.4 µM
5 U/µl FastStart Taq DNA polymerase	0.8	1 U de FastStart Taq DNA polymerase
Agua grado biología molecular	61.2	
ADN de 5-100 ng/µl	4 µl	
Volumen total	100 µl	

La PCR fue realizada en el termociclador MultiGene OptiMax (Labnet international Inc) y la programación fue la siguiente:

3 min	95 °C	} Por 35 ciclos
1 min	95 °C	
2 min	40 °C	
1:30 min	72 °C	
3 min	72 °C	

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador 212 Pro (Carestream).

Se cortó la banda que correspondía al tamaño esperado de 150 pb. La banda fue purificada usando el Gel Extraction Kit (QIAquick®), siguiéndose las instrucciones del fabricante y finalmente, las muestras fueron eluidas en 40 µl de buffer de elución. El ADN purificado fue enviado a secuenciación.

Confirmación de VPH tipo 16

Para confirmar los resultados al VPH tipo 16 por microarreglo, todas las muestras que resultaron positivas al tipo 16 (como a otros tipos en la primera toma de muestra), se les corrió una PCR punto final con los primers 16.1 (+ 5' TGCTAGTGCTTATGCAGCAA 3') y 16.2 (5' ATTTACTGCAACATTGGTAC 3') que dan un amplificado de 150 pb y son específicos para detección del VPH tipo 16 (Van Den Brule y cols., 1990).

La mezcla utilizada para la amplificación fue la siguiente:

Reactivo Concentración inicial	Volumen por reacción (µl)	Reactivo Concentración final
Buffer con MgCl ₂ 10X	2	Buffer con MgCl ₂ 1X
dNTPs (10mM)	0.8	dNTPs 0.4 mM
Primer 16.1 (10µM)	0.8	Primer 16.1 0.4µM
Primer 16.2 (10µM)	0.8	Primer 16.2 0.4µM
5 U/µl Taq DNA polimerase	0.3	1.5 U Taq DNA polimerase
Agua grado biología molecular	14.3	
ADN 5-100 ng/µl	1 µl	
Volumen Total	20 µl	

La PCR fue realizada en el termociclador MultiGene OptiMax (Labnet international Inc) y la programación fue la siguiente:

95 °C	2 min	} Por 35 ciclos
94 °C	30 s	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador 212 Pro (Carestream).

Confirmación de VPH tipo 18

Para confirmar los resultados al tipo 18 por microarreglo, las muestras que resultaron positivas al tipo 18 (como a otros tipos en la primera toma de muestra), se les corrió una PCR punto final con los primer 18.1 (+ 5' AAGGATGCTGCACCGGCTGA 3') y 18.2 (-5'CACGCACACGCTTGGCAGGT 3') que dan un amplificado de 217 pb y son específicos para detección del VPH tipo 18 (Van Den Brule y cols., 1990).

La mezcla utilizada para la amplificación fue la siguiente:

Reactivo Concentración inicial	Volumen por reacción (µl)	Reactivo Concentración final
Buffer con MgCl ₂ 10X	2	Buffer con MgCl ₂ 1X
dNTPs (10mM)	0.8	dNTPs 0.4 mM
Primer 18.1 (10mM)	0.8	Primer 18.1 0.4 mM
Primer 18.2 (10mM)	0.8	Primer 18.2 0.4 mM
5 U/µl de Taq DNA polimerase	0.3	0.5 U de Taq DNA polimerase
Agua grado biología molecular	14.3	
ADN 5-100 ng/µl	1	
Volumen Total	20 µl	

La PCR fue realizada en el termociclador MultiGene OptiMax (Labnet international Inc) y la programación fue la siguiente:

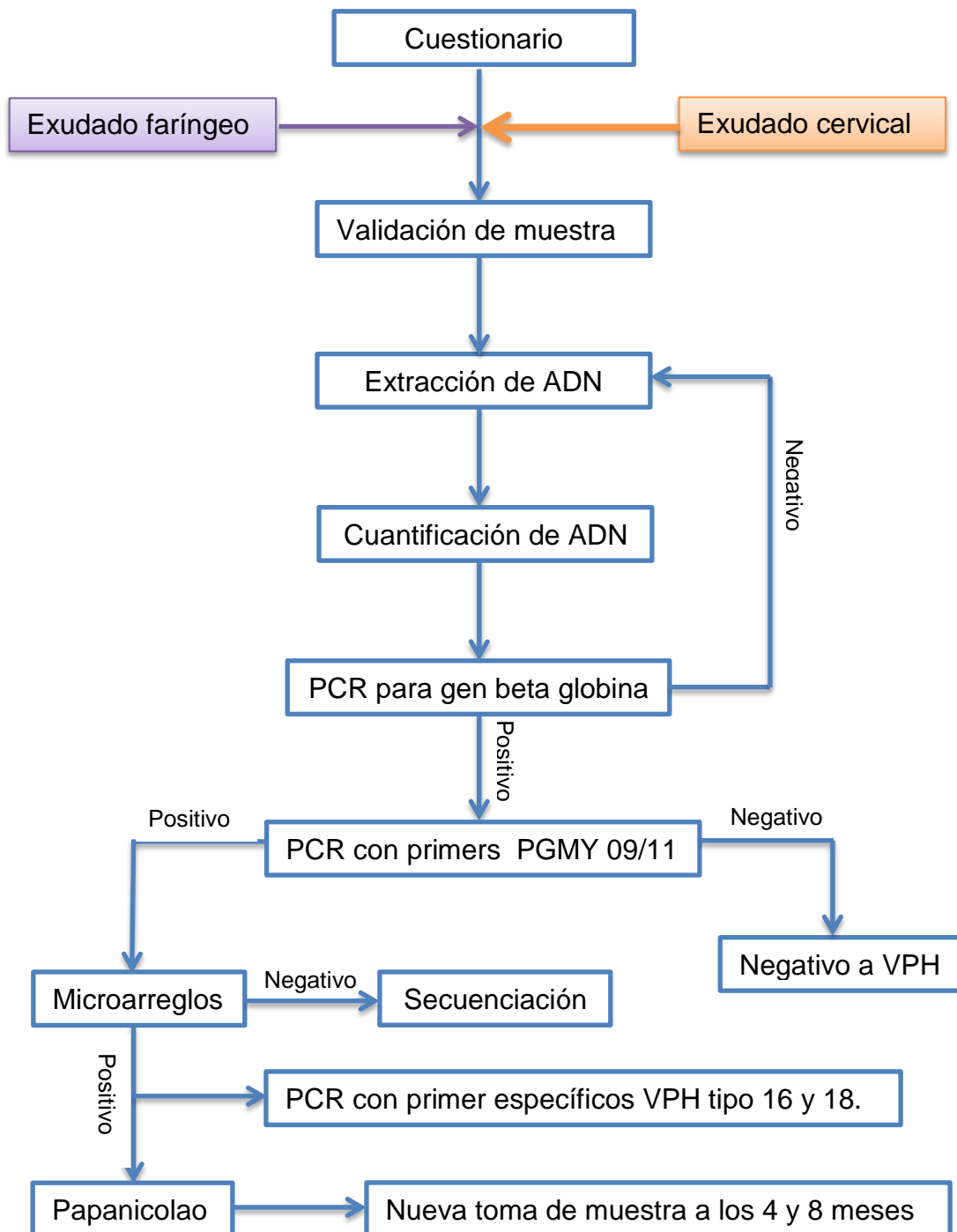
95 °C	2 min	} Por 35 ciclos
94 °C	30 s	
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador 212 Pro (Carestream).

Toma de muestra para tinción de Papanicolaou

Se colocó a la paciente en posición ginecológica y por medio de un espejo vaginal se tomó la muestra del cérvix con un *cytobrush* y una espátula de Ayre, la muestra fue colocada en un portaobjetos y se fijó con alcohol de 96° por 20 minutos. Las muestras fueron enviadas con un anatomopatólogo oncólogo para su análisis.

DIAGRAMA DE TRABAJO

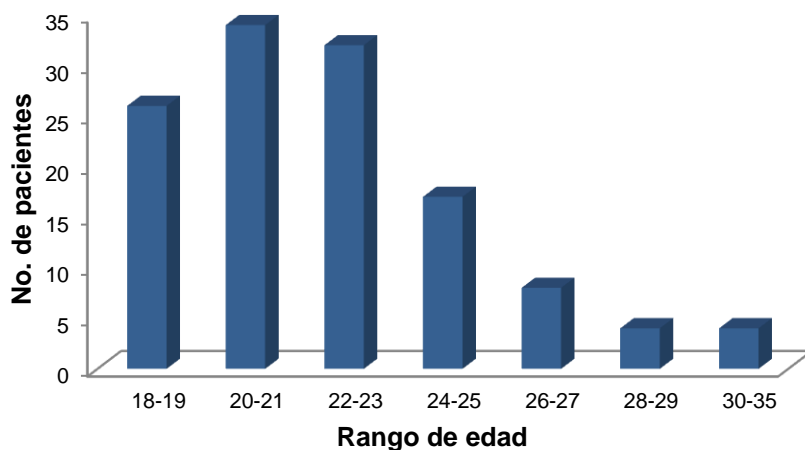


RESULTADOS

Con el propósito de conocer la distribución de los tipos del virus del papiloma humano en cérvix y faringe en pacientes de 18 a 35 años de edad, se tomaron 125 muestras de exudado faríngeo en hombres y mujeres. Y 157 muestras de exudado cervical. Entre los meses de junio 2014 y junio 2015.

