

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



IDENTIFICACIÓN DE *VPH* EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD

POR

C.D. DANIELA GARCÍA SANTOS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

JULIO, 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



IDENTIFICACIÓN DE *vph* EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD

POR

C.D. DANIELA GARCÍA SANTOS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JULIO DE 2019

IDENTIFICACIÓN DE *VPH* EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD

Comité de Tesis

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Presidente

Secretario

Vocal

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero expresar mi agradecimiento más sincero a la M.A. Myriam Angélica de la Garza Ramos, directora de tesis por su apoyo invaluable durante todo el proceso en la elaboración de este estudio. Así como también a la M.C. Rosalva González Meléndez, codirectora de tesis por sus enriquecedoras sugerencias y por formar parte del comité; a la Ing. Sayuri Alexandra Victoria Velasco por su valiosa colaboración, aportación y gran interés en el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), por permitirme el uso de su equipo y su ayuda para el desarrollo de este estudio.

A la Facultad de Odontología de la UANL, así como también a la Directora en gestión, la Dra. Akemi Argelia Nakagoshi Cepeda por abrirme las puertas de esta institución; al Posgrado de la Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría, así como a las coordinadoras de éste durante mi estancia, la Dra. Sonia M. López Villarreal y la Dra. Marcela Montes Villarreal por haberme dado la oportunidad de formar parte de su seno académico; a mis maestros formadores, personas de gran sabiduría.

DEDICATORIA

*A Dios y a mi familia,
en especial a mi madre la Profra. Olivia Santos Cervantes
por su apoyo incondicional,
mi hermano el Dr. Juan José García Santos
por su aporte metodológico,
mi hermano Carlos Alejandro García Santos
por el apoyo moral que siempre me ha brindado
y a mi padre el Dr. Juan José García Miranda
que sé que desde el cielo cuida de mí.*

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
TABLA DE CONTENIDO.....	III, IV
LISTA DE GRÁFICAS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VI
NOMENCLATURA.....	VII, VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1,2
1.1. HIPÓTESIS.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. Objetivos generales.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Características del Virus del Papiloma Humano.....	5
2.2. Epidemiología.....	6
2.3. Transmisión.....	6,7
2.4. Manifestaciones clínicas.....	8
2.4.1. Diferentes tipos de lesiones.....	8,9
2.4.2. El VPH en los distintos tipos de cáncer.....	9
2.4.3 Relación con el Carcinoma de Células Escamosas Orofaringeas.....	9
2.5. Tratamiento.....	10
2.5.1. Prevención primaria o preventiva.....	10
2.5.2. Reacciones en niños y niñas ante la vacuna del VPH.....	11

2.6. Características microbiológicas para PCR.....	11, 12
2.7. Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR).....	12
2.8. Oligonucléotidos.....	13
2.9. Electroforesis.....	13,14
3. MÉTODOS.....	15
3.1. Muestra del estudio.....	15-17
3.2. Recolección de muestras y datos.....	18,19
3.3. Extracción del ADN.....	20
3.4. Detección del VPH.....	21,22
3.5. Electroforesis.....	23-25
4. RESULTADOS	26-30
5. DISCUSIÓN.....	31, 32
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
REFERENCIAS.....	34- 41
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	42

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Porcentaje en cuanto al sexo.....	26
2. Frecuencia de edad.....	27
3. Porcentaje en proporción al resultado (positivo o negativo).....	27
4. Detección en función del sexo.....	28
5. Distribución de la muestra en función de la edad.....	29
6. Frecuencia de edad en sexo masculino.....	29
7. Distribución en función del sexo, detección y edad.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Recolección de muestras orales por medio de citología exfoliativa.....	15
2. Invitación a los padres o tutores para la participación al estudio.....	16
3. Consentimiento informado.....	17
4. Raspado oral en piso de la lengua.....	18
5. Raspado oral de carrillos.....	18
6. Raspado oral de paladar duro y blando.....	19
7. Muestra oral en solución conservante.....	19
8. Extracción de ADN.....	20
9. Colocación del ADN en el Termociclador (PCR).....	21
10. Electroforesis del gel de acrilamida al 8%.....	24
11. Colocación del transiluminador de luz ultravioleta.....	24
12. Resultados de la PCR digitalizados.....	25

NOMENCLATURA

VPH	Virus del Papiloma Humano
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribosomal
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TE	Buffer de Tris y EDTA
OSCC	Carcinoma Oral de Células Escamosas
OPSCC	Carcinoma de Células Escamosas Orofaringeas
°C	Grado centígrado
g	Gramos
µL	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
h	Hora

NOMENCLATURA

s	Segundo
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milimetro
M	Molar
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio

C.D. Daniela García Santos

Fecha de graduación: julio de 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Título del estudio: IDENTIFICACIÓN DE *VPH* EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD

Número de páginas: 41

Candidata para el grado de
Maestría
en Ciencias Odontológicas en el
Área de Odontopediatría

RESUMEN

Introducción: En la actualidad, el cáncer permanece como un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en países en desarrollo, incluido México, constituyendo una de las causas más importantes de mortalidad. Estudios recientes han asociado al Virus del Papiloma Humano (VPH) con el desarrollo de cáncer oral, principalmente el carcinoma oral de células escamosas (OSCC), representando un riesgo importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. **Objetivo:** En el presente trabajo se llevó a cabo la identificación del Virus del Papiloma Humano en pacientes infantiles provenientes de Monterrey y su área metropolitana. **Metodología:** Se realizó la recolección de muestras orales tomadas a niños de 4 a 8 años de edad por medio de cytobrush (swap), posteriormente se realizó la extracción del DNA genómico, la amplificación y observación de células por medio de PCR Tiempo Real para su analización y detección del VPH presente en las muestras. **Resultados:** De la muestra conformada por 74 pacientes infantiles, 34 fueron femeninos y 40 masculinos se presentó una prevalencia del 34% para el VPH. **Conclusiones:** Estos resultados evidenciaron una importante prevalencia de infección por VPH en la cavidad oral de pacientes infantiles por lo que es de suma importancia dar atención temprana e implementar medidas preventivas para evitar su propagación.

Asesora: M.A. Myriam Angélica de la Garza Ramos

C.D. Daniela García Santos

Fecha de graduación: julio de 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Título del estudio: IDENTIFICACIÓN DE *VPH* EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD

Número de páginas: 41

Candidata para el grado de
Maestría
en Ciencias Odontológicas en el
Área de Odontopediatría

ABSTRACT

Introduction: Today, cancer remains a global public health problem, mainly in developing countries, including Mexico, and is one of the most important causes of death. Recent studies have associated the Human Papilloma Virus (HPV) with the development of oral cancer, primarily oral squamous cell carcinoma (OSCC), representing a significant morbidity and mortality risk worldwide. **Objective:** In the present work, the identification of the Human Papilloma Virus in child patients from Monterrey and its metropolitan area was carried out. **Methodology:** Oral samples were collected from children aged 4 to 8 years old by means of cytobrush (swap), then genomic DNA was extracted, amplification and observation of cells by means of Real Time PCR for analysis and detection of HPV present in the samples. **Results:** Of the 74 child patients in the sample, 34 were female and 40 were male with a 34% prevalence of HPV. **Conclusions:** These results showed a significant prevalence of HPV infection in the oral cavity of child patients and it is therefore of utmost importance to provide early care and implement preventive measures to avoid its spread.

Asesora: M.A. Myriam Angélica de la Garza Ramos

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de papiloma humano (*VPH*), es la infección de transmisión sexual más común en el mundo, afectando principalmente a adultos sexualmente activos (Sánchez-Hernández et al, 2017). Sin embargo, en el caso de niños se han descrito infecciones cutáneas, así como en la mucosa oral, nasal y genital (De Guglielmo et al, 2015). En la actualidad se han logrado identificar más de doscientos tipos virales clasificados según la homología de sus genomas, y de acuerdo al riesgo de transformación maligna de la siguiente forma: bajo riesgo: 6, 11, 32, 42, 43, 44, 54 y 81; riesgo intermedio: 50, 51, 52, 53, 58 y 83, y alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 56, 59, 66, 68 y 70. Muchas veces, estas infecciones son asintomáticas pasando desapercibidas, a no ser que se empleen métodos moleculares (Medina et al, 2012).

Se ha reportado en la literatura como la citología por cepillado es el mejor método para la obtención de material y la detección de *VPH* con 100% de correlación con el diagnóstico morfológico de *VPH* (Melo et al, 2005), debido a que los fluidos bucales contienen abundantes células con materiales genéticos, así como proteínas que pueden permitir la detección de *VPH* y alteraciones en las células infectadas pueden ayudar a la detección temprana de *HPV* clasificado para formación de CO (Linxweiler et al, 2015). Uno de los métodos más exactos disponibles es la PCR tiempo real, pero está sujeto a variaciones, siendo ésta una técnica muy interesante para estudios epidemiológicos por la información brindada.

