



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
“LUIS FELIPE MONCADA”
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**

Trabajo monográfico para optar al Título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Tema

Frecuencia de genotipos del virus de papiloma humano mediante la técnica PCR punto final en pacientes con lesiones papilomatosas de laringe que acuden a un hospital de Managua, febrero 2017-enero 2018.

Autores:

-  **Br. Karla Ariana Bello Busto**
-  **Br. Stefany Matrioska Brigget Martínez**
-  **Br. Justo Aarón Castellón Aguilar**

Tutor:

-  **Lic. Kenia García Rosales**
Licenciada en Microbiología

Managua, Marzo 2019



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
“LUIS FELIPE MONCADA”
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**

Trabajo monográfico para optar al Título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Tema

Frecuencia de genotipos del virus de papiloma humano mediante la técnica PCR punto final en pacientes con lesiones papilomatosas de laringe que acuden a un hospital de Managua, febrero 2017-enero 2018.

Autores:

- ✚ Br. Karla Ariana Bello Busto**
- ✚ Br. Stefany Matrioska Brigget Martínez**
- ✚ Br. Justo Aarón Castellón Aguilar**

Tutor:

- ✚ Lic. Kenia García Rosales**
Licenciada en Microbiología

Managua, Marzo 2019

Dedicatoria

A Dios por ser nuestra guía y acompañarnos en el transcurso de nuestras vidas, brindándonos paciencia y sabiduría para culminar con éxito esta meta alcanzada.

A nuestros padres por ser los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestras expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Agradecimientos

Agradecemos a nuestros docentes y autoridades, del Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada” UNAN Managua por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, a nuestra tutora Lic. Kenia García Rosales que gracias a sus consejos y correcciones logramos culminar este trabajo.

Al PhD. Allan Pernudi Ubau por su valioso aporte para nuestra investigación.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A:	Adenina.
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico.
ARN:	Ácido Ribonucleico.
C:	Citosina.
CD	Grupo de diferenciación.
CN:	Control Negativo.
CP:	Control positivo.
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E:	Región temprana (Early)
G:	Guanina
LCR:	Región larga de control
L:	Región tardía (Late)
MM	Marcador Molecular
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ng/ul:	Nanogramo por microlitro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PRR	Papilomatosis Respiratoria Recurrentes
PLJ	Papilomatosis Laríngea Juvenil

P53	Proteína 53
Pb:	Pares de bases.
Pol:	Polimerasa.
TBE:	Trisborato y EDTA.
T:	Timina
PK:	Proteinasa K
PBS:	Phosphate buffered saline
URR:	Región no codificadora
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar
VPH	Virus de Papiloma Humano
VPH-BR	Virus de Papiloma Humano -Bajo riesgo
VPH-AR	Virus de Papiloma Humano -Alto riesgo

RESUMEN

La papilomatosis laríngea es una enfermedad viral crónica producida por Virus del Papiloma Humano (VPH), generando cambios en los queratinocitos del epitelio escamoso estratificado y lesiones hiperproliferativas de las mucosas y de la piel; las cuales pueden desarrollar verrugas, displasia leve hasta un carcinoma epidermoide agresivo, presentando un curso impredecible. Este estudio tuvo como objetivo, determinar la frecuencia de genotipos del virus de papiloma humano mediante la técnica de PCR punto final, en pacientes con lesiones Papilomatosas de laringe atendidos en un hospital de Managua, febrero 2017-marzo 2018.

Se realizó un estudio descriptivo, el muestreo fue no probabilístico aplicando criterios de inclusión y exclusión. La muestra estuvo representada por 24 pacientes con diagnóstico histopatológico de papiloma escamoso, estas fueron tomadas por el otorrinolaringólogo del hospital quien posteriormente transportó las muestras hacia el laboratorio de Biología Molecular UNAN-Managua, para la realizar la extracción de ADN y detección de genotipos VPH bajo riesgo (VPH-BR) y alto riesgo (VPH-AR) mediante PCR punto final.