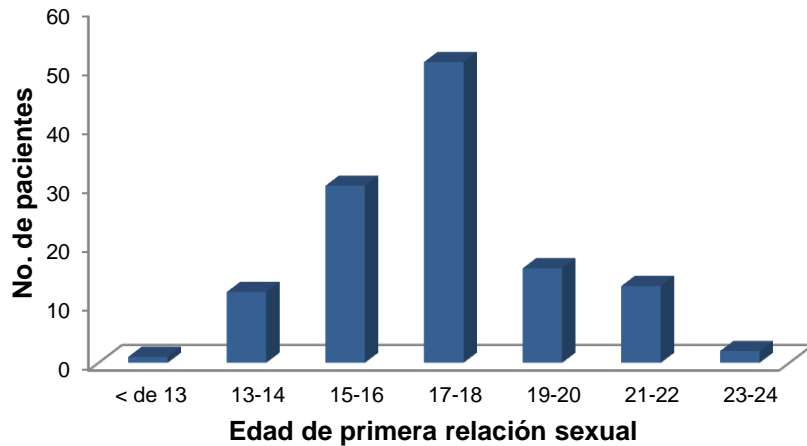
Resultados exudado faríngeo

El análisis del cuestionario para el estudio de VPH en faringe arrojó los siguientes datos: Se tomaron 125 muestras, de las cuales 103 fueron en mujeres y 22 en hombres. Para el análisis de edades se agruparon de 18-19, 20-21, 22-23, 24-25, 26-27, 28-29 y 30-35. El pico máximo se encuentra entre 20-21 con 34 pacientes (27%) seguido de 22-23 años con 32 pacientes (25.5%), el número de pacientes en cada rango de edad se muestran en la gráfica 5.



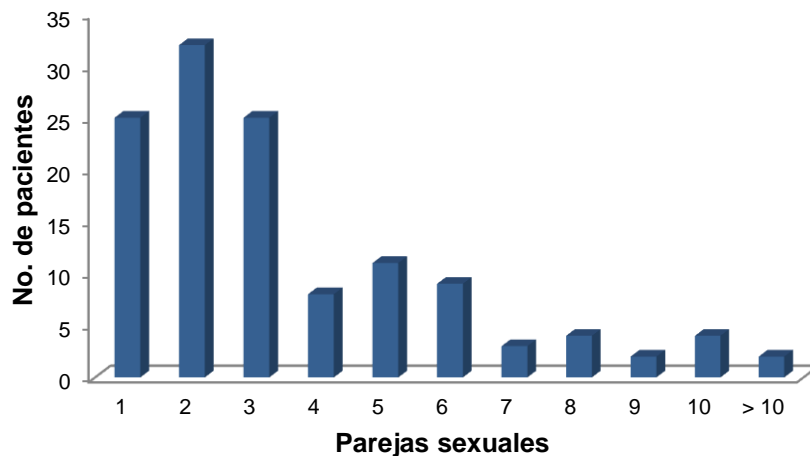
Gráfica 5. Edad de los pacientes en estudio faríngeo.

En la pregunta sobre la edad de la primera relación sexual, 94 pacientes (75%) admite haber tenido su primera relación sexual antes de los 19 años, 51 pacientes (41%) reconoce que fue entre los 17-18 años y solo dos pacientes (1.6%) acepta que fue entre 23-24 años de edad, gráfica 6.



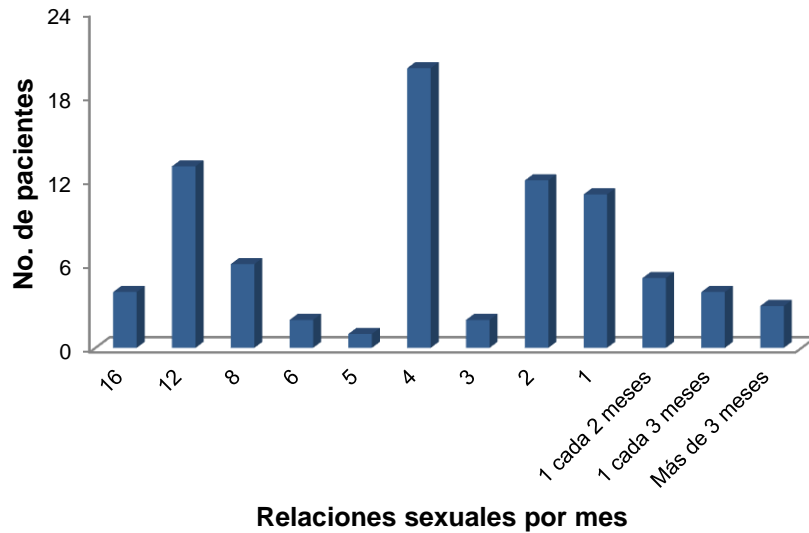
Gráfica 6. Edad de la primera relación sexual, estudio faríngeo.

En la pregunta acerca del número de parejas sexuales, 100 pacientes (80%) ha tenido más de 1 pareja sexual, 20 pacientes (20%) ha tenido solo una pareja sexual, 24 pacientes (19%) han tenido más de 5 parejas sexuales, gráfica 7.



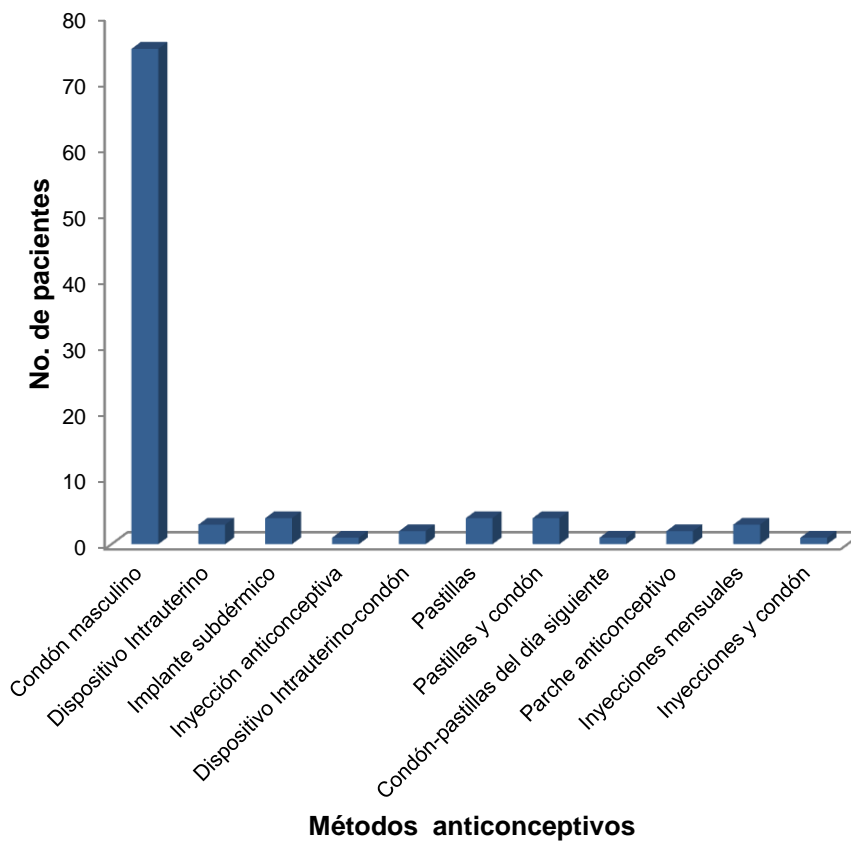
Gráfica 7. Número de parejas sexuales, estudio faríngeo.

En cuanto a la frecuencia de sus relaciones sexuales, solo 83 pacientes contestaron a dicha pregunta, 42 pacientes se abstuvieron, 46 pacientes (55.4%) tiene más de 3 relaciones sexuales por mes, 4 pacientes (4.8%) tienen 16 relaciones por mes, el pico máximo de relaciones sexuales es de 12 por mes con 13 pacientes (15.7%), gráfica 8.



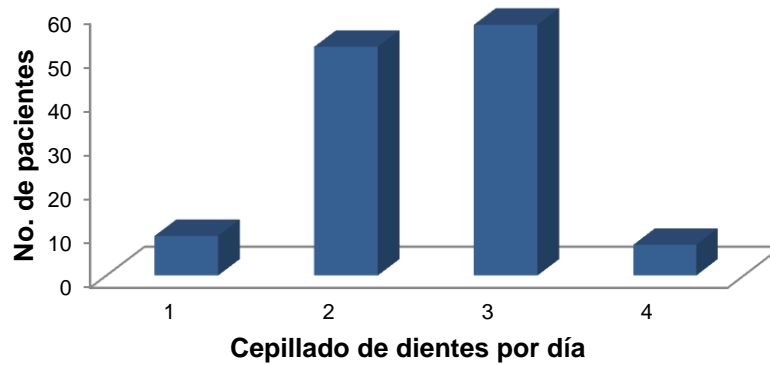
Gráfica 8. Número de relaciones sexuales por mes, estudio faríngeo.

En relación al uso de métodos anticonceptivos, la encuesta arroja que solo 100 pacientes opta por ellos, 25 pacientes admite no usarlo y de los que sí lo usan 75 (75%) usa solo el condón masculino, otros métodos utilizados son el dispositivo intrauterino (3%), el implante subdérmico (4%), así como combinaciones de métodos tales como inyecciones-condón, dispositivo intrauterino-condón, pastillas-condón, gráfica 9.