La PCR es altamente sensible detectando tan poco ADN viral, como 0,001 copia por genoma a partir de muestras tumorales, plasma o colecciones salivales. También se puede evaluar la carga viral e identificar el subtipo viral sondeando para la región L1 del genoma del VPH (Sritippho et al, 2015) (Shaikh et al, 2015). Sin embargo, todos los métodos basados en la PCR tienen limitaciones para la detección de infecciones múltiples debido al número de tipos de *VPH* detectables, así como la diferencia en la sensibilidad para distinguir tipos de *VPH* entre diferentes sistemas usados y la reproducibilidad de los diferentes métodos de *VPH* para la determinación del tipo exacto de *VPH* en la muestra (Medina, et al., 2012). Esto debido a que, la sensibilidad y especificidad de los métodos PCR puede variar dependiendo solamente de las siguientes condiciones: métodos de muestreo; transporte; sets de primers (Qu et al, 1997), el tamaño de los productos de la PCR, condición de la reacción, funcionamiento del ADN polimerasa empleada en la reacción, procedimientos de extracción de ADN, cantidad de ADN de VPH amplificado y habilidad para detectar múltiples tipos (Iftner y Villa, 2013).

Dado que el VPH no puede ser propagado en cultivo, su identificación se basa en estas técnicas de biología molecular. Con un genoma bicatenario de aproximadamente 8.000 pares de bases, las pruebas de elección para detectar el VPH en muestras clínicas se basan en la utilización de sondas de ácidos nucleicos. El único procedimiento que es capaz de detectar todos los tipos de VPH y sus variantes presentes en una muestra biológica es la secuenciación del ADN del genoma viral por secuenciación directa o PCR (Kerr et al, 2015) (Liu et al, 2015).

1.1. HIPÓTESIS

Existe una alta prevalencia de infección por el Virus del Papiloma Humano en cavidad oral en pacientes infantiles que acuden a consulta en el Posgrado de la Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría de la U.A.N.L.

1.2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se pretende determinar la prevalencia del VPH en niños en edades comprendidas de los 4 a 8 años de edad debido a que estudios recientes han establecido una estrecha relación entre el VPH con cáncer oral como lo es el Cáncer de células escamosas (OSCC) para la obtención de datos importantes para la elaboración de vacunas eficaces para mayor población.

1.2.1. Objetivos Generales

Determinar la prevalencia de VPH en pacientes infantiles de 4 a 8 años de edad que acuden al posgrado de Infantil de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L. provenientes de Monterrey y su área metropolitana.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Establecer un diagnóstico en base a los hallazgos citológicos de las muestras de cavidad oral de los pacientes en estudio.
- Identificación del *VPH* en base a su PCR en muestras de cavidad oral de los pacientes en estudio.
- Determinar prevalencia de aquellos pacientes con resultado positivo junto con un análisis estadístico y reporte de datos.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1. Características del Virus del Papiloma Humano

El *Virus del Papiloma Humano* (VPH), es un virus pequeño de ADN con un diámetro aproximado de 52 a 55 nm (Sanabria, 2009), de doble cadena circular con 8,000 pares de bases, no cuenta con envoltura, sino con un núcleo cápside proteica icosaédrica con 72 capsómeros y 8 pares de bases, que proviene de la familia Papovaviridae incluida dentro del género de Papilomavirus que afecta células escamosas del epitelio del tracto genital bajo (como vagina, vulva, cuello uterino y ano), así como epitelio oral y nasal (Alfaro y Fournier, 2013).

El genoma del *VPH*, lo conforman dos tipos de genes, aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como genes E (del inglés Early = temprano), representan el 50% del genoma, y aquellos que son codificados durante las etapas tardías del ciclo de replicación del mismo, conocidos como L (del inglés Late = tardío), que representan un 40% del genoma. Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (aunque E4 se considera un gen tardío); y dos tardíos: L1 y L2, los cuales codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral (Sanabria, 2009); y una región reguladora, no codificadora (RNC/LCR), situada en dirección 5', la cual representa el 10% del genoma (Mateos-Lindemann et al, 2016). Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica por la actividad de sus oncoproteínas E6 y E7 (Lizano-Soberón, 2009).

En la actualidad, existen “más de 100 tipos de *VPH*” (OMS, 2015), aproximadamente 120, de los cuales sólo de 100 se conoce su secuencia genómica completa (García-Cuellar et al, 2004).

2.2. Epidemiología

Cada año en los Estados Unidos se presentan 14 millones de nuevas infecciones causadas por el *Virus del Papiloma Humano*. La incidencia de cánceres asociados con el *VPH* aumentó entre 2004 y 2012 en los Estados Unidos, lo que sugiere un aumento de la carga de la infección por *VPH* (Razzaghi et al, 2018). Por otro lado, la *International Agency for Research on Cancer (IARC)* estableció la presencia de *VPH* en 3.9% de los cánceres orales y el 18.3% en los carcinomas de células escamosas en orofaringe. Los subtipos 16 y 18 de *VPH* se encuentran en un 80% de los cánceres, mientras que los subtipos 31, 33 y 35 son menos frecuentes, encontrándose sólo en un 3% (Cháirez et al, 2015). La proporción de carcinoma de células escamosas orofaríngeas en todos los grupos de edad con *VPH* positivo aumentó de 21% en la década de los 90's, a un 70% en la actualidad; y, si continúan las tendencias, entonces el carcinoma de células escamosas orofaríngeas (*OPSCC*) se convertirá en el cáncer más común asociado al *VPH* para el 2020 (Razzaghi et al, 2018).

En México se tiene estimado que cerca del 43% de los hombres y el 17.5% de las mujeres, todos ellos sanos y sexualmente activos, tienen alguna infección por *VPH* (Ibieta et al, 2005).

2.3. Transmisión

La infección por el *virus de papiloma humano (VPH)*, es la infección de transmisión sexual más común en el mundo, afectando principalmente a adultos sexualmente activos (Sánchez-Hernández et al, 2017). Aunque generalmente se adquiere por vía sexual, también puede contraerse verticalmente de madre a hijo, por contacto con la mucosa cervical durante el parto, por vía transplacentaria y, menos frecuente por transmisión horizontal durante la infancia (Erickson et al, 2013).

Sin embargo, en el caso de niños se han descrito infecciones cutáneas, así como en la mucosa oral, nasal y genital. Se considera que las vías de transmisión viral a la mucosa oral y/o genital de recién nacidos incluyen la transmisión perinatal, ya sea durante el parto natural, la cesárea o en el útero (a través del semen durante la fertilización, por una infección ascendente desde el tracto genital de la madre o a través de la placenta), abuso sexual, auto y heteroinoculación y por contacto directo con objetos o superficies contaminados (De Guglielmo et al, 2015).

Recientemente, Mora y col. analizaron los factores asociados con la infección por *VPH* en menores de 8 años que convivían con pacientes infectadas por el virus, encontrando una alta prevalencia viral de bajo riesgo oncogénico (71,4 %). Los autores señalaron que prácticas comunes entre familias de condición socioeconómica diversa, tales como lavar la ropa de la madre en conjunto con la del menor de edad y el uso compartido de toallas, sábanas y jabón de baño, son reflejo del desconocimiento por parte de las madres de las vías de transmisión viral y sus consecuencias clínicas a mediano y largo plazo y, además, esta conducta pudiera favorecer la transmisión vertical del *VPH* sin la ocurrencia de contacto sexual. Esto resalta la importancia de programas de educación sobre el tema para la población (Mora et al, 2013).

2.4. Manifestaciones clínicas

Los papilomas son virus de ácido desoxirribonucleico, perteneciente a la familia PAPOVA, nombre que proviene de las iniciales PA (papiloma), PO (polioma) y VA (vascularización simianos). Afectan principalmente las células epiteliales de piel y mucosa, pero por lo general penetran en la capa basal; son termoestables, poseen un ciclo de desarrollo lento y producen una amplia gama de lesiones proliferativas tanto en los epitelios como en las mucosas. Además, son inertes en el medio extracelular, y sólo se reproducen en células vivas (huésped); algunos se replican dentro del núcleo y producen transformación de las células, dando lugar a una proliferación neoplásica que causa 7 diferentes clases de papilomas (verrugas o condilomas) se clasifica por su apariencia clínica macroscópica (papilada, filiforme o plana) y/o su ubicación anatómica (plantar, genital o mucosa) poco agradables (Tschandl et al, 2014); mientras que otros pueden generar infecciones subclínicas, las cuales pueden aunque no en la mayoría de los casos, dar lugar al cáncer. Casi todas las infecciones se producen de manera transitoria, pues se controlan por la respuesta inmune del organismo; solo entre 10 y 20 % se vuelven crónicas o persistentes y tienen un mayor potencial oncogénico. Este agente infeccioso puede infectar la mucosa oral, laríngea y cervical, así como los genitales externos (Medina et al, 2013) (Schwartz et al, 1998).

2.4.1. Diferentes tipos de lesiones

Las lesiones producidas por estos virus se pueden clasificar en dos grandes grupos: lesiones benignas y lesiones potencialmente cancerizables o malignas (Luciano y Oviedo, 2013). Entre las lesiones benignas que podemos encontrar en cavidad oral están Papiloma bucal, Verruga vulgar, Condiloma acuminado e Hiperplasia epitelial multifocal, mientras que la Leucoplasia idiopática y el Carcinoma epidermoide son consideradas como lesiones potencialmente cancerizables y/o malignas. Los tipos de *VPH* encontrados en lesiones en cavidad oral son 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 y 57 (Cháirez et al, 2015).