Todas las muestras resultaron positivas para alguno de los genotipos de bajo riesgo (BR), en el 21% de estas, además se detectaron genotipos de alto riesgo (AR). En relación a la frecuencia de los genotipos VPH-BR se obtuvo VPH 6 en el 79% de los casos, VPH 11 con un 75%. En cuanto a la frecuencia de VPH-AR se encontró 17% de positividad para VPH 66, 13% para VPH 39 y 8% correspondiente a VPH 58. Además, se detectaron coinfecciones con VPH 6/11 en el 54% de los casos. Los rangos de edades afectados fueron de 0-10 años (46% con VPH 11) y de 55-65 años (17% con VPH6/11). El 46% de los pacientes correspondieron al sexo masculino. En relación entre la presencia de uno o más genotipos con el número de intervenciones quirúrgicas, los resultados sugieren que los pacientes con coinfección por VPH-AR/BR se espera tengan un mayor número de visitas al quirófano con una media de 5 intervenciones al año y los pacientes con VPH 11 se estima presenten una media de 3 intervenciones quirúrgicas en un año.

ÍNDICE

Contenido	Página
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	3
3. Justificación.....	6
4. Planteamiento Del Problema	7
5. Objetivos	8
6. Marco teórico	9
6.1. Generalidades del Virus del papiloma humano	9
6.1.1. Estructura del virus	9
6.1.2. Tropismo viral	11
6.1.3. Ciclo de replicación del HPV	12
6.1.4. Clasificación de los genotipos virales.	13
6.1.5. VPH alto riesgo	14
6.1.6. VPH Bajo riesgo.....	15
6.1.7. Patogenia.....	16
6.2. Papilomatosis laríngea	16
6.2.1. Epidemiología.....	17
6.2.2. Etiopatogenia.....	19
6.2.3. Anatomía patológica.....	20
6.2.4. Respuesta inmune	20
6.2.5. Mecanismos de transmisión	22
6.2.6. Factores de riesgo asociados con Papilomatosis laríngea.....	22
6.3. Diagnóstico.....	23
6.3.1. Detección del genotipo viral por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 24	
6.3.2. Tratamiento para papilomatosis laríngea.....	26
6.3.2.1. Cidofovir:	26
7. Diseño metodológico.	28
7.1. Tipo de estudio	28
7.2. Universo	28
7.3. Muestra.....	28

7.4.1.	Criterios de inclusión	28
7.4.2.	Criterios de exclusión	28
7.5.	Procedimientos de recolección de la información.	29
7.6.	Métodos.....	29
7.6.1.	Cuantificación de ADN.....	32
7.7.	Detección de los genotipos del virus de papiloma humano en lesiones papilomatosas de laringe mediante PCR punto final.	32
7.7.1.	Mezcla de reacción.	32
7.8.	Amplificación mediante PCR punto final.....	33
7.9.	Electroforesis en gel de agarosa post PCR.....	34
7.10.	Plan de tabulación y análisis.	34
8.	Operacionalización de las variables.....	36
9.	Análisis y discusión de resultados	38
10.	Conclusiones	50
11.	Recomendaciones.....	51
12.	Bibliografía	52
ANEXOS	56

1. Introducción

El virus del papiloma humano (VPH) forma parte de un grupo de virus ADN heterogéneo llamados papilomaviridae; este virus, es causante de múltiples lesiones hiperplásicas, verrugosas y papilomatosas. Los papiloma virus infectan la piel y mucosas, provocando en ocasiones distintos tipos de verrugas como las cutáneas, papilomas laríngeos y diversos cánceres, incluidos el cervicouterino. (García, 2004)

La Papilomatosis Laríngea Recurrente se caracteriza por el crecimiento de verrugas en el tracto aerodigestivo, con predilección por la laringe. La Papilomatosis Laríngea tiene una distribución etaria bimodal y ocurre en pacientes de 5 años o menores, con aproximadamente el 25% de los casos juveniles que se presentan en la infancia. En personas adultas se presenta generalmente en la tercera década de la vida, donde la forma juvenil es más agresiva, tiene mayor impacto en la calidad de vida del paciente y tiene mayores costos para el sistema de salud. (Schiffman, 2010)