Gráfica 9. Métodos anticonceptivos utilizados por pacientes en estudio faríngeo

En cuanto a las preguntas sobre higiene oral, 116 pacientes (93%) se cepilla por lo menos dos veces al día los dientes, 9 pacientes (7%) se cepillan los dientes solo 1 vez al día, gráfica 10. Acerca del uso de enjuague bucal, 80 pacientes no lo usa, 40 pacientes si usa enjuague bucal, como mínimo una vez al día.



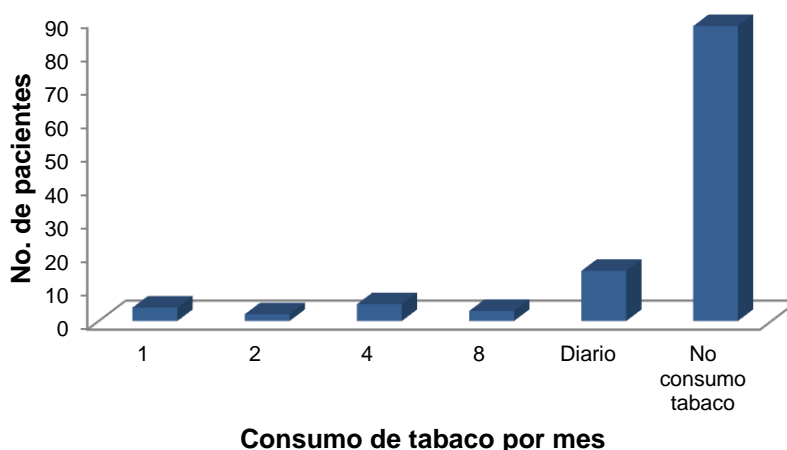
Gráfica 10. Número de cepillado de dientes por día, en estudio faríngeo.

En relación al consumo del alcohol, 117 pacientes dieron respuesta a la pregunta, 8 se abstuvieron, 51 pacientes (43.6%) no consume alcohol, 43 pacientes (37%) consume bebidas alcohólicas como mínimo una vez al mes, gráfica 11.



Gráfica 11. Consumo de alcohol por mes, en estudio faríngeo.

También se les preguntó sobre el consumo de tabaco, 117 respondieron a esta pregunta, solo 8 no contestaron, 88 (75%) pacientes dice no fumar, 15 pacientes (13%) fuma como mínimo una vez al día, gráfica 12.



Gráfica 12. Número de veces que consumen tabaco por mes, estudio faríngeo.

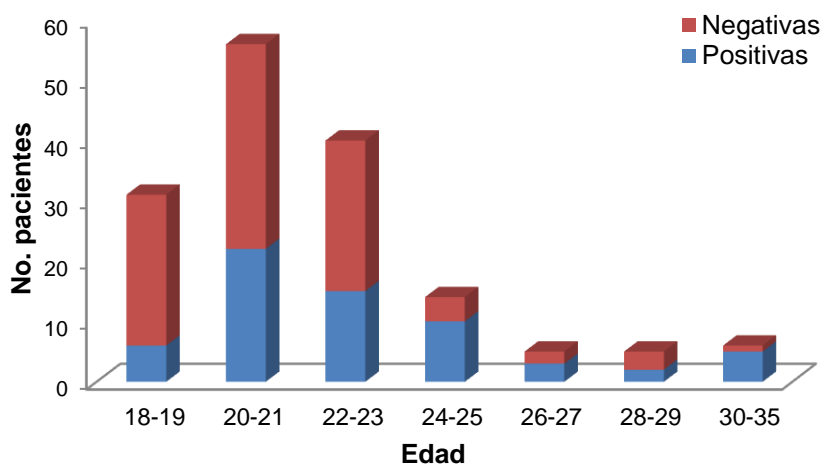
Respecto a las relaciones sexuales orales (ya sea que el paciente las practique o que le hayan practicado) las respuestas arrojan lo siguiente, 111 pacientes admite que no ha usado ningún método de protección y solo 9 afirmaron que durante la relación sexual oral usaron condón como protección. En la pregunta sobre su preferencia sexual; 31 pacientes no la respondió, de los 94 que si contestaron, 88 son heterosexuales, 4 homosexuales y 2 bisexuales.

Los resultados evidenciaron que de las 125 muestras faríngeas analizadas, no se obtuvo ninguna muestra positiva a VPH, todas las muestras si amplificaron para el gen beta globina, corroborándose con esto la presencia de células durante la toma de muestra.

Resultados exudado cervical

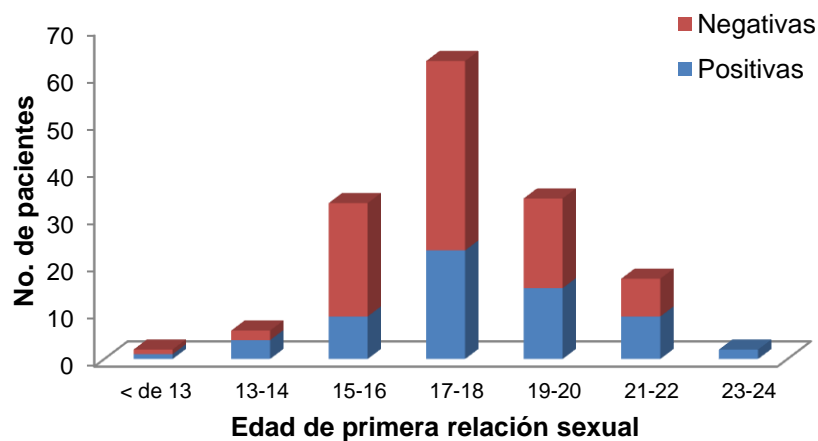
Se tomaron 157 muestras de exudado cervical, de las cuales 94 (60%) fueron negativas y 63 (40%) fueron positivas a VPH.

Para el análisis de los resultados del cuestionario se compararon datos de las pacientes positivas contra las negativas, el análisis arrojó los siguientes datos: En relación a la edad de las pacientes que participaron en el estudio, 53 pacientes (84%) positivas están entre 18 y 25 años y 88 pacientes (93.7%) negativas están en el mismo rango de edad, tal y como se aprecia en la gráfica 13. Con la prueba estadística de Chi-cuadrada hay una relación estadísticamente significativa ($p=0097$) entre las pacientes positivas con las negativas, por lo tanto la edad de las pacientes se puede considerar como un factor de riesgo para la infección por VPH.



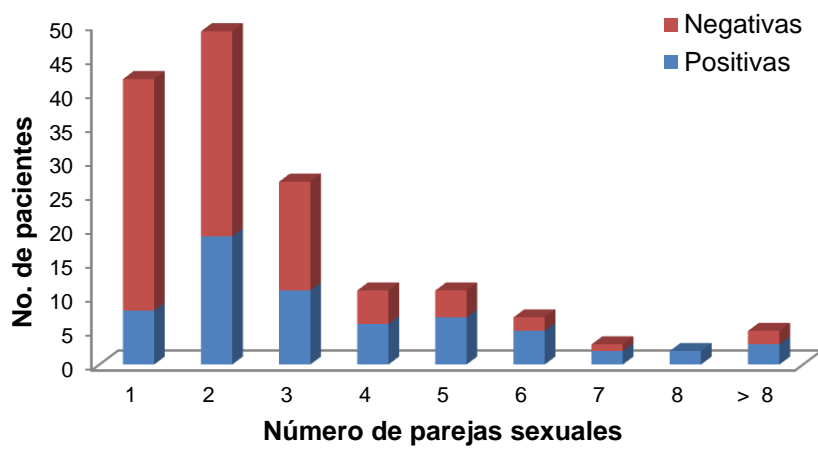
Gráfica 13. Edades de las pacientes del estudio del VPH en cérvix.

En la pregunta sobre la edad de la primera relación sexual, 23 pacientes (36.5%) positivas tuvo su primera relación de 17-18 años, seguido por 19-20 años con 19 pacientes (24%). De las pacientes negativas, 40 de ellas (42.6%) tuvo su primera relación de 17-18 años, seguido por 15-16 años con 24 pacientes (25.5%), gráfica 14. Con la prueba estadística, se determinó que no hay una relación estadísticamente significativa ($p=0.1837$), por lo tanto en este estudio la edad de la primera relación sexual no es un factor de riesgo para una infección por VPH.



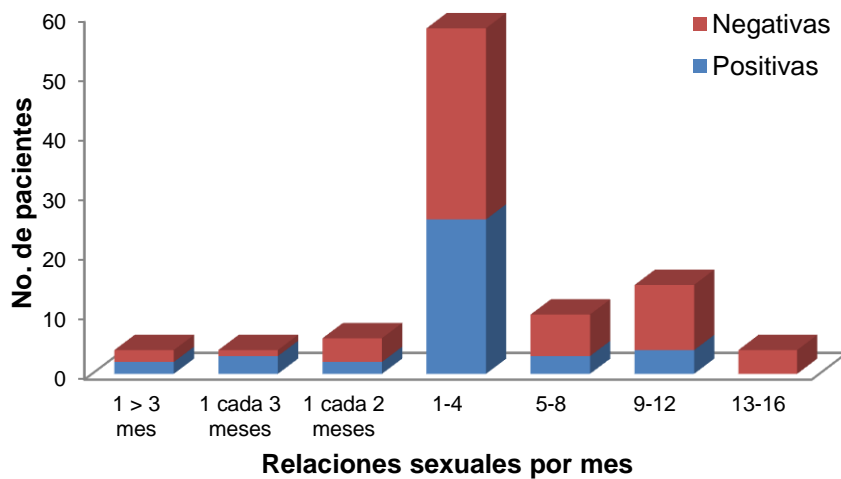
Gráfica 14. Edad de la primera relación sexual, estudio en cérvix.