En el caso de niños se han descrito infecciones cutáneas así como en la mucosa oral, nasal y genital, con un notable incremento en la incidencia de verrugas anogenitales en prepúberes.

2.4.2. VPH presente en los distintos tipos de cáncer

Un estudio reciente estimó que el ADN del *VPH* estaba presente en el 91% de los cánceres cervicales, el 75% de los cánceres vaginales, el 69% de los cánceres vulvares, el 91% de los cánceres anales, el 63% de los cánceres de pene y el 71% de cáncer de orofaringe. Sin embargo, los registros de cáncer no recopilan rutinariamente información sobre la presencia de ADN de *VPH* en tejidos cancerosos. Por lo tanto, para estimar el número de cánceres atribuidos al *VPH*, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades multiplicaron el número de cánceres asociados al *VPH* por el porcentaje de cada tipo de cáncer atribuible al *VPH* basado en el estudio de genotipado. Sobre la base de estas fracciones atribuibles, el 79% de los 38,793 "cánceres asociados con el *VPH*" diagnosticados anualmente en los Estados Unidos entre 2008 y 2012 podrían atribuirse a *VPH* (Razzaghi et al, 2018).

2.4.3. Relación con el Carcinoma de Células Escamosas Orofaríngeas

El *Virus del Papiloma Humano* es considerado el principal coadyuvante al aumento actual del carcinoma de células escamosas orofaríngeas (OPSCC). Estudios han establecido la relación entre el *VPH* con el Carcinoma de células escamosas orofaríngeas, pacientes diagnosticados con OPSCC vinculado con *VPH* positivo suelen permanecer clínicamente asintomático, y el cual empieza a presentar muestras clínicas una vez que éste ya dio metástasis en cuello, por otro lado, cuando el OPSCC está vinculado con *VPH* negativo está mayormente relacionado con problemas de garganta. La administración de antibióticos como atención primaria puede agravar el tiempo para diagnosticar oportunamente esta neoplasia (Gilde et al, 2017).

2.5. Tratamiento

Las vacunas contra los papilomavirus humanos se han desarrollado con 2 objetivos clínicos principales: El primario o PREVENTIVO: para aquellos pacientes que no han contraído el virus, sin embargo, puedan estar expuestos a contraerlo, y el secundario o TERAPÉUTICO: aquellos pacientes los cuales necesitan tratamiento debido a que ya presentan una infección establecida por el *VPH* para evitar la progresión de la enfermedad o la necesidad de terapias más invasivos (Padilla-Paz, 2005).

2.5.1. Prevención primaria o preventiva

Las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH) se consideran la intervención profiláctica más efectiva para el control y prevención de la carga de enfermedad relacionada con el VPH. Actualmente, hay estudios que demuestran la inmunogenicidad, eficacia y seguridad ante prevención de infecciones y lesiones precancerosas atribuidas a las vacunas bivalente (VPH 16/18), tetravalente (VPH 6/11/16/18) y la recientemente aprobada vacuna nonavalente (VPH 6/11/16/18/31/33/45/52/58) en la cual se ha sugerido su potencial para reducir la carga de enfermedad asociada al VPH en especial en adolescentes antes de la exposición del virus (Bruni L et al, 2015).

La vacuna contra el *VPH* se ha convertido en el protector fundamental a la insuficiencia de información para detectar oportunamente cualquier cáncer asociado al *VPH*, esencialmente para el carcinoma de células escamosas orofaríngeas en el que hay una tendencia acrecentada a la incidencia. Las vacunas contra el *VPH* están aprobadas y recomendadas para niños y niñas. Se observó además que los títulos de anticuerpos inducidos por la vacuna se mantenían 8 años más tarde (Razzaghi et al, 2017) (Ferris et al, 2014). “El principio fundamental de estas vacunas, es la creación de antígenos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes que impiden la entrada del virus a la célula huésped” (Muñoz et al, 2008).

2.5.2. Reacciones en niños y niñas ante la vacuna del VPH

En estudios realizados se han hecho pruebas de las 3 vacunas (bivalente, tetravalente y nonavalente) compuestas por partículas similares a la del virus (VLP) las cuales se autoensamblan a partir de las copias de L1 (la proteína estructural principal del virus) dando lugar a una estructura similar a la cápside del virus y que es capaz de inducir la producción de anticuerpos protectores frente al virus auténtico (Stanley et al, 2012). Estas vacunas son generalmente bien toleradas y tienen un adecuado perfil de seguridad; los efectos adversos locales más comunes relacionados con las vacunas fueron el dolor transitorio de intensidad leve a moderada, el eritema y la inflamación en el lugar de la punción. Los síntomas sistémicos más comunes potencialmente relacionados con la vacuna fueron fiebre, fatiga, dolor de cabeza y dolor muscular. Cabe destacar que ni los síntomas locales, ni los sistémicos aumentaron con las dosis posteriores (Stillo et al, 2015).

2.6. Características Microbiológicas para PCR

El éxito de la PCR en el diagnóstico de enfermedades infecciosas se basa en su capacidad para reconocer y amplificar características génicas particulares de un microorganismo determinado, Estas características están dadas en cualquier microorganismo en la composición de su ADN en pequeños segmentos llamados genes.

Cada gen consiste en una región de un tamaño definido de ADN con una composición determinada que posee la información necesaria para dirigir la síntesis de una proteína. Dado que un microorganismo depende absolutamente de la presencia de proteínas para llevar a cabo todas sus funciones vitales, incluyendo la síntesis de todos sus demás compuestos, entonces toda la información necesaria para construir un organismo reside finalmente en sus genes.

En un individuo, el número y tipo de genes es constante, solamente en escasas ocasiones se presentan cambios en estos elementos de forma espontánea o inducida lo que generalmente provoca daño al organismo. Estos cambios en los genes se denominan mutaciones. Es por esta universalidad e inmutabilidad del material genético que las técnicas basadas en la detección de información genética son tan atractivas.

2.7. Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR)

El término PCR (Polimerase Chain Reaction) se define como el proceso enzimático de copiado de un segmento de ADN in Vitro, utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable. Fue creado por Karry B. Mullins en el año de 1985, este proceso se efectúa utilizando una alta temperatura para la separación de la doble hélice del ADN a estudiar, a la cual se unen pequeñas moléculas de ADN sintéticas llamadas oligonucleótidos que proveen extremos 3' OH para la síntesis de ADN de la polimerasa.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR es el ADN templado o blanco, este es el ADN del gen que se utiliza para detectar un organismo específico, en este caso herpes virus. Este ADN debe ser altamente específico para el organismo a estudiar y uno de los más usados es el gen del ARN 16S. SE emplean secuencias de alta variabilidad presentes en este gen. En teoría, basta una sola molécula de ADN templado para iniciar la PCR en la práctica se requiere la presencia de algunas decenas o cientos de ellas.

2.8. Oligonucleótidos

Se trata de partículas de ADN de una sola hebra de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos, sintetizados artificialmente. Estos son complementarios a los extremos de la secuencia de ADN blanco que se requiere detectar. Debe de tener ciertas características dentro de las que se encuentran, ser capaz de unirse por apareamiento específico de bases a una sola región en el ADN blanco, contener una alta proporción de guaninas y citosinas, alrededor de 50%, para tener mayor estabilidad, no deben ser complementarios consigo mismos, ni con el otro oligo utilizado ya que esto puede evitar su unión eficiente al ADN blanco, su diseño debe ser tal que uno reconozca la región 5' de la secuencia deseada y el otro la región 3' deben estar dirigidos el uno hacia el otro, no deben unirse a otro ADN que no sea el blanco que se quiere detectar en el microorganismo o con al ADN de otros microorganismos y también poseer una alta estabilidad de unión al ADN blanco. Lo cual se mide con el parámetro T_m (temperatura meeting, o valor de temperatura al cual el 50% de las moléculas del oligo están disociadas). La T_m debe ser mayor a 50°C.

2.9. Electroforesis

La electroforesis es una herramienta de análisis simple y rápido para una mezcla de moléculas que migran en un campo eléctrico y son separadas en base a su carga. Se define como el proceso de moviendo de moléculas con carga eléctrica en soluciones de pH determinado aplicando un campo eléctrico a través de la mezcla. Este método permite separar las proteínas y otras macromoléculas como el ADN y ARN. EL movimiento de estas moléculas depende de su carga eléctrica, tamaño y forma.

Para realizar la separación del ADN por medio de electroforesis es necesario la utilización de una matriz sólida la cual puede estar compuesta de diferentes materiales tales como: celulosa, acetato y geles de poliacrilamida, agarosa u almidón.

La agarosa y la poliacrilamida son las más utilizadas en investigación de ADN. En estos geles, se coloca la mezcla de moléculas que se desea analizar y se aplica un voltaje determinado. Debido a la presencia de fosfato, las moléculas de ADN se cargan negativamente al pH buffer (pH de 8) y migran hacia el polo positivo.