Los papilomas laríngeos son producidos por los genotipos de VPH 6 y 11 estos representan una de las formas más comunes de tumores benignos del tracto aero-digestivo inducidos por infección por VPH, los mismos virus que causan los condilomas genitales benignos. Esta infección se adquiere por contacto con la mucosa cervical al atravesar el canal del parto en una mujer con condilomas vaginales, infección intrauterina a través de la placenta o por vía hematológica (debido a que se ha encontrado ADN viral en la sangre del cordón umbilical de recién nacidos en madres con condilomatosis asintomáticas) y contacto sexual. Se han encontrado más de 100 genotipos del VPH de los cuales solo algunos de ellos se consideran de alto riesgo para el desarrollo de lesiones neoplásicas. (Duarte, 2012)

Hasta la fecha la detección de los genotipos de VPH en laringe no se ha realizado en nuestro país, únicamente el diagnóstico se basa en datos clínicos, exploración laríngea e histopatología. Por medio de este estudio se pretende aplicar la técnica de PCR punto final para la detección de los genotipos de VPH, en lesiones tumorales de laringe.

2. Antecedentes

Las descripciones tempranas de los tumores laríngeos benignos datan del siglo XVII, como “verrugas de la garganta” mencionadas por Marcellus Donalus. Koderick informó de la extracción de un pólipo laríngeo a través de la boca en 1750. Mientras que Cheesman publicó el primer caso de papiloma de la cuerda vocal en los Estados Unidos en 1817. Mackenzie en 1837 registro por primera vez que en los niños estas lesiones eran múltiples, mientras que en adultos, eran solos y usualmente curables con la escisión. (Dekelboum, 1965)

Chevalier Jackson en 1940 describió el cuadro como "papilomatosis laríngea juvenil".(Castillo & Caro, 2015)

Benuto afirma que, a finales de la década de 1970, se contaba ya con la tecnología de ADN, que se utilizó para aislar el genoma de los VPH identificados en las verrugas. Mediante ensayos de hibridación y restricción demostraron que los virus que aislaron de las diferentes muestras clínicas no eran todos idénticos, así que se procedió a clasificarlos por tipos en 1, 2, 3, 4 y así de forma sucesiva, según se iban descubriendo nuevos subtipos del virus.(Benuto, 2009)

Horan Green describió lesiones “en coliflor” en la laringe. En 1923, Ullmann describió el origen infeccioso de esta entidad y en 1982 se identificaron por Mounts los serotipos 6 y 11. (Benuto, 2009)

Un estudio realizado por el Hospital Escuela Universitario de Honduras sobre el VPH y las afectaciones oro faríngea, sus resultados revelaron que predominaron los VPH-6 y VPH 11, con mayor afectación del área rural, predominio del sexo masculino, cofactores predominantes el alcoholismo y tabaquismo. Predominando el VPH 11 y no hubo coinfección de dos o más genotipos (Estrada & Colbs, 2010).

Según revisiones sistemáticas en México y Colombia en el año 2011, la prevalencia de VPH en el proceso de malignización de lesiones de vías aerodigestivas superiores (VADS) se presenta con una incidencia en laringe del 24,0%. En esta revisión también destacan los genotipos de VPH de bajo riesgo (VPH 31, 45, 6 y 11), los cuales inducen la aparición de algunas lesiones precancerosas. En cuanto a los métodos de su diagnóstico, se demuestra la efectividad del método PCR-RFLP como el punto de partida del monitoreo de la infección y

su progresión a cáncer. Estos métodos pueden permitir comprender la virulencia del mismo y contribuir a la disminución de las tasas de incidencia a causa de las imprecisiones de diagnóstico clínico por metodologías convencionales ya que dificultan la detección precoz del cáncer de las vías aerodigestivas superiores. (Bologna, 2011)

En Noruega en el año 2012, describieron la prevalencia de infecciones múltiples por VPH y el riesgo de neoplasia laríngea de alto grado y carcinoma invasivo del tracto respiratorio en una gran cohorte de pacientes con PRR. Se realizó mediante ensayos cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa que identificaron 15 tipos de VPH. La calidad del ADN fue aprobada en 221/224 casos. El ADN del VPH se detectó en 207/221 pacientes y todos eran HPV 6 o HPV 11 positivos, con HPV 6 en 133/207, HPV 11 en 40/207 casos y HPV 6/11 en 15/207 casos. La coinfección con uno o dos tipos de VPH de alto riesgo junto con VPH 6 o VPH 11 estuvo presente en 19/207 pacientes. En total, 39/221 pacientes desarrollaron neoplasia laríngea de alto grado. 8/221 pacientes desarrollaron carcinoma del tracto respiratorio (seis pacientes con carcinoma de laringe y dos pacientes con carcinoma de pulmón). (Omland, 2014)