En el número de parejas sexuales, 55 pacientes positivas (87%) ha tenido más de una pareja sexual y 12 pacientes (19%) ha tenido más de 5 parejas sexuales. En relación a las pacientes negativas, 60 (64%) ha tenido más de una pareja sexual y 5 pacientes (5.3%) has tenido más de 5 parejas sexuales, gráfica 15. En la prueba estadística se observa una relación estadísticamente significativa ($p=0.0158$), por lo tanto en este estudio el número de parejas sexuales si es un factor de riesgo para una infección por VPH.



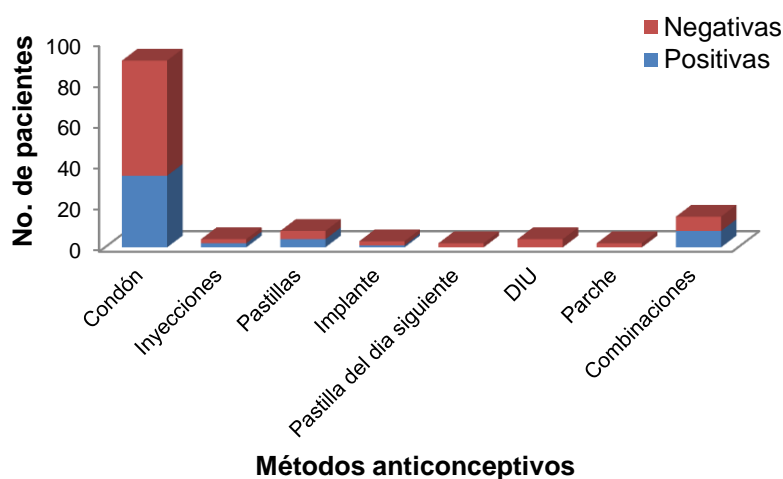
Gráfica 15. Número de parejas sexuales, estudio en cérvix.

En cuanto a la frecuencia de las relaciones sexuales, solo 40 pacientes de las 63 positivas contestó esta pregunta, 33 pacientes (82.5%) positivas tienen como mínimo una relación sexual al mes. En las pacientes negativas solo contestaron 61 de las 94, en donde 54 pacientes (88.6%) tienen como mínimo una relación sexual al mes y 4 pacientes (6.6%) tienen más de 12 relaciones sexuales por mes. Los resultados completos se muestran en la gráfica 16. En la prueba estadística de Chi-cuadrada ($p=0.3122$) se ve que en este estudio la frecuencia de las relaciones sexuales entre las pacientes positivas y negativas no es estadísticamente significativa, por lo tanto en este estudio no podemos considerar a la frecuencia de relaciones sexuales como un factor de riesgo para la infección con VPH.



Gráfica 16. Relaciones sexuales por mes, estudio cervical.

En el uso de métodos anticonceptivos, 50 pacientes (79%) positivas admite que si se protege con algún método anticonceptivo, pero de las 50, solo 33 (66%) es regular en el uso del método, 35 pacientes (70%) usa como único método el condón masculino y 8 pacientes (16%) usan combinaciones como condón-pastillas, condón-DIU e inyecciones-condón. En las pacientes negativas, 79 pacientes (84%) usan algún método pero solo 45 (57%) son regulares en el uso del método, 56 pacientes (71%) usa como única protección el condón masculino y 9 pacientes (11.4%) usa combinaciones de condón-pastillas, condón-pastillas del día siguiente y parche hormonal-condón. Los datos completos se muestran en la gráfica 17. En la prueba estadística se observa que no hay una relación significativa entre las pacientes positivas con la negativas ($p=0.4201$).



Gráfica 17. Métodos anticonceptivos, en estudio cervical.

En la pregunta acerca de infecciones vaginales, 50 pacientes (79%) positivas, ha padecido al menos una infección vaginal y 71 pacientes (75.5%) negativas ha padecido al menos una infección vaginal. Las pacientes positivas, 52 (82.5%) ha practicado sexo oral y 50 (79%) les han practicado sexo oral. También 20 pacientes (31.7%) han practicado sexo anal. En relación a las pacientes negativas, 77 (82%) ha practicado sexo oral y 78 (83%) les han practicado sexo oral. Así mismo, 26 (28%) pacientes negativas ha practicado el sexo anal.

Para corroborar la integridad del ADN, todas las muestras tanto faríngeas como cervicales amplificaron el gen beta globina, que tiene un tamaño de 268 pb. Ejemplo de un gel se muestra en la imagen 1.

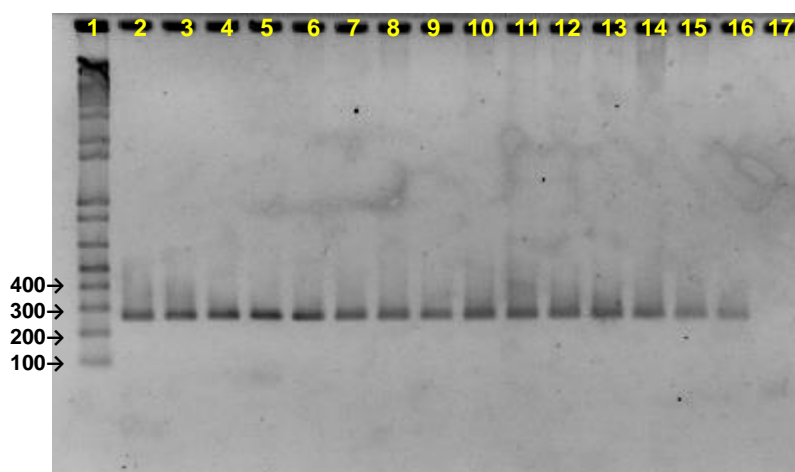


Imagen 1. Detección del gen beta globina de muestras cervicales mediante PCR. 268 pb. Carril 1) marcador de peso molecular, del carril 2 al 16 muestras: VPH-679, VPH-680, VPH-682, VPH-683, VPH-685, VPH-686, VPH-687, VPH-688, VPH-689, VPH-690, VPH-691, VPH-692, VPH-695, VPH-616 y VPH-349, carril 17) blanco de reacción.

La detección de VPH se realizó con los primers PGMY 09/11, el cual tiene un amplificado de 450 pb, el ejemplo de un gel se muestra en la imagen 2.

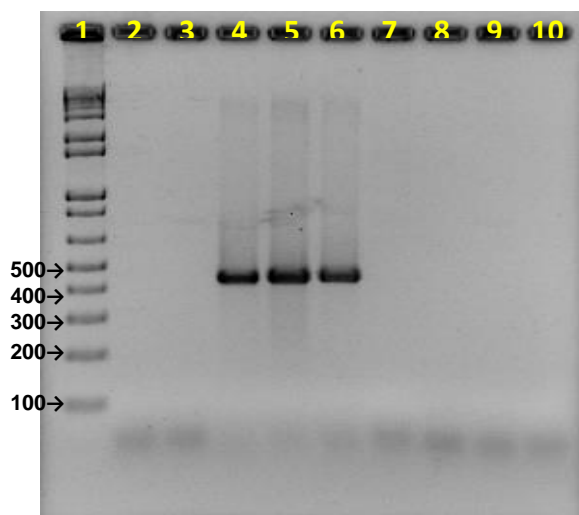
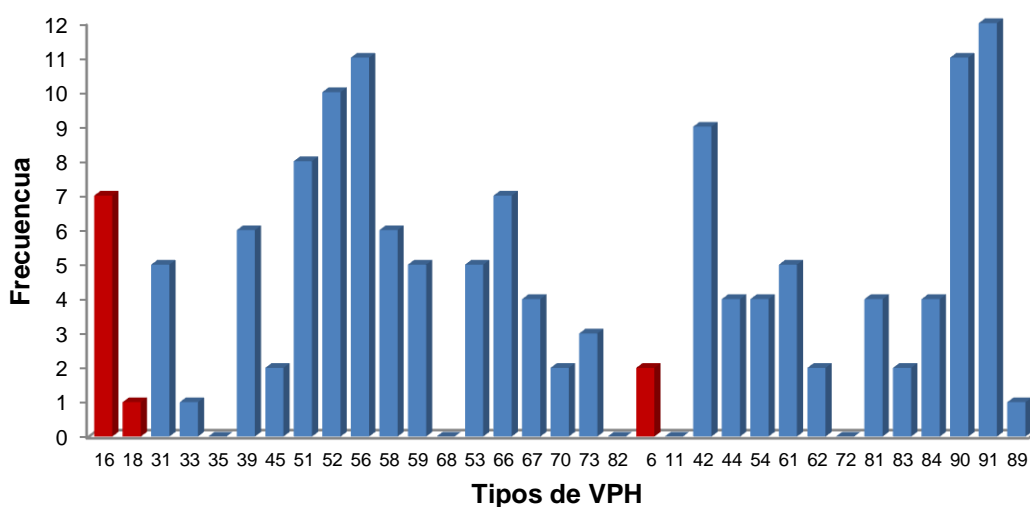


Imagen 2. Detección de VPH, de exudados cervicales, mediante PCR. 450 pb. Carril 1) marcador de peso molecular, carril 2, 3, 7, 8, 9 y 10 muestras negativas (VPH-603, VPH-604, VPH-679, VPH-680, VPH-682, VPH-685), carril 4) control positivo, carril 5 y 6 muestras positivas (VPH-690 y VPH-692).