Los geles de poliacrilamida y agarosa actúan como tamices moleculares seleccionando el tamaño de las moléculas de ADN. De esta forma se pueden analizar productos de PCR mediante electroforesis para determinar si el tamaño del producto amplificado corresponde al esperado según el diseño de los oligos. Las moléculas de menor tamaño migrarán más rápido al desplazarse con mayor facilidad a través de los poros del gel y llegarán más cerca del polo positivo que las moléculas mayores.

Una vez que las moléculas han migrado lo suficiente a través del gel en un tiempo aproximado de 1 a 2 horas, se genera un patrón de bandas donde cada banda indica la presencia de ADN de un tamaño determinado las cuales se hacen visibles al teñir los ácidos nucleicos con el colorante bromuro de etilo. Este compuesto se intercala entre las bases consecutivas de la doble hélice del ADN y absorbe luz ultravioleta emitiendo una fluorescencia de color rojo-naranja. El tamaño de las moléculas de ADN en cada banda se puede determinar comparándolas con el ADN del tamaño conocido.

CAPÍTULO 3

3. MÉTODOS

3.1. Muestra del estudio

Se realizó un estudio descriptivo en la clínica del Posgrado de Infantil de la Facultad de Odontología de la UANL ubicado en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. En el presente estudio se analizaron 74 muestras tomadas de cavidad oral (lengua, carrillos, fondo de saco, paladar duro y blando) por medio de cytobrush a diferentes pacientes que acuden al posgrado de la Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatria con edades comprendidas entre 4 años y 8 años los cuales no presentaban ninguna enfermedad sistémica diagnosticada y los cuales residen en Monterrey, Nuevo León y su área metropolitana (ver Figura 1).

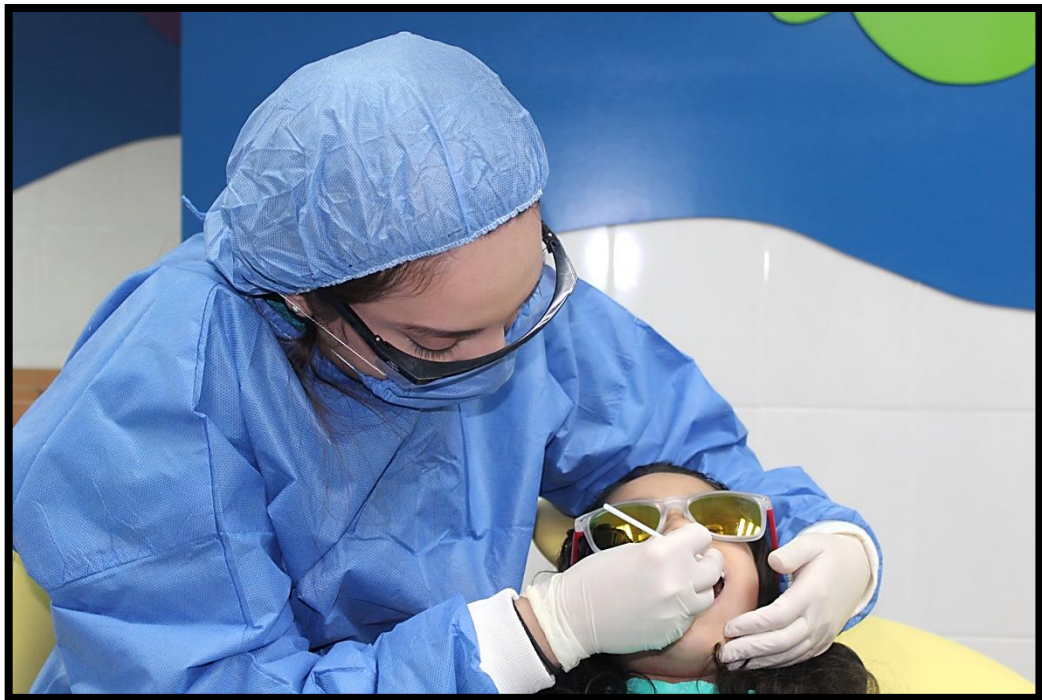


Figura 1. Recolección de muestras orales por medio de citología exfoliativa.

Por tratarse de pacientes menores de edad se les informó a los padres o tutores de éstos sobre el estudio y se les invitó a participar (ver Figura 2), obteniendo el consentimiento informado autorizado dándoles a conocer la posibilidad de demostrar la presencia del Virus del Papiloma Humano (ver Figura 3).



Figura 2. Invitación a los padres o tutores para la participación de los pacientes infantiles al estudio.



Universidad Autónoma de Nuevo León
 Facultad de Odontología
 Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de
 Odontopediatría



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio:	"IDENTIFICACIÓN DE VPH EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD"
Investigadores principales:	C.D. Daniela García Santos
Institución:	Facultad de Odontología UANL
Teléfono de contacto:	8110040731

La participación en este estudio es voluntaria. Es importante que lo lea y entienda.

El objetivo del estudio a participar es:

Identificar la presencia del Virus del Papiloma Humano y conocer el estado de salud del participante.

Yo _____ acepto que el menor _____ del cual soy _____ y representante legal **participe en el programa de estudio "Identificación de VPH en niños de 4 a 8 años de edad"** el cual consiste en: a) Revisión dental b) Toma de muestra de cavidad oral por medio de raspado oral con ayuda de cepillo citológico.

Los **beneficios** que se obtendrán serán conocer el estado de salud del menor y en caso necesario se ofrecerá orientación sobre la necesidad de acudir a consulta para mejorar su salud.

Los procedimientos y pruebas relacionadas con el estudio **no tendrán ningún costo** y tampoco recibirá pago alguno a cambio de la participación en el estudio. La información recabada durante el estudio será **confidencial y se mantendrá el anonimato.**

En caso de dudas o preguntas relacionadas al estudio puedo comunicarme con el investigador principal al teléfono celular **8110040731.**

Al firmar este consentimiento reconozco que la participación es **voluntaria** y puedo negarme o suspenderla en cualquier momento sin sanciones ni pérdidas de los beneficios a los que de otro modo se tiene derecho. Acepto que la información personal puede utilizarse y transferirse para nuevos estudios de investigación clínica con la finalidad de brindar más información. Entiendo que esta información puede ser auditada o inspeccionada por agencias reguladoras como la Secretaría de Salud, así como por la misma Institución.

Edad del participante:	4 años	5 años	6 años	7 años	8 años
Municipio de residencia:					
Número de hijos en la familia:			Edades:		
El participante cuenta con la aplicación de la vacuna del VPH previo a este estudio:	SI	NO	Dosis:		

Nombre del participante: _____

Nombre del padre o tutor y representante legal: _____

Parentesco: _____ Firma: _____

_____, _____; a ____ del mes de _____ del 20____

Figura 3. Consentimiento informado

3.2. Recolección de muestras y datos

Tras la evaluación clínica oral, se recogieron muestras orofaríngeas por el método de raspado de la citología exfoliativa, haciendo un movimiento rotatorio con un citocepillo (Cytology Brush, Medical Packaging Co, Camarillo, CA) en diferentes lugares de la cavidad oral como el piso de la lengua (ver Figura 4), el interior de las mejillas (ver Figura 5), fondo de saco (ver Figura 6), paladar duro y paladar blando (ver Figura 7), excluyendo las amígdalas. A continuación, los cepillos utilizados para la toma de muestras orales se llevaron en un tubo que contenía una solución conservante (10mM Tris-HCl, 1 mM NaCl y 0,5% SDS, pH=8) y las muestras se mantuvieron a -20°C hasta la extracción del ADN (ver Figura 8).



Figura 4. Raspado oral en piso de la lengua

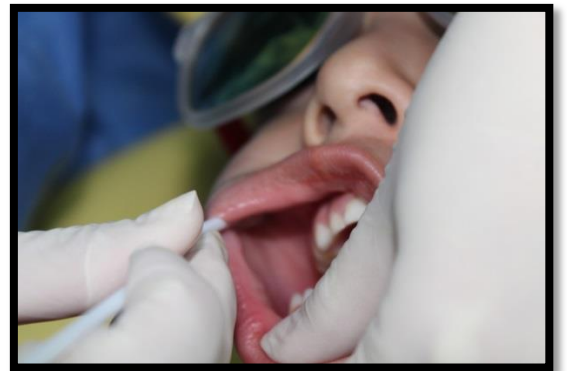


Figura 5. Raspado oral de carrillos



Figura 6. Raspado oral de paladar duro y blando



Figura 7. Muestra oral en solución conservante (10mM Tris-HCl, 1 mM NaCl y 0,5% SDS, pH=8)

3.3. Extracción del ADN

Para la extracción de ADN, las muestras se incubaron con RNasa (10 μ g/mL) y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C, seguidas de la adición de proteinasa K (1 mg/mL) durante 1 hora a 56°C, y la incubación durante 10 minutos a 95°C para su inactivación. El ADN se purificó luego mediante la técnica de alcohol isoamil de cloroformo fenólico y se precipitó por sal/etanol, como se ha descrito anteriormente (Sambrook et al, 1989). Posteriormente, el ADN se suspendió en 50 μ L tampón TE (0,01 M Tris HCl, pH 7,4 y 0,001 M EDTA) y se incubó a 65°C durante 1 hora, después de lo cual, el ADN se almacenó a -80°C, hasta su análisis. El tampón TE (0,01 M Tris HCl, pH 7,4 y 0,001 M EDTA) se incubó a 65°C durante 1 hora, después de lo cual se almacenó a -80°C hasta su análisis (ver Figura 8).