En un artículo publicado en el año 2014 por Pérez delgado y colaboradores describen que, el tratamiento estándar actual es Exéresis quirúrgica completa de los papilomas y la preservación de estructuras normales. En pacientes con afectación de la comisura anterior o posterior con papilomas de alta agresividad, el objetivo debe ser asegurar la vía aérea preservando el tejido sano para evitar complicaciones como estenosis glóticas o subglóticas, o la formación de sinequias que reduzcan el espacio glótico. En las formas graves a veces es necesario recurrir a una traqueotomía, pero en cuanto la extensión de las lesiones debemos retirarla para evitar la diseminación. (Pérez, 2014).

En Venezuela, Acosta y col. realizaron en 1997 un estudio retrospectivo sobre la papilomatosis laríngea infantil, en el Hospital “J.M. de los Ríos” reportaron, que la mayor frecuencia de aparición se encuentra entre 1 a 6 años de edad. La sintomatología prelevante en esa serie fue la disfonía, disnea y estridor laríngeo; en todos los casos se practicó laringoscopia directa, biopsia y exéresis del papiloma, se observó curación en 9,8 % de los casos, 35 % ameritó traqueotomía y se presentó una muerte. (Castillo & Caro, 2015)

Bello de Alford y col. realizaron un estudio, donde detectaron que los tipos de VPH 6 y 11 estuvieron presentes en un 53 % lo cual coincide con lo reportado en la literatura mundial para la papilomatosis laríngea juvenil; en esta investigación se encontró VPH 6 y 11 en más de 70 % de los casos: VPH 6 en 9 casos (50 %), VPH 11 en dos casos (11,1 %) y la coinfección por ambos tipos en 2 casos (11,1 %). Algunos estudios mostraron que la presencia de VPH-11 se asociaba con una proliferación papilomatosa más temprana y de mayor tamaño (necesidad de traqueotomía) que la de los papilomas VPH-6. (Castillo & Caro, 2015)

En Nicaragua en el año 2014 se realizó un estudio comparativo por la Dra. Arlen Aburto Médico Residente III, quien detalla las ventajas de la papilomectomía asistida con endoscopia de 0 grados en relación a papilomectomía convencional, realizada en el servicio de otorrinolaringología del Hospital Antonio Lenin Fonseca, en la cual evaluó la respuesta del paciente en relación al intervalo de tiempo entre intervenciones quirúrgicas y las complicaciones para dichos procedimientos. Los grupos etarios más afectados fueron los comprendidos entre las edades de 35 - 49 años y entre 5 – 14 años, siendo el antecedente fundamentalmente la exposición activa y pasiva al tabaco con 55.6% y 83%. Un total de 11% de pacientes incluidos en el estudio presentaron displasia de los que el 50% de estos presentaron carcinoma in situ. (Aburto, 2015)

3. Justificación

El virus del papiloma humano (HPV) forma parte de un grupo de virus ADN heterogéneo llamados papillomaviridae; este virus, es causante de múltiples lesiones hiperplásicas, verrugosas y papilomatosas. La papilomatosis laríngea es una enfermedad viral crónica causada por el Virus del Papiloma Humano (VPH), generando cambios en los queratinocitos del epitelio escamoso estratificado y lesiones hiperproliferativas de las mucosas y de la piel; las cuales pueden desarrollar verrugas, displasia leve hasta un carcinoma epidermoide agresivo, presenta un curso impredecible, esto hace que el cuidado para el paciente sea intensivo, laborioso y a veces frustrante para el paciente y su médico. (Hobbs, 2008)

El elevado potencial de recurrencia, localización múltiple y el conocimiento incompleto del mecanismo patogénico hace que la papilomatosis laríngea sea un problema terapéutico. Actualmente, en Nicaragua, se diagnostican cerca de 2 a 4 pacientes con papilomatosis laríngea al año. Los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de cáncer de laringe son el tabaco y el alcohol, pero se han vinculado otros factores como la infección del virus del papiloma humano (VPH). (Castillo, 2014)

Aunque la papilomatosis es una neoplasia benigna, la progresión a carcinoma puede ocurrir en 3 a 7% de los casos. (Omland, et. al. 2014)

Por consiguiente, se destaca la importancia del presente estudio que permita identificar los genotipos de VPH alto y bajo riesgo mediante la técnica de PCR punto final, en pacientes diagnosticados clínicamente con papilomatosis laríngea, de esta manera contribuir a complementar el diagnóstico clínico del mismo proporcionando información al médico para evaluar el seguimiento de los pacientes.