Resultados de distribución de tipos

Para la distribución de tipos, se consideró únicamente los resultados de la primera toma de muestra que fue de 63 pacientes positivas. De las cuales solo 5 tiene la vacuna contra VPH. El tipo 91 es el que se encuentra con mayor frecuencia con 12 pacientes (8.4%), seguido por los tipos 90 y 56, con 11 pacientes (7.7%) cada uno, el tipo 52 con 10 pacientes (7%) se encuentra en tercer lugar de frecuencia, el tipo 42 con 9 pacientes (6.3%) y el tipo 51 con 8 pacientes (5.6%). Se hace la comparación con los tipos 16 y 18, ya que la bibliografía reporta que son los de mayor incidencia-persistencia y son los principalmente asociados a cáncer. El tipo 16 se encontró en 7 pacientes (4.9%) y el tipo 18 en solo una paciente (0.7%). Otra comparación que también es importante es con los tipos 6 y 11, ya que son los tipos principalmente asociados a la aparición de verrugas genitales, el tipo 6 se encontró solo en 2 pacientes (1.4%) y el tipo 11 no fue detectado en este estudio. Otros tipos que también tienen una alta frecuencia son el 66, con 7 pacientes (4.9%), los tipos 39 y 58 con 6 pacientes (4.2%) cada uno y los tipos 31, 59, 53 y 61 con 5 pacientes (3.5%) cada uno. Los tipos 35, 68, 82, 11 y 72, que pueden ser detectados por el microarreglo utilizado, no estuvieron presentes en ninguna muestra analizada. Las frecuencias de los 28 tipos detectados se muestran en la gráfica 18.



Gráfica 18. Frecuencia de los 27 tipos tipificado por microarreglos y un tipo tipificado por secuenciación.

Resultados de secuenciación

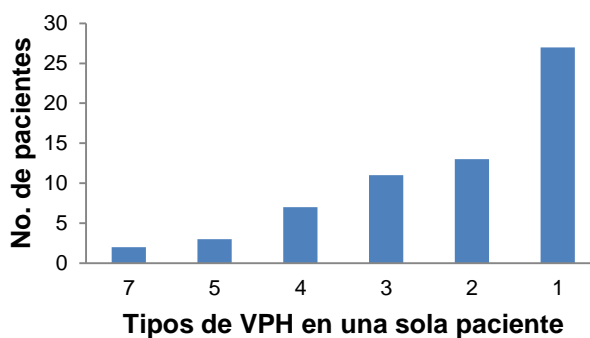
Al ser una muestra positiva a VPH utilizando los primers PGMY 09/11 pero negativa para VPH por la técnica de microarreglo, se decidió secuenciar dicha muestra, el resultados mostró ser positiva al tipo 89, dato mostrado en la gráfica 18. Adicional a esta muestra, y con la finalidad de validar algunos resultados de los microarreglos, se seleccionaron 4 muestras tipificadas por los mismos y se secuenciaron. El resultado se muestra en la tabla 7, en donde se corrobora que tanto el microarreglo y como la secuenciación arrojaron los mismos resultados para los tipos 16, 56, 91 y 81.

Folio de muestra	Microarreglos	Secuenciación
VPH-323	16	16
VPH-342	56	56
VPH-349	No tipificable	89
VPH-523	91	91
VPH-600	81	81

Tabla 7. Comparación de los resultados con microarreglos y secuenciación.

Infección múltiple por VPH

De las 63 muestras positivas, 27 pacientes (43%) estaban infectadas con solo un tipo de VHP, pero más del 50% estuvieron infectadas con 2 o más tipos de VPH, 2 pacientes (3.2%) presentaron 7 tipos diferentes de VPH, gráfica 19. En las infecciones múltiples el VPH tipo 91 se asoció cuatro veces con el tipo 42, cuatro con el tipo 58 y con el tipo 44 se asoció tres veces.



Gráfica 19. Infección múltiple por VPH.

Confirmación del tipo 16 y 18

Para corroborar los resultados del microarreglo para el tipo 16 y 18, a las 63 muestras positivas se les corrió una PCR con primers específicos para el tipo 16 y 18, cada corrida fue independiente. En la imagen 3 se muestra un gel de electroforesis, con 4 muestras (VPH-462, VPH-468, VPH-475, VPH-565) positivas para el tipo 16, que tiene un amplificado de 150 pb. Todas las muestras positivas para el tipo 16 por microarreglo, se confirmaron por los primers específicos. En la imagen 4 se muestra el gel de electroforesis con la única muestra positiva al tipo 18 (VPH-546), que tiene un amplificado de 217 pb.

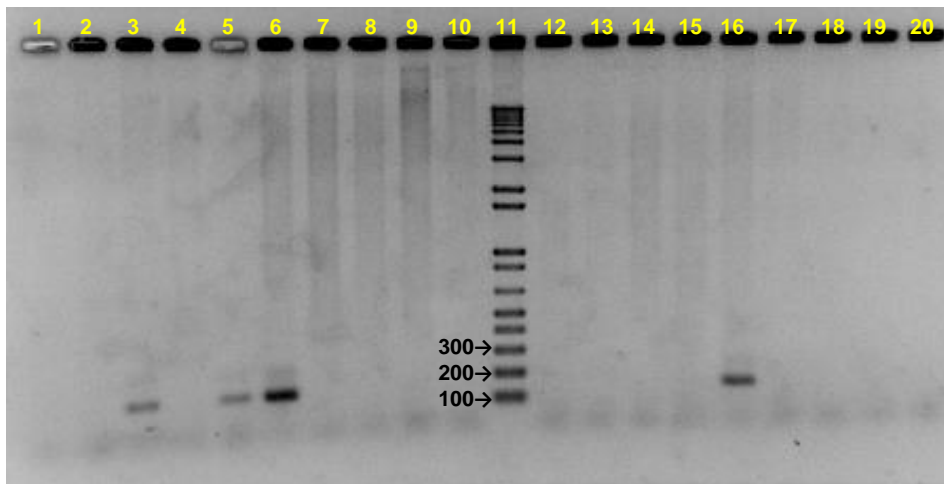


Imagen 3. Detección del VPH tipo 16. 150 pb. Carril 1) Blanco de reacción, carril 11) marcador de peso molecular, carriles 3, 5, 6 y 16 muestras positivas (VPH-462, VPH-468, VPH-475, VPH-565), carriles 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19 y 20, muestras negativas (VPH-460, VPH-464, VPH-470, VPH-482, VPH-491, VPH-523, VPH-546, VPH-551, VPH-553, VPH-561, VPH-575, VPH-597, VPH-602 y VPH-600).

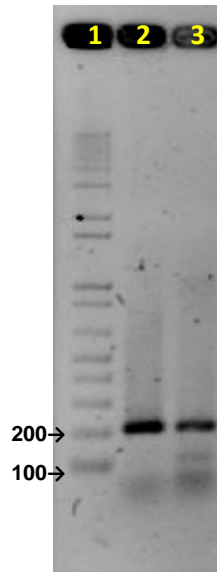


Imagen 4. Detección del VPH tipo 18. 217 pb. Carril 1) marcador de peso molecular, carril 2) control positivo y carril 3) muestra positiva a VPH tipo 18 (VPH-546).

Resultados de persistencia

Para el estudio de persistencia solo se tomaron en cuenta las pacientes que regresaron a los 4 y 8 meses después de la detección del VPH, 20 pacientes solo se tomaron la primera muestra, cuatro pacientes regresaron a los cuatro meses pero no a los ocho, por lo tanto no se tomaron en cuenta para evaluar la persistencia. Cabe señalar que 39 pacientes si regresaron a los 4 y 8 meses, por lo que con estas pacientes se evaluó la persistencia.

Ocho pacientes eliminaron el VPH cuatro meses después de la detección, los tipos que se eliminan son clasificados como cancerígenos (16, 39, 45 y 56), probablemente cancerígenos (66, 70 y 73) y no clasificados (42, 61, 89 y 90). Siete pacientes eliminaron al virus sin la necesidad de tratamiento, solo una paciente recibió crioterapia como tratamiento por lo tanto se eliminó al virus de una forma no natural. El promedio de edad de las pacientes que eliminaron el virus a los cuatro meses es de 23 años. Los datos completos se muestran en la tabla 8.

Folio	Primera toma de muestra	Segunda toma de muestra
VPH-327	73, 39, 90.	Negativo
VPH-349	89	Negativo
VPH-385	66, 61, 56, 90.	Negativo, pero recibió crioterapia
VPH-464	45	Negativo
VPH-470	61	Negativo
VPH-561	42	Negativo
VPH-565	16	Negativo
VPH-686	70	Negativo

Tabla 8. Eliminación del VPH cuatro meses después de la detección.