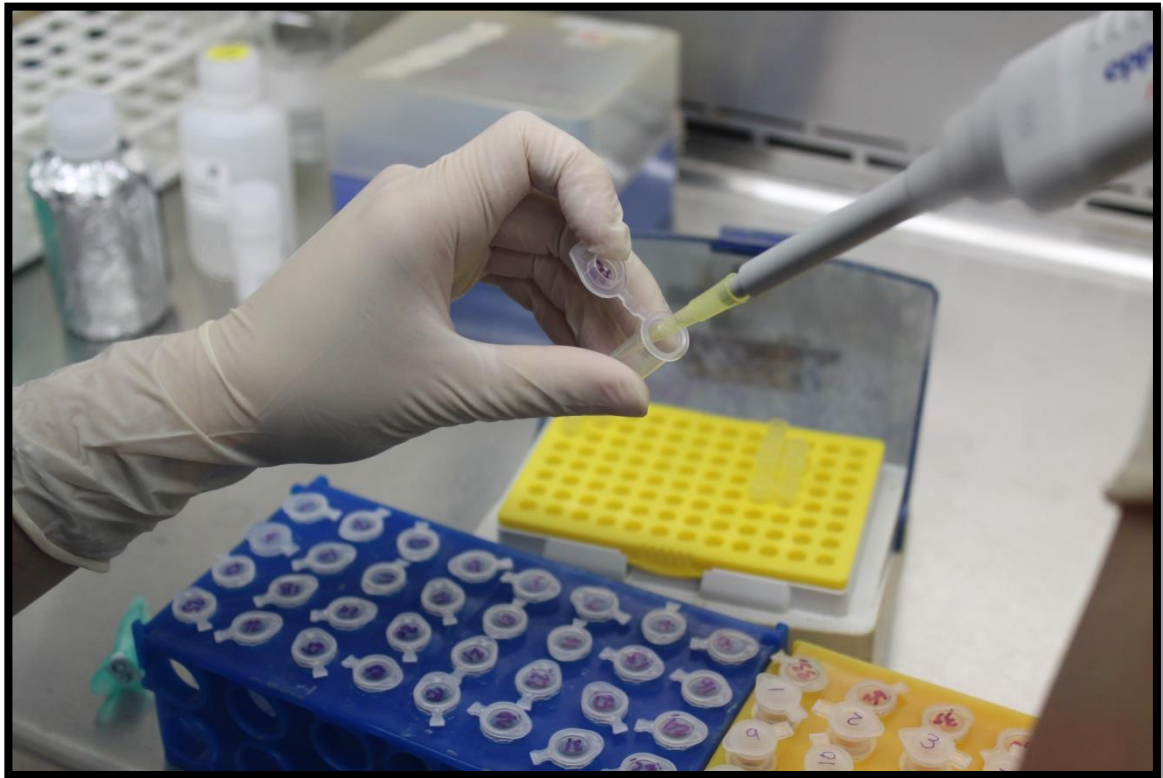


Figura 8. Extracción de ADN

3.4. Detección del VPH

La integridad y/o adecuación del ADN extraído se evaluó mediante la detección del gen β -actin en la PCR y se amplificó utilizando los oligonucleótidos Fw 5'-GGCATCCTCACCCCTGAAGTA-3'; y Rv 5'-GGGTGTGTGAAGGTCTCAAA-3'; como controles internos por la PCR (ver Figura 9), electroforados en un gel de acrilamida al 8%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un Gel Transiluminador de Luz Ultravioleta Doc™ XR + Imager (Bio Rad Lab). El producto esperado de la PCR era de \sim 203pb. La detección del VPH se llevó a cabo mediante una PCRanidada, utilizando los cebadores MY09 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'; y MY11 5'-CGMCAGGWCATAAYAATGG-3'; la Taq ADN polimerasa (5U/ μ L), la mezcla dNTP, 100ng de ADN y agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 25 μ L por reacción (MJ Mini Personal Thermal Cyclerthermocycler; Bio-Rad Lab, Hercules, CA).



Figura 9. Colocación del ADN en el Termociclador (PCR)

La programación del equipo fue la siguiente:

- 1) Preincubación a 95°C durante 3 minutos
- 2) Amplificación a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 90 segundos, durante 40 ciclos
- 3) Extensión a 72°C durante 4 minutos.

La segunda ronda de amplificación se realizó como la primera, pero en lugar de añadir ADN, se añadió el producto de la PCR de la primera ronda y los primers utilizados fueron los siguientes: GP5+ 5'-TTTGTACTGTTGTAGATACTAC-3'; Y GP6+ 5'-GAAAATAAACTGTAAATCATTC-3'; (Bio-Rad Lab).

La programación del equipo fue la siguiente:

- 1) Preincubación a 94°C durante 4 minutos
- 2) Amplificación a 94°C durante 1 minuto, 40°C durante 2 minutos, y 72°C durante 90 segundos, durante 40 ciclos
- 3) Extensión a 72°C durante 4 minutos

3.5. Electroforesis

A continuación, los productos de la PCR se electroforaron en un gel de acrilamida al 8% en un tampón de TBE 1X, luego se hicieron funcionar a 90 voltios durante 45 minutos (ver Figura 10), se tiñeron con bromuro de etidio y se colocaron en un gel transiluminador de luz ultravioleta Doc™ XR+Imager (Bio-Rad Lab) para mostrar los amplicones de ~150pb, correspondientes al VPH en donde se colocaron en los primeros tres espacios el control positivo (DNA de la línea celular HeLa), control negativo (agua libre de nucleasas) y el marcador (ver Figura 11). Este sistema utiliza los primeros MY09/MY11 y GP5+/GP6+, que amplifican la región L1 del genoma viral, que se utilizan con frecuencia para la detección del VPH en estudios clínicos e histológicos. Estos cebadores son eficaces para amplificar un amplio espectro de genotipos de VPH en células obtenidas de frotis cervicales y tejidos incorporados en parafina. Los cebadores MY09/MY11 flaquean una secuencia de aproximadamente 450pb, mientras que los GP5+/GP6+ flaquean una secuencia de aproximadamente 150pb, que es interna a la secuencia flanqueada por MY (Snijders et al, 1990). El par MY se sintetiza a partir de varios nucleótidos degenerados en cada cebador, es una mezcla de 25 oligonucleótidos que amplifican 25 tipos de VPH genital.

Al término de este proceso se pueden conocer los resultados así como digitalizarlos (ver Figura 12).

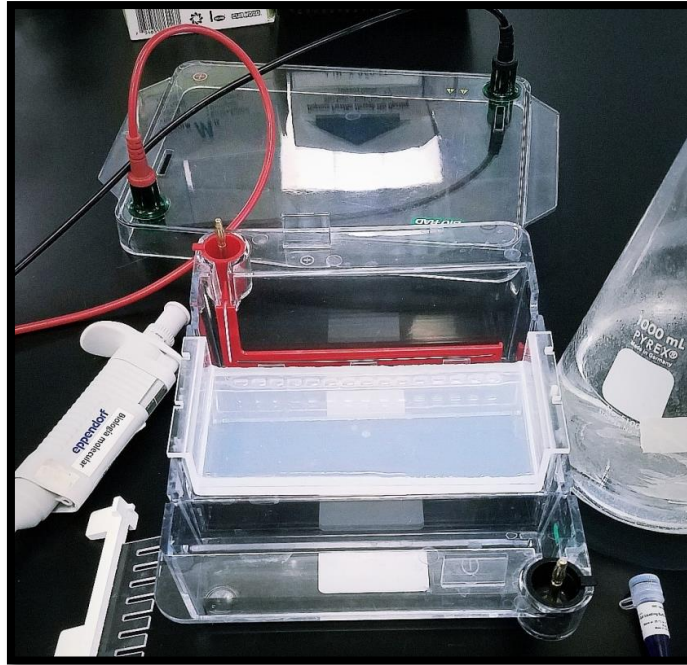


Figura 10. Electroforesis del gel de acrilamida al 8%



Figura 11. Colocación de gel transiluminador de luz ultravioleta Doc™ XR + Imager (Bio-Rad Lab)



Figura 12. Resultados de la PCR digitalizados

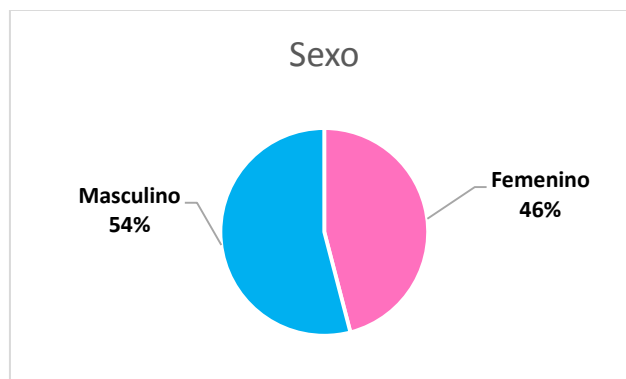
CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

Los datos fueron capturados en una base de datos en el programa IBM Statistics 23 con el que se realizaron tablas de gráficas de barras. Para algunos procedimientos estadísticos de clasificación y manejo de base de datos fue empleado el programa Microsoft Excel 2011. Posterior a esto se realizó una descripción detallada de los resultados. El presente proyecto cuenta con un modelo estadístico de presentación de datos que consistió en la elaboración y descripción de tablas de frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas, además del uso de gráficos para las tablas mayormente relacionadas con el análisis de los datos, posterior a este diseño se realizó una descripción detallada de los resultados.