Con esta investigación los beneficiados son los pacientes, además es fundamental, ya que permite decidir una intervención terapéutica, establecer el pronóstico en la evolución de la papilomatosis, además de servir como antecedente a futuras investigaciones, ya sea en monitorear la respuesta a los tratamientos antivirales específicos, indicar la necesidad de una vacunación y desde el punto de vista epidemiológico la implementación de medidas de prevención en la salud pública.

4. Planteamiento Del Problema

Formulación del problema.

¿Cuál es la frecuencia de genotipos del virus de papiloma humano mediante la técnica de PCR punto final en pacientes con lesiones papilomatosas de laringe atendidos en un Hospital de Managua?

Sistematización del problema.

- ¿Se podrá detectar los genotipos de alto y bajo riesgo de VPH mediante PCR punto final, en pacientes con papilomatosis laríngea?
- ¿Cuáles son las coinfecciones presentes de bajo y alto riesgo en las muestras tomadas?
- ¿Es posible relacionar la frecuencia de los genotipos de VPH en pacientes con papilomatosis laríngea, según edad, sexo y número de intervenciones quirúrgicas?

5. Objetivos

Objetivo general

Determinar la frecuencia de genotipos virus de papiloma humano mediante la técnica de PCR punto final, en pacientes con lesiones Papilomatosas de laringe atendidos en un Hospital de Managua en el periodo febrero 2017 – enero 2018.

Objetivo específico.

1. Detectar los genotipos de alto y bajo riesgo de VPH mediante PCR punto final, en pacientes con papilomatosis laríngea.
2. Identificar las coinfecciones por VPH de bajo y alto riesgo en las muestras analizadas.
3. Relacionar la frecuencia de los genotipos de VPH y las coinfecciones en pacientes con papilomatosis laríngea, según edad, sexo y número de intervenciones quirúrgicas.

6. Marco teórico

6.1. Generalidades del Virus del papiloma humano

Los Virus del Papiloma Humano (VPH) son un grupo de virus de ADN de doble banda que inicialmente se le consideraba parte de la familia Papovaviridae, pero las diferencias genéticas halladas hicieron que hoy se los considere como miembros de la familia Papilomaviridae, que es independiente de la *Poliomaviridae*. Como todo virus, tiene genes tempranos, que son regulatorios y genes tardíos que codifican a las proteínas estructurales. (Carballal, G.J, 2014)

Existe un gran interés en los VPH como causa de malignidad. El resultado de la infección por este virus es la formación de un crecimiento benigno, verruga, o papiloma, ubicado en cualquier lugar del cuerpo. Al menos 58 diferentes VPH han sido identificados usando técnicas moleculares, estableciendo su relación con tipos particulares de tumores. La replicación de los virus papiloma depende del grado de diferenciación de los queratinocitos; las partículas virales maduras sólo se detectan en los núcleos de los estratos granuloso y córneo. Los efectos citopáticos que se observan en el epitelio, tales como la presencia de inclusiones intra-citoplasmáticas o nucleares, o la vacuolización peri-nuclear que caracteriza a las células coilocíticas, son secundarios a la interferencia ocasionada por el virus en la diferenciación de la célula huésped. (Castellsagué, 2008)

6.1.1. Estructura del virus

Los papilomas son pequeños virus de Ácido desoxirribonucleico (DNA), no poseen envolturas y presentan una cápside proteica de simetría icosaédrica, compuesta por 72 unidades denominadas capsómeros, esto brinda al virión una forma casi esférica, al ser observado por microscopia electrónica. (Ver figura 1)