En la tabla 9 se muestra que tres pacientes eliminaron el VPH a los ocho meses después de la detección, la eliminación de los tipos fue total a los ocho meses, el número de tipos detectados disminuyó a los cuatro meses en el caso de las pacientes con el folio VPH-328 y VPH-475. Solo la paciente con el folio VPH-475 recibió crioterapia como tratamiento. Los tipos que se eliminaron son clasificados como cancerígenos (16, 31, 52), probablemente cancerígeno (67), no clasificados (84, 62, 61) y no cancerígeno (6).

Folio	Primera toma de muestra	Segunda toma de muestra	Tercera toma de muestra
VPH-328	84, 52, 62, 61.	52	Negativo
VPH-475	16, 31, 67	31	Negativo
VPH-553	6	6	Negativo

Tabla 9. Eliminación del VPH ocho meses después de la detección.

Dos pacientes con los folios VPH-385 y VPH-565 eliminaron el VPH a los cuatro meses, entre la segunda y tercera toma de muestra tuvieron relaciones sexuales con nuevas parejas y no usaron ningún método de protección por lo que se volvieron a reinfectar con VPH teniendo tipos diferentes a los que tenían en la primera detección, tabla 10.

Folio	Genotipo Primera toma	Genotipo segunda toma de muestra	Genotipo tercera toma de muestra
VPH-385	66, 61, 56, 90.	Negativo	31, 51.
VPH-565	16	Negativo	66

Tabla 10. Reinfeción por VPH

En la tabla 11, se muestra los porcentajes de persistencia de los tipos de VPH detectados, en base a las tres tomas de muestras de las 39 pacientes, los de mayor persistencia se han relacionado como los principales productores de lesiones cancerosas.

VPH	Persistencia	VPH	Persistencia	VPH	Persistencia	VPH	Persistencia
16	37 %	52	72 %	70	50 %	62	0 %
18	100 %	53	66 %	73	0 %	81	20 %
31	25 %	56	38 %	06	80 %	83	50 %
33	0 %	58	38 %	42	63 %	84	28 %
39	42 %	59	71 %	44	40 %	89	0 %
45	50 %	66	11 %	54	28 %	90	28 %
51	30 %	67	16 %	61	16 %	91	50 %

Tabla 11. Porcentajes de persistencia.

Resultados del Papanicolaou y asociación con el tipo de VPH

Se tomaron 51 muestras de citología exfoliativa, de las cuales 14 (27.5%) tuvieron NIC-1, los tipos que están causando la neoplasia son clasificados como tipos cancerígenos (39, 45, 51, 52, 56, 59), probablemente cancerígenos (68), posiblemente cancerígenos (53, 66), no clasificados como cancerígenos (6) y tipos no clasificados por IARC (44, 81, 83, 90 y 91). Las lesiones son causadas por infecciones con un solo tipo o con más de un tipo. Ninguna de las lesiones fue causada por los tipos 16 o 18. Dos pacientes tuvieron una lesión causada por el tipo 91, tipo que aún no ha sido clasificado por la IARC. La edad promedio de las pacientes es de 23 años, con cuatro años en promedio del inicio de su primera relación, con un promedio de 4 parejas sexuales. En la tabla 12 se muestran los datos completos.

Folio	Tipo de VPH en la primera toma de muestra	Lesión
VPH-322	44, 52.	NIC-1
VPH-381	45, 59, 90.	NIC-1
VPH-393	66, 91, 06, 44	NIC-1
VPH-460	91, 51.	NIC-1
VPH-482	59	NIC-1
VPH-523	91	NIC-1
VPH-551	56, 53.	NIC-1
VPH-553	6	NIC-1
VPH-575	52	NIC-1
VPH-606	59	NIC-1
VPH-615	83, 51.	NIC-1
VPH-161/15	39	NIC-1
VPH-201/15	91	NIC-1
VPH-344/15	81	NIC-1

Tabla 12. Tipos de VPH y lesión causada.

DISCUSIÓN

El virus del papiloma humano se ha mencionado como uno de los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer en orofaringe (D'Souza y cols., 2007 y Kreimer y cols., 2013); sin embargo, en algunos estudios la frecuencia de VPH tipo 16 en boca y faringe es muy baja (Kreimer y cols., 2011 y Sanders y cols., 2012). En México existe un aumento en los casos de cáncer en orofaringe y lengua asociados a una infección por VPH debido a las prácticas sexuales orales (Piña-Sánchez y Alvarado-Cabrero., 2012), es por ello que la población que se estudió fue principalmente jóvenes menores de 25 años, ya que para ellos el sexo oral es una práctica común y hay pocos estudios de detección y tipificación de VPH en estas edades en México. En este estudio después de analizar 125 muestras de exudado faríngeo no se encontró ni una muestra positiva a VPH, esto lo atribuimos a que los pacientes son jóvenes en su mayoría menores de 25 años y si en algún momento se infectaron esta infección fue eliminada. Con base en las encuestas aplicadas el 93 % de los pacientes se cepilla por lo menos dos veces al día los dientes y el 33 % de ellos usa enjuague bucal por lo menos una vez al día, con lo cual se puede considerar que en general tienen una buena higiene bucal. Un factor importante para la progresión de una infección por VPH es el consumo de alcohol y de tabaco, 43.6 % de los pacientes no consume alcohol y 75% de los pacientes dice no fumar, con lo cual el riesgo de progresión de una infección por VPH disminuye considerablemente. De acuerdo a las encuestas el 92% de los jóvenes no usa ningún método de protección durante la relación sexual oral, por lo tanto aumenta el riesgo de una infección no solo de VPH si no de alguna enfermedad de transmisión sexual. Es importante mencionar que la búsqueda fue específicamente en faringe por lo tanto no se descarta una infección por VPH en boca o lengua en los pacientes que resultaron negativos a VPH en faringe.

En cuanto a la detección del VPH en cérvix, actualmente el VPH es una de las infecciones de transmisión sexual más común en todo el mundo, la mayoría de las personas (~75%) que mantienen relaciones sexuales se infectaran con VPH en algún momento de su vida (Baseman y Koutsky., 2005 y Ebrahim y cols., 2005). La gran mayoría de estas infecciones serán asintomáticas y eliminadas dentro de 1-2 años (Richardson y cols., 2003), sin embargo, existe un aumento sustancial en el riesgo de cáncer de cuello uterino en las mujeres que desarrollan la infección persistente por los tipos de VPH de alto riesgo (Ylitalo y cols., 2000). El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia y la persistencia del virus del papiloma humano en personas de 18 a 35 años de edad. Para lo cual se usó la técnica de microarreglos, que en la actualidad es el sistema más sensible y específico para determinar una infección latente, subclínica y activa por VPH, el usar esta técnica molecular nos permitió, detectar la presencia del virus aun sin que haya causado alguna alteración celular que pueda ser detectada por el método de Papanicolaou. De las 157 muestras tomadas, 63 fueron positivas, lo cual representa un 40% de positividad; esto es interesante ya que estas personas son clínicamente sanas y solo 3 tenían diagnóstico previo de VPH. Los tipos 16 y 18 del VPH son los de mayor prevalencia en el mundo y en México, pero en este estudio el tipo 16 solo se encontró en 7 pacientes (4.9%) y el tipo 18 solo se encontró en una paciente (0.7%), se podría pensar que la baja frecuencia se debe a que las pacientes ya están vacunadas, pero de las 63 pacientes positivas solo 5 recibieron la vacuna contra VPH tiempo antes del estudio. Los tipos presentes en estas 5 pacientes fueron los siguientes: 66, 51, 53, 61, 62, 42, 83, 56, 58, y 91. Los tipos 51, 52, 56 son también considerados cancerígenos y se encontraron en mayor frecuencia que el tipo 16 y 18. Otro que se encontró en igual porcentaje que el tipo 18 es el tipo 66, filogenéticamente es considerado como cancerígeno pero en la clasificación de la IARC del 2011, se considera posiblemente cancerígeno, de ahí la importancia de vigilar el comportamiento de este tipo ya que se ha observado un aumento en su frecuencia.

Los tipos con mayor frecuencia en este estudio fueron los tipos 91 y 90 respectivamente, estos no se encuentran aún clasificados por la IARC, pero filogenéticamente no son cancerígenos (Schiffman y cols., 2009), en este estudio dos pacientes que tienen NIC-1, presentaron solo el tipo 91, por lo cual se puede decir que si bien el tipo 91 no se considera cancerígeno, bajo ciertas condiciones inmunológicas que pueden presentar las pacientes, este tipo puede causar cierto daño. Es importante seguir la epidemiología de los tipos 90 y 91, ya que como son de reciente descripción hay pocos estudios sobre su comportamiento.

Otros tipos que también fueron detectados en este estudio y que aún no se encuentran clasificados por la IARC son los tipos: 42, 44, 54, 61, 62, 72, 81, 83, 84, 89. Al igual que con los tipos 90 y 91, estos también filogenéticamente se clasifican como no cancerígenos por lo que no debemos dejar de vigilar su comportamiento epidemiológico ya que es posible que algunos de ellos puedan sufrir algún reacomodo de categoría y considerarse posiblemente cancerígenos o cancerígenos en el futuro cercano.