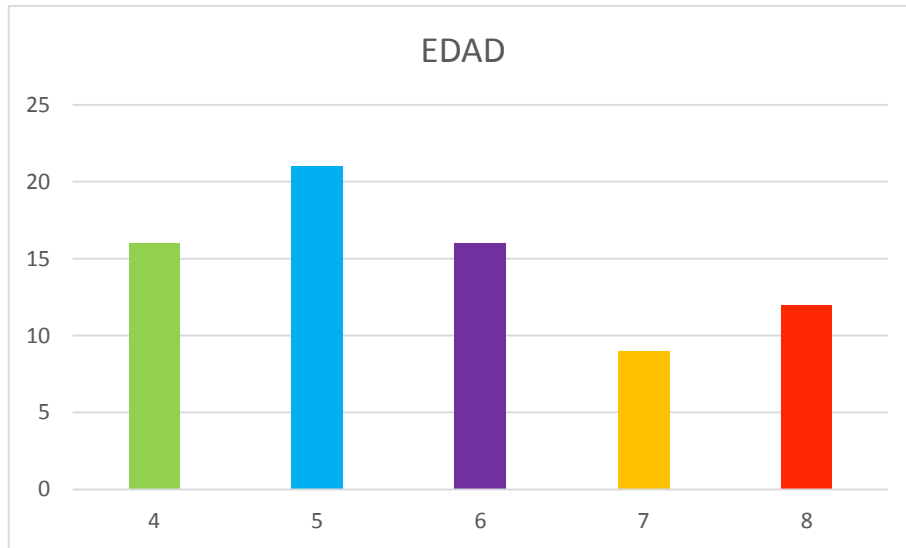
La muestra fue de conformada por 74 pacientes infantiles que cumplieron con los requisitos para ser incluidos en el estudio, de los cuales 34 pacientes (46%) fueron del sexo femenino y 40 pacientes (54%) fueron del sexo masculino.

Gráfica 1



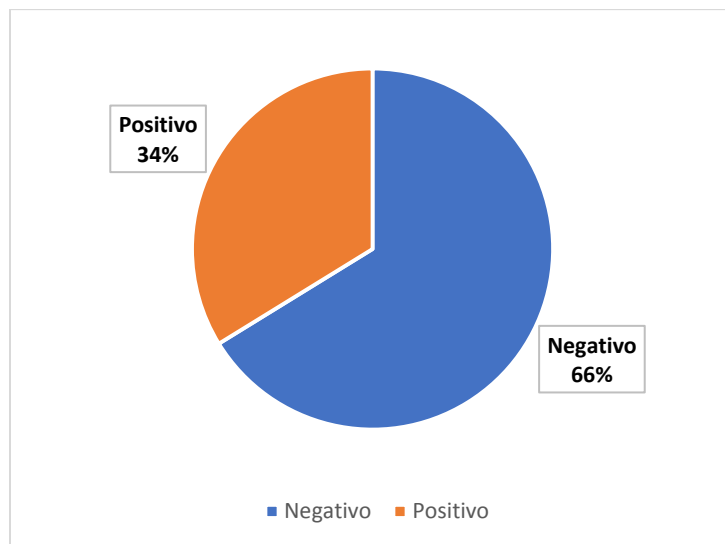
El rango de edad de los pacientes va desde los 4 años hasta los 8 años de edad, siendo 5 años la edad con mayor frecuencia. La frecuencia de las edades de los pacientes se muestra en la siguiente gráfica.

Gráfica 2



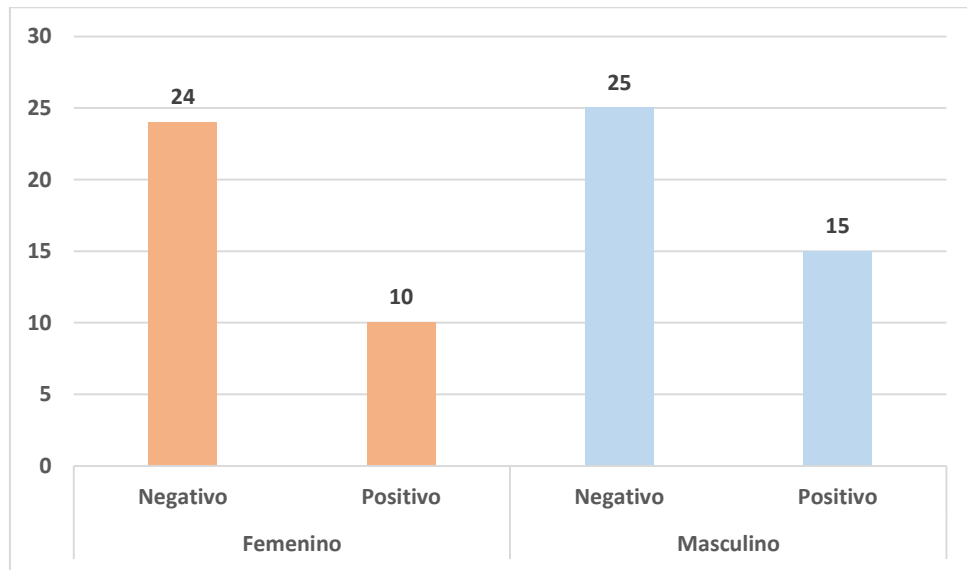
De los pacientes considerados en la muestra, 49 pacientes (66%) dieron negativo y 25 pacientes (34%) dieron positivo. Las proporciones de los pacientes infantiles se muestra en la siguiente gráfica.

Gráfica 3



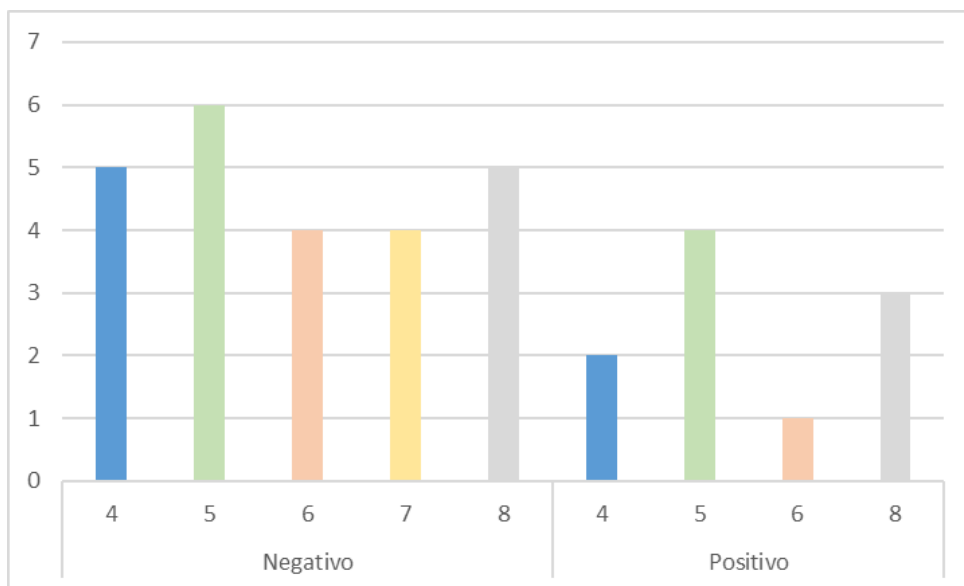
Cuando separamos la detección en función del sexo, encontramos que 15 pacientes infantiles del sexo masculino dieron positivo, mientras que en el sexo femenino solamente se detectó en 10 pacientes infantiles.

Gráfica 4



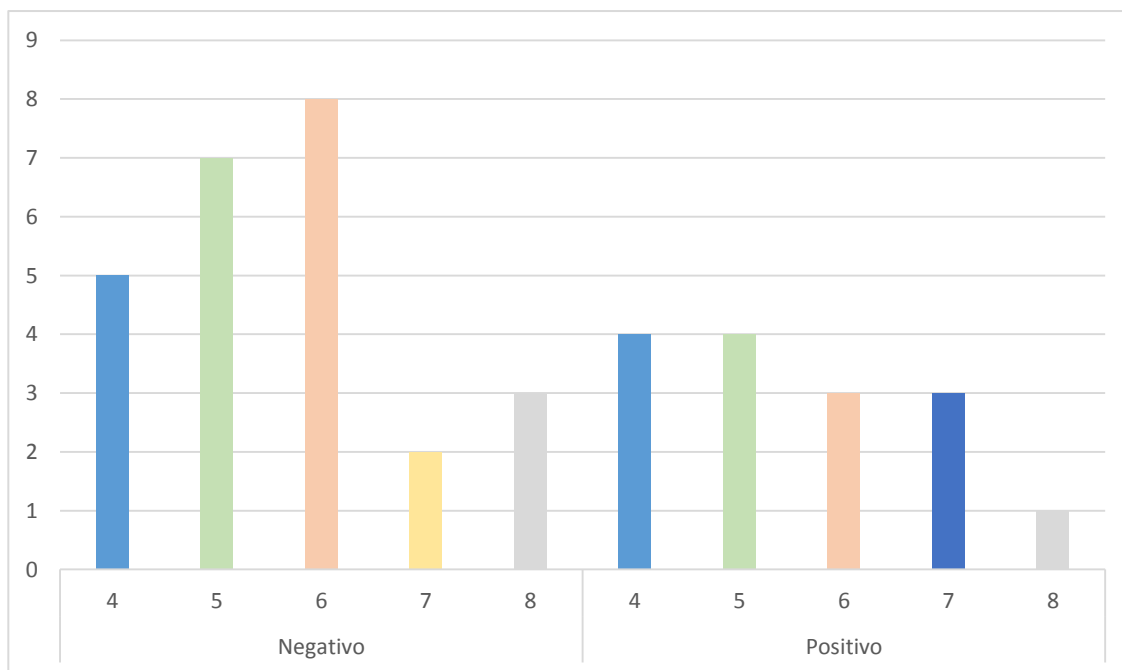
Cuando desglosamos la muestra considerando únicamente el sexo femenino, podemos observar que 5 años fue la edad en la que se detectaron una mayor cantidad de casos positivos. La distribución de la muestra en función de la edad de los pacientes infantiles se muestra a continuación.

Gráfica 5



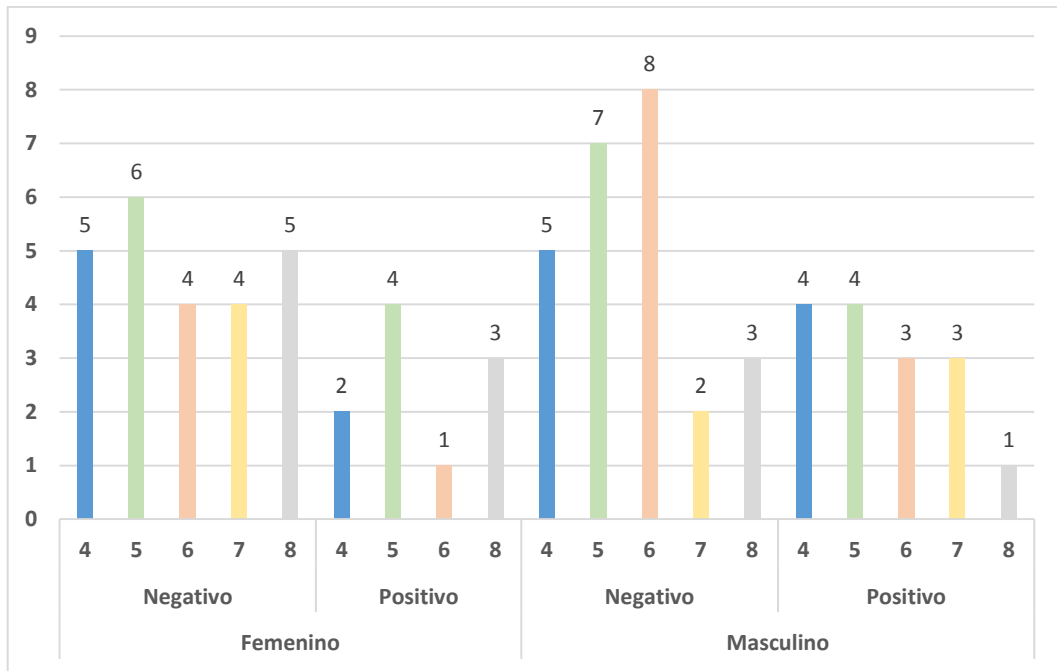
Cuando realizamos el mismo ejercicio, pero considerando únicamente el sexo masculino, podemos observar que la edad donde hubo mayor cantidad de casos positivos fue cuatro y cinco años.

Gráfica 6



La distribución de la muestra en función del sexo, la detección y la edad se muestra a continuación.

Gráfica 7



CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, el cáncer permanece como un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en países en desarrollo, incluido México, constituyendo una de las causas más importantes de mortalidad. Estudios recientes han asociado al Virus del Papiloma Humano (VPH) con el desarrollo de cáncer oral, principalmente el carcinoma oral de células escamosas (OSCC), representando un riesgo importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En México, existen pocos reportes sobre el papel de la infección por VPH en cavidad oral y sus implicaciones en una población asintomática y es de mucha importancia la documentación de los tipos y/o variantes de VPH en diferentes regiones geográficas donde la efectividad de las vacunas comerciales pudiera no prevenir la infección y patologías malignas en cavidad oral (Urbina Ríos CS, 2018). El objetivo principal del presente estudio fue investigar la presencia de VPH en la mucosa oral de pacientes infantiles asintomáticos. Se realizó una PCR convencional para la detección del gen de Beta-actina (control interno) en las muestras donde el 100% resultaron positivas. Estos resultados permitieron garantizar que los procedimientos de toma de muestra y extracción de DNA fueron adecuados lo que permitió la ejecución de análisis posteriores en las muestras. Varios estudios han demostrado la alta sensibilidad y especificidad del sistema Nested PCR usando los dos pares de oligonucleótidos MY09/11 y GP5+/GP6+ en comparación a otros métodos, por eso se utilizó en nuestro estudio (Entiauspe *et al*, 2013; Cai *et al*, 2013). Posteriormente análisis de secuenciación, lo cual nos garantiza la identificación inequívoca de cualquier tipo de VPH presente en la muestra.

El grupo objetivo primario en la mayoría de los países que recomiendan la vacunación contra el VPH está formado por niñas adolescentes de 9 a 14 años de edad (WHO, 2017), el presente estudio demuestra una prevalencia alta para la infección del VPH en niños y niñas de 4 a 8 años de edad por lo que se plantea la posibilidad de implementar la aplicación de las vacunas comerciales a una edad más temprana para prevenir lesiones no sólo benignas sino también precancerígenas. Sin embargo, un estudio realizado en Callao, Perú arrojaron unos resultados sobre la aceptación de la vacuna contra el Virus del Papiloma (VPH) por parte de los padres de familia, el cual representa a un 58,3% mientras la no aceptación de la vacuna un 41,67 % , demostrando así que aún permanece la duda sobre la aplicación de la vacuna a diferencia de Sánchez Anguiano y Col (México), 2013 en su estudio Conocimiento y aceptación de la vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH) en donde la aceptación de los tutores encuestados quienes aceptaban la vacuna es de un 89% y la no aceptación de un 11%. Por lo tanto, se recomienda al gobierno y a los profesionales de salud, realizar campañas educativas con el fin de difundir la prevención de la infección del VPH, así como su detección temprana para disminuir la tasa de prevalencia en nuestra población.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se encontró una importante prevalencia de la infección por el Virus del Papiloma Humano del 33% de las 74 muestras tomadas en pacientes infantiles asintomáticos que acuden al posgrado.
2. Dado a la importante prevalencia encontrada en este estudio y que no hay muchos reportes en niños, es necesario la ejecución de más estudios con mayor número de muestra para establecer asociaciones entre la infección por VPH y variables epidemiológicas.
3. Se recomienda al gobierno y a los profesionales de salud, realizar campañas educativas con el fin de difundir la prevención de la infección del VPH, así como su detección temprana.
4. Se recomienda considerarse la promoción de aplicación de vacunas comerciales de VPH desde edades más tempranas para disminuir la tasa de pacientes infectados por este virus.

REFERENCIAS

- Alemaný, L, Saunier, M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR & Clavero O. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *International journal of cancer*, 2015;136(1):98-107.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Zur Hausen H & de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 2010;401(1):70-79.
- Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S & Bosch FX. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related diseases in the world. *Summary Rep*, 2015;04-8.
- Cai YP, Yi YANG, Zhu BL, Yuan LI, Xia XY, Zhang RF & Xiang Y. Comparison of human papillomavirus detection and genotyping with four different primer sets by PCR-sequencing. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2013;26(1):40-47.
- Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson A-L, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L et al: Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*, 2004;319(2):315-323.
- Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R & Carinci F. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *ORAL & implantology*, 2017;10(3):209.
- Castro AA & Pérez MF. Virus del papiloma humano. *Revista de Costa Rica y Centro América*, 2013;606:211-217.