Como ya se comentó, un gran porcentaje de las infecciones tiene un aclaramiento en un lapso de 1-2 años sin necesidad del tratamiento, pero debido a que en este estudio se detectaron tipos que no están clasificados aún no hay muchos estudios sobre la persistencia de los mismos, es por ello que se realizó un seguimiento de las pacientes durante 4 y 8 meses después de la detección, a los cuatro meses 7 pacientes eliminaron el VPH sin tratamiento. Los tipos eliminados fueron los siguientes: 89, 45, 61, 42, 16, 70, 73, 39, 90. Una paciente tenía presente los tipos 73, 39 y 90 los cuales fueron eliminados a los 4 meses después de la detección sin necesidad de tratamiento. Podemos sugerir que la edad de las pacientes es un factor importante para eliminar tipos cancerígenos como el tipo 16, 39, 45 y 56, aunque para afirmar esto sería necesario realizar un estudio con mujeres de mayor edad.

A los 8 meses, solo tres pacientes eliminaron el VPH, los tipos eliminados fueron el 84, 52, 62, 61, 6. A los 8 meses se volvió a verificar que es posible eliminar algún tipo, aunque este sea considerado persistente y cancerígeno, como el tipo 52.

Otro objetivo fue determinar si existían lesiones celulares causadas por VPH, de las 63 pacientes positivas, a 51 se les realizó la tinción de Papanicolaou, teniendo 14 pacientes (27.5%) con NIC-1, en promedio estas pacientes tiene 23 años de edad, es muy probable que esta lesión pueda ser eliminada sin la necesidad de tratamiento, pero como ya se ha comentado aunque no tenga un tipo que esté considerado como cancerígeno, si la pacientes presenta algún grado de inmunocompromiso, es muy probable que tipos que no son considerados como cancerígenos puedan causar alguna lesión.

Una ventaja importante del microarreglo sobre la demás técnicas moleculares para la detección del VPH, es que se puede detectar infecciones múltiples por VPH, en este estudio solo 27 pacientes (43%) tenía un solo tipo, fue posible determinar una paciente que tenía hasta 7 tipos diferentes de VPH, el estar infectado con múltiples tipos de VPH favorece un estado de persistencia y por lo tanto se aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar alguna lesión cancerosa.

Una forma de validar la detección por el microarreglos que usamos fue la secuenciación, por ello, cuatro muestras que fueron tipificadas por microarreglo fueron secuenciadas por el método de Sanger, dando igual resultado. Estas muestras tenían el tipo 16, 56, 91 y 81. Se eligieron muestras que solo presentaran un tipo de VPH, ya que no es posible hacer detección múltiple de VHP por secuenciación.

CONCLUSIONES

- No se encontraron muestras positivas de VPH faríngeo.
- 63 pacientes (40%) en el estudio cervical fueron positivas para VPH.
- El tipo 91 se encontró con mayor frecuencia en 12 pacientes (8.4%), seguido por los tipos 90 y 56, en 11 pacientes (7.7%), el tipo 16 se encontró en 7 pacientes (4.9%) y el tipo 18 en solo una paciente (0.7%).
- 7 pacientes (17.9%) eliminaron al VPH cuatro meses después de la detección, sin necesidad de tratamiento médico.
- 2 pacientes (5.1%) eliminaron al VPH ocho meses después de la detección sin tratamiento médico.
- En este estudio los tipos 18, 45, 53, 59, 70, 06, 42, 83 y 91 tienen porcentajes de persistencia igual o mayor al 50%.
- El 57% de las infecciones son causadas por una infección múltiple por VPH con dos o más tipos.
- De 51 papanicolaou, 14 pacientes (27.5%) tuvieron NIC-1.
- Ni una de las lesiones cervicales fue causada por el tipo 16 o 18 de VPH.
- Dos pacientes que tuvieron NIC-1, el tipo detectado fue el 91.

PERSPECTIVAS

- Realizar el mismo estudio con otro rango de edades.
- Realizar estudios en mujeres que presenten lesiones mayores como NIC-2, NIC-3 o cáncer, para buscar los tipos que en este estudio se detectaron pero que aún no están clasificados por la IARC.
- Se sugiere seguir con la búsqueda del VPH pero ahora en la boca y lengua, ya que con las prácticas sexuales orales, es de esperar un aumento en las infecciones por VPH.
- Otro estudio interesante sería hacer la detección en pene, ya que hay muy pocos estudios sobre la detección y tipificación del VPH en hombres.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Lemarroy A., Vallejo-Ruiz V., Cortés-Gutiérrez E. I., Salgado-Bernabé M. E., Ramos-González N. P., Ortega-Cervantes L., Arias-Flores R., Medina-Díaz I. M., Hernández-Garza F., Santos-López G. and P. Piña-Sánchez. (2015). Human Papillomavirus Infections in Mexican Women with Normal Cytology, Precancerous Lesions, and Cervical Cancer: Type-Specific Prevalence and HPV Coinfections. *Journal of Medical Virology*, 87:871–884.

Baseman J. G. and Koutsky L. A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 32S, S16–S24.

Bucka C. B., Daya P. M., and Trusb B. L. (2013). The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology*, 445(0), 169–174.

Burd E. M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical microbiology reviews*, 1–17.

Chung C. H., Bagheri A. and D'Souza G. (2014). Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral Oncology* 50, 364–369.

Conway M.J. and Meyers C. (2008). Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res*, 88(4):307-317.

D'Souza G., Fakhry C., Sugar E. A., Seaberg E. C., Weber K., Minkoff H. L., Anastos K., Palefsky J. M. and Gillison M. L. (2007). Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int. J. Cancer*: 121, 143–150.

D'Souza G., Kreimer A.R., Viscidi R., Pawlita M., Fakhry C, Koch W. M., Westra W. H., and Gillison M. L. (2007). Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* 356:19.

D'Souzaa G. and Dempseyb A. (2011). The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med.* 1:53(1), S5-S11.

Day P. M., Lowy D. R., and Schiller J. T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307, 1–11.

De Roda Husman A.M., Walboomers J. M. M., Van den Brule A. J. C., Meijer C. J. L. M. and Snijders P. J. F. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76, 1057-1062.

De Sanjosé S., Díaz M., Castellsagué X., Clifford G., Bruni L., Muñoz N., Bosch F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect*, 7: 453–59.

Desarrollo, Evolución y Estadística del Virus del Papiloma Humano. Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Número 16 | Volumen 31 | Semana 16 | Del 13 al 19 de abril del 2014.

Doorbar J. Ely S. Sterling J. McLean C. y Crawford. (1991). Specific interaction between HPV16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352, 824-827.

Doorbar J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology* 32S, S7-S15.

Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I. G., Stoler M., Broker T. R. and Stanley M. A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 30S, F55–F70.

Ebrahim S. H., McKenna M. T. and Marks J. S. (2005). Sexual behaviour: related adverse health burden in the United States. *Sex Transm Infect*, 81:38–40

Evander M., Frazer I. H., Payne E., Qi Y. M, Hengst K., and Mcmillan N. A. J. (1997). Identification of the $\alpha 6$ Integrin as a Candidate Receptor for Papillomaviruses. *Journal of virology*, 2449–2456.

Frazer I. H., Leggatt G. R., and Mattarollo S. R. (2011). Prevention and Treatment of Papillomavirus-Related Cancers through Immunization. *Annu. Rev. Immunol.* 29:111–38.

González-Ramírez I., Irigoyen-Camacho M. E., Ramírez-Amador V., Lizano-Soberón M, Carrillo-García A., García-Carranca A, Sánchez-Pérez Y., Méndez-Martínez R., Granados-García M., Ruíz-Godoy L.M. and García-Cuellar C.M. (2013). Association between age and high-risk human papiloma virus in Mexican oral cancer patients. *Oral Diseases*, 19, 796–804.

Gravitt P. E., Peyton C. L., Alessi T. Q., Wheeler C. M., Coutlée F., Hildesheim A., Schiffman M. H., Scott D. R. and Apple R. J. (2000). Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology*. 38:1, 357–361.

Hamid N. A., Brown C., and Gaston K. (2009). The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1700 – 1717.

Horvath C. AJ, Boulet G, AV, Renoux V. M., Delvenne P. O. and Bogers John-Paul J. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology Journal*, 7:11, 2-7.

Howie H. L., Katzenellenbogen R. A. and Galloway D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384,324–334

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France – 2012.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. VOLUME 90.

Kreimer A. R., Villa A., Nyitray A. G., Abrahamsen M., Papenfuss M., Smith D., Hildesheim A., Villa L. L., Lazcano-Ponce E., and Giuliano A. R. (2011). The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 20(1), 172-182.

Kreimer A. R., Campbell C. M. P., Lin Hui-Yi, Fulp W., Papenfuss M. R., Abrahamsen M., Hildesheim A., Villa L. L., Salmerón J. J., Lazcano-Ponce E. and Giuliano A. R. (2013). Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *The Lancet*, 382(9895), 877 – 887.

Longworth M. S. and Laimins L. A. (2004). Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68:2, 362–372.

López-Saavedra y Lizano-Soberón. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1:31-55.

Maglennon G. A. and Doorbar J. (2012). The Biology of Papillomavirus Latency. *The Open Virology Journal*, 6, (Suppl 2: M4) 190-197.

McPhillips M. G., Oliveira J. G., Spindler J. E., Mitra R., and McBride A. A. (2006). Brd4 Is Required for E2-Mediated Transcriptional Activation but Not Genome Partitioning of All Papillomaviruses. *Journal of virology*. 80:19, 9530–9543.

Moody C. A. and Laimins L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10:8, 550-560.

Münger K. and Howley P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*, 89, 213-228.