- Cháirez Atienzo, P, Memije V, Zambrano Galván G, García Calderón AG, Maya García IA & Cuevas González JC. Presencia del virus papiloma humano en la cavidad oral: revisión y actualización de la literatura. *International journal of odontostomatology*. 2015;9(2),233-238.
- D'Souza G & Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Preventive medicine*, 2011;53,S5-S11.
- De Guglielmo, DZ, Prado Y, Ferreiro M, Ávila M, Veitia D, Ladera M & Correnti M. Posible transmisión vertical de virus de papiloma humano en niños cuyas madres presentan antecedentes de infección viral. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 2015;75(1):25-29.
- De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM & Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *International journal of cancer*, 2009;124(7):1626-1636.
- Entiauspe L, Nunes E, Collares T, Da Silveira MF & Seixas F. Comparison between two methods for molecular characterization of human papillomavirus. *J Bras Doenças Sex Transm*, 2013;25,13-15.
- Erickson B, Alvarez R, Huh W. Human papillomavirus: What every provider should know. *Am J Obstet Gynecol*, 2013;208:169–75.
- García-Cuellar CM; González Ramírez IC & Granados García M. VPH y los carcinomas de cavidad bucal y bucofaringe. *Cancerol*. 2004;4:181-91.

- Gilde J, Song B, Masroor F, Darbinian JA, Ritterman Weintraub ML, Salazar J & Wang KH. The diagnostic pathway of oropharyngeal squamous cell carcinoma in a large US healthcare system. *The Laryngoscope*, 2018;128(8):1867-1873.
- González M, Motta LA, Moreno A, Chala AI, Tupaz HA, García DA. La infección por virus del papiloma humano afecta el pronóstico del cáncer orofaríngeo escamocelular: revisión de la literatura. *Univ Odontol*, 2014;33(71):55-63.
- González-Losa M, Conde-Ferraez L: Prevalence and distribution of HPV 16, 18 and 58 in southeast Mexico. *Handbook of human papillomavirus Prevalence, detection and management* New York, 2013;391-404.
- Gonzalez-Losa MR, Suarez-Allen RE, Canul-Canche J, Conde-Ferraez L, Eljure-Lopez N: Multifocal epithelial hyperplasia in a community in the Mayan area of Mexico. *International journal of dermatology*, 2011;50(3):304-309.
- Gonzalez-Losa MDR, Barrera ES, Herrera-Pech V, Conde-Ferráez L, Puerto-Solís M & Ayora-Talavera G. Epidemiology of oral HPV in the oral mucosa in women without signs of oral disease from Yucatan, Mexico. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015;46(1):301-306.
- Haws ALF, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK & Tyring SK. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *Journal of virological methods*, 2004;122(1):87-93.
- Ibieta BR, Lizano M, Frías-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ruíz-Godoy LM & Mohar A. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*, 2005;99(3):311-315.

Iftner T, Villa LL. "Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies". *Journal of the Cancer Institute Monographs*, 2003;31:80-88.

Illades-Aguilar B, Alarcon-Romero Ldel C, Antonio-Vejar V, Zamudio-Lopez N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernandez-Tilapa G, Vences-Velazquez A, Munoz-Valle JF, Leyva-Vazquez MA: Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecologic oncology*, 2010;117(2):291-296.

Jiménez C, Correnti M, Salma N, Cavazza M, Perrone M: "Detección del virus papiloma humano en entidades clínicas benignas de la cavidad bucal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación molecular". *Acta Odontológica Venezolana*, 2001;39(2):10-15.

Kerr DA, Arora KS, Mahadevan KK, Hornick JL, Krane JF, Rivera MN, et al. Performance of a branch chain rna in situ hybridization assay for the detection of high-risk human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2015;39(12):1643-52.

Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D & Giuliano AR. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2011;20(1):172-182.

Kumar A, Jacob T, Abban CY, Meneses PI. Intermediate Heparan Sulfate Binding During HPV-16 Infection in HaCaTs. *Am J Ther*, 2014;21(5):331-42.

Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle RM, et al. Combination of p16 (INK4a)/Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathol* 2015;123(4):219-29.

- Liu JC, Parajuli S, Blackman E, Gibbs D, Ellis A, Hull A, et al. High prevalence of discordant human papillomavirus and p16 oropharyngeal squamous cell carcinomas in an African American cohort. *Head Neck* 2015.
- Lobene RR. A modified gingival index for use in clinical trials. *Clin. prevent. Dent*, 1986;8,3-6.
- Lopez-Villanueva ME, Conde-Ferraez L, Ayora-Talavera G, Ceron-Espinosa JD, Gonzalez-Losa Mdel R: Human papillomavirus 13 in a Mexican Mayan community with multifocal epithelial hyperplasia: could saliva be involved in household transmission? *European journal of dermatology: EJD*, 2011;21(3):396-400.
- Luna-Aguirre CM, Reyes-Cortés LM, Torres-Grimaldo AA, Karr-de-León SF, Cerda-Flores, RM, Melo-Nava B & Barrera-Saldaña HA. Prevalence of human papillomavirus types in North and Central regions of Mexico. *Epidemiology & Infection*, 2018;146(13),1724-1730.
- Maniatis, T. Molecular cloning. *Decontamination of Dilute Solutions of Ethidium Bromide*, 1989.
- Mateos-Lindemann ML, et al. Diagnóstico microbiológico de la infección por virus del papiloma humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;35(9):593-602.
- Mattos ATd, Freitas LBd, Lima BMC, Miranda AE, Spano LC: Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attending an STI clinic. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011;42(2):786-793.
- MELO Angélica et al. Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Revista médica de Chile*, 2005;133(6):639-64.

- Mohit E, Bolhassani A, Zahedifard F, Seyed N, Eslamifar A, Taghikhani M & Rafati S. Immunomodulatory effects of IP-10 chemokine along with PEI60, 2013; 53(1-2):149-160.
- Mora Perdomo E, Perdomo Soret L, Muñoz M, Guevara Rivas H, Cardozo Castellano R & Ortunio Calabres M. Infección por VPH en niñas sin contacto sexual. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 2013;73(2):108-115.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González AB & Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006;24,S1-S10.
- Myriam LM, Marcelo M & Luis AM. Valoración diagnóstica de técnicas moleculares para detección de infección bucal por virus del papiloma humano. *Enf Inf Microbiol*, 2012;32(1),25-30.
- Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero L, Jiménez-López M, Garzón-Barrientos V, Calleja-Macías I, Barrera-Saldaña H, Leyva-Vázquez M, Illades-Aguiar B: Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*, 2015;12(1):29.
- Pytynia KB, Dahlstrom KR & Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral oncology*, 2014;50(5):380-386.
- Razzaghi H, Saraiya M, Thompson TD, Henley SJ, Viens L & Wilson R. Five-year relative survival for human papillomavirus-associated cancer sites. *Cancer*, 2018;124(1):203-211.
- Sánchez-Hernández JA et al. VIH-VPH y su influencia en el conteo de células CD4. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 2017; 64(1):31-35.

- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC & Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 2007;370(9590):890-907.
- Shaikh MH, McMillan NA, Johnson NW. HPV-associated head and neck cancers in the Asia Pacific: A critical literatura review & meta-analysis. *Cáncer Epidemiol*, 2015;39(6):923-38.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP: Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *International Journal of Cancer*, 2004;108(5):766-772.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ.& Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *Journal of General Virology*, 1990;71(1):173-181.
- Sritippho T, Chotjumlong P, Iamaroon A. Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015;16(15):6193-200.
- Stanley M, Pinto LA, Trimble C. Human papillomavirus vaccines — immune res-ponses. *Vaccine*, 2012;30(5):83–7.
- Stillo M, Carrillo Santistevé P, Lopalco PL. Safety of human papillomavirus vaccines: A review. *Expert Opin Drug Saf*, 2015:1–16.
- Tamay de Dios L, Ibarra C & Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2013;2(2):70-78.

Urbina Ríos, Cynthia Sofía. Identificación de los genotipos de virus del papiloma humano y variantes del gen E6 en cavidad oral de pacientes asintomáticos de Siltepec, Chiapas, México. Doctorado thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León (2018).

Vigneswaran N & Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*, 2014;26(2):123-141.

WHO.org. Suiza. OMS: Organización Mundial de la Salud (Internet). [internet]. Inmunización y productos biológicos. 2017.[actualizado 21 agosto 2017;citado 17 septiembre 2017]. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM: Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of virology*, 1997;71(3):2463-2472.

Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, Schiffman M, Blakey GL, Teel T: Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int J Cancer*, 2009;125(11):2609-2613.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Daniela García Santos

Candidata para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Tesis: **IDENTIFICACIÓN DE *VPH* EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD**

Datos Personales: Nacida en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, el 16 de Junio de 1990, hija del Dr. Juan José García Miranda (†) y la Profra. Olivia Santos Cervantes.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista con mención honorífica, en 2013.

Experiencia Profesional: Del 2013 a 2017 se desempeñó en consulta privada, como dentista general. En 2019, fue partícipe con exposición de cartel en el Congreso Internacional de la IAPD.