Münger K., Baldwin A., Edwards K. M., Hayakawa H., Nguyen C. L., Owens M., Grace M., and Huh K. (2004), Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of virology*, 11451–11460.

Muñoz N., Castellsagué X., De González A. B. and Gissmann L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24S3, S3/1–S3/10.

Naylor S. J., Allard U., Taylor L., Cooper K. (1999). HHV-8 (KSHV) is not associated with bacillary angiomatosis. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 52:345–348.

Piña-Sánchez P., Hernández-Hernández D.M., López-Romero R., Vázquez-Ortiz G., Pérez-Plasencia, Lizano-Soberón M., González-Sánchez J.L., Cruz-Talonia F. And Salcedo M. (2006). Human papillomavirus–specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer*, 16, 1041–1047.

Piña-Sánchez P. y Alvarado-Cabrero Isabel. (2012). Infección del virus del papiloma humano como un factor de riesgo para carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *GAMO* 11 (3), 175-181.

Richardson H., Kelsall G., Tellier P., Voyer H., Abrahamowicz M., Ferenczy A., Coutlee F. and Franco E. L. (2003). The Natural History of Type-specific Human Papillomavirus Infections in Female University Students. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12, 485–490.

Romanczuk H. and Howley P. M. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3159-3163.

Sánchez-Vargas L. O., Díaz-Hernández C. and Martínez-Martínez A. (2010). Detection of Human Papilloma Virus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. *Infectious Agents and Cancer*, 5:25.

Sanders A.E., Slade G. and Patton L.L. (2012). National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U.S. adult population. *Oral Diseases*, 18, 430–441.

Schiffman M., Castle P. E, Jeronimo J., Rodriguez A. C, Wacholder S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 370:890–907.

Schiffman M., Clifford G. and Buonaguro F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer*, 4:8

Smith Elaine M., Swarnavel S., Ritchie J. M., Wang D., Haugen T. H., and Turek L. P. (2007). Prevalence of Human Papillomavirus in the Oral Cavity/Oropharynx in a Large Population of Children and Adolescents. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26: 9, 836-840.

Thomas M., Pim D. and Banks L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18, 7690 -7700.

Van Den Brule A. J. C., Meijer C. J. L. M., Bakels V., Kenemans P., and Walboomers J. M. M. (1990). Rapid Detection of Human Papillomavirus in Cervical Scrapes by Combined General Primer-Mediated and Type-Specific Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28:12, 2739-2743.

Velázquez-Márquez N., Paredes-Tello M. A., Pérez-Terrón H., Santos-López G., Reyes-Leyva J. and Vallejo-Ruiz V. (2009). Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*, 13, 690-695.

De Villiers Ethel-Michele, Fauquet C., Broker T. R., Bernard Hans-Ulrich and Hausen H. Z. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.

Wang J. W. and Roden R. B.S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 445(0), 175–186.

White P. W., Titolo S., Brault K., Thauvette L., Pelletier A., Welchner E., Bourgon L., Doyon L., Ogilvie W. W., Yoakim C., Cordingley M. G., and Archambault J. (2003). Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *The journal of biological chemistry*, 278: 29, 26765–26772.

Wilson V. G., West M., Woytek Kelly., Rangasamy D. (2002). Papillomavirus E1 Proteins: Form, Function and Features. *Virus Genes*, 24:3, 275-290.

Yim Eun-Kyoung and Park Jong-Sup. (2005). The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 37(6):319-324.

Ylitalo N., Josefsson A., Melbye M., Sorensen P., Frisch M., Andersen P. K., Sparen P., Gustafsson M., Magnusson P., Ponten J., Gyllensten U., and Adami Hans-Olov. (2000). A Prospective Study Showing Long-Term Infection with Human Papillomavirus 16 before the Development of Cervical Carcinoma *in Situ*. *Cancer research* 60, 6027–6032.

Zandberg D. P., Bhargava R., Badin S., Cullen K. J. (2013). The Role of Human Papillomavirus in Nongenital Cancers. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63:57–81.

ANEXOS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

H. Puebla de Zaragoza a _____ de _____ del _____

Por medio de la presente yo, _____ con domicilio en _____, con número de matrícula _____ alumno de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, autorizo y acepto participar en el proyecto de investigación clínica denominado "Diagnostico de Virus del Papiloma Humano en población universitaria". El cual es coordinado por la Dirección de Acompañamiento Universitario (DAU), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) y el Centro de Detección Biomolecular (CDB) de la BUAP.

El objetivo del estudio es: Identificar la incidencia y persistencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) en personas de 18-35 años en cavidad oral cómo y en órganos sexuales, tanto en hombres como en mujeres.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Contestar un test de evaluación clínica y se me realizara un exudado oral (para VPH en cavidad oral) y/o una colposcopia (para VPH en órganos sexuales, en mujeres).

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Inconvenientes y molestias para colposcopia: Es normal tener algunos cólicos leves, manchados vaginales y un flujo de color oscuro durante algunos días. El flujo oscuro se debe a la medicación aplicada en el cuello uterino. No tener relaciones sexuales 24 horas después del procedimiento de colposcopia.

Inconvenientes y molestias para exudado oral: No hay molestias ni inconvenientes.

Los beneficios: Colaborar con un estudio clínico, identificación del tipo de VPH que es posible que tenga, ya que algunos tipos de VPH tiene riesgo oncogénico.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Al mismo tiempo me comprometo a que se me realice un seguimiento, si el resultado para VPH es positivo, este seguimiento será a los 4 y 8 meses posteriores a primera toma de muestra, aunque este intervalo de tiempo puede variar dependiendo las necesidades de la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte mi condición de estudiante.

Nombre y firma

Número de teléfono

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dra. María Lilia Cedillo Ramírez 2229-55-00, EXT. 2990.

Cuestionario para VPH en cavidad oral

Aviso de confidencialidad

Por favor responde las siguientes preguntas, las respuestas son confidenciales y solamente serán utilizadas en el proyecto de investigación. Los responsables y participantes del proyecto nos comprometemos a no divulgar las respuestas ni los datos aquí requeridos a ninguna persona ajena al proyecto.

Nombre:	Edad:	Sexo:
Correo electrónico:	Número de matrícula:	
Escuela o Facultad:	Número de teléfono:	
Fecha de toma de muestra:		

1. ¿A qué edad tuviste tu primera relación sexual?
2. ¿Cuántas parejas sexuales has tenido desde inicio de tu vida sexual?
3. ¿Qué tan frecuente tienes relaciones sexuales?
4. ¿Usas algún método anticonceptivo? ¿Cuál?
5. ¿Eres regular en cuanto al uso de este método anticonceptivo?
6. ¿Has practicado sexo oral?
7. ¿Te han practicado sexo oral?
8. ¿Cuál es tu orientación sexual?
9. Si has practicado o te han practicado sexo oral ¿Has usado algún tipo de protección?
10. ¿Cuántas veces al día te cepillas los dientes?
11. ¿Usas algún tipo de enjuague bucal? Si usas el enjuague bucal ¿Que marca es el enjuague que usas?
12. ¿Con que frecuencia usas este enjuague bucal?
13. ¿Con que frecuencia consumes alcohol?
14. ¿Con que frecuencia consumes tabaco?
15. ¿Has tenido infecciones en la boca o garganta?
16. ¿Qué tan frecuentes son estas infecciones?
17. ¿Cuál es tu lugar de origen?

Cuestionario para VPH en órganos sexuales

Aviso de confidencialidad

Por favor responde las siguientes preguntas, las respuestas son confidenciales y solamente serán utilizadas en el proyecto de investigación. Los responsables y participantes del proyecto nos comprometemos a no divulgar las respuestas ni los datos aquí requeridos a ninguna persona ajena al proyecto.

Nombre:	Edad:	Sexo:
Correo electrónico:	Número de matrícula:	
Escuela o Facultad:	Número de teléfono:	
Fecha de toma de muestra:		

1. ¿Cuál fue la fecha de tu última menstruación?
2. ¿Eres regular en cuanto a la fecha de menstruación?
3. ¿A qué edad tuviste tu primera relación sexual?
4. ¿Cuántas parejas sexuales has tenido desde inicio de tu vida sexual?
5. ¿Qué tan frecuente tienes relaciones sexuales?
6. ¿Usas algún método anticonceptivo?
7. ¿Eres regular en cuanto al uso de este método anticonceptivo?
8. ¿Qué método anticonceptivo es?
9. ¿Has padecido de infecciones vaginales?
10. ¿Qué tan frecuente son estas infecciones vaginales?
11. ¿Alguna vez te han realizado un Papanicolaou?
12. ¿Cuántas veces te han realizado el Papanicolaou y cuales fueron la fechas de ese estudio?
13. ¿Cuál fue el resultado de ese estudio?
14. ¿Has practicado sexo oral?
15. ¿Te han practicado sexo oral?
16. ¿Te han practicado sexo anal?
17. ¿Has presentado lesiones características de VPH?
18. ¿Lugar de origen?

PBS 10X

Pesar 40 gramos de NaCl, 1 gramo de KCl, 5.75 gramos de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 gramo de KH_2PO_4 , disolver en 300 mL de agua tridestilada filtrada en un agitador y aforar a 500 mL. Esterilizar a 121°C/20 minutos.

PBS 1X

Medir 50 mL de PBS 10X y aforar con agua tridestilada filtrada a 500 mL, ajustar pH a 6.8 con ácido acético y esterilizar a 121°C/20 minutos.