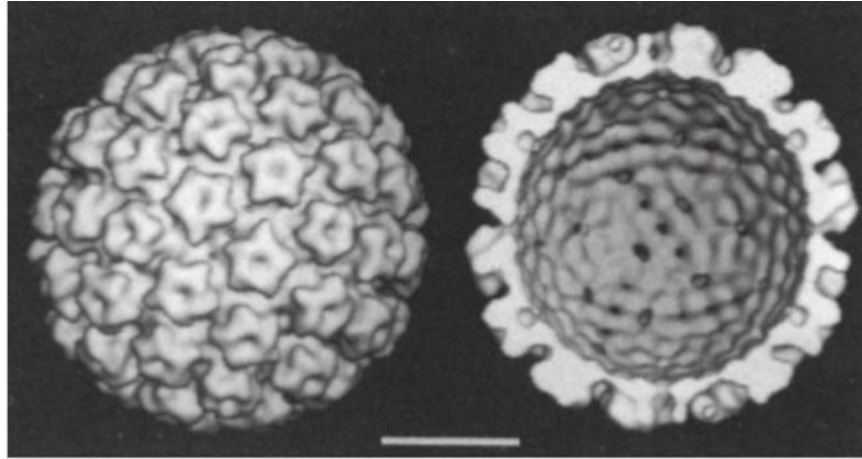


Figura 1. Microfotografías de crioelectrónica del papiloma virus humano. Izquierda: se muestran 72 capsómeros. Derecha: sección por ordenador de la cápside que muestra la interacción de sus capsómeros y canales. (Biophys J, 1991)

El genoma codifica para 6 proteínas tempranas que son las responsables de la réplica del virus, y dos proteínas tardías L1 Y L2 que son las proteínas estructurales virales.

Los análisis bioquímicos revelaron que: la cápside formada por dos proteínas estructurales, la proteína principal, L1 y la proteína menor, L2. La primera constituye el 75% del contenido proteico total, muestra propiedades antigénicas específicas comunes a la familia, mientras que la segunda aparenta ser altamente específica. La cápside encierra al genoma viral y lo protege durante la transmisión de la infección. El genoma constituido por una molécula de ADN doble cadena circular, covalentemente cerrada, conocido como episoma. El ADN del HPV contiene alrededor 8.000 pares de bases. (Carballal, 2014)

Todos los ADN secuenciados de los distintos HPV evidencian una gran similitud en su organización genómica. Poseen diez marcos de lectura abiertos diferentes; cada uno de ellos representan un gen viral que codifica una proteína responsable de características biológicas tales como el rango del hospedador, el tropismo tisular y la patogenia de la infección. El genoma puede ser dividido en tres regiones: *la región larga de control (LCR)*, *la región temprana (E, por early)* y *la región tardía (L, por late)*; estas dos últimas deben su nombre al momento en que se expresan durante los ciclos replicativos del virus. (Ver figura 2)

LCR, también conocido como *upstream regulatory region* (URR) o *región no codificadora*, representa el 15% del genoma viral. Es responsable de la regulación de la replicación del gen viral y controla la transcripción de algunas secuencias de la región E. Los distintos tipos virales muestran marcadas diferencia en su secuencia nucleotídica. Ha sido correlacionada con cambios en la virulencia y el potencial oncogénico. (Carballal, 2014)

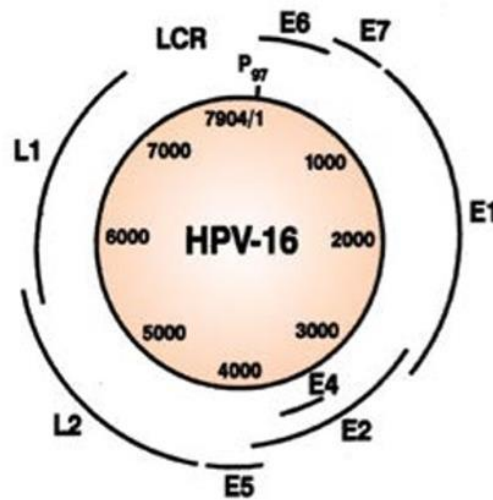


Figura 2. Representación esquemática del genoma HPV 16. Se indican los genes tempranos (E), tardíos (L) y la región reguladora (LCR).(Carballal, 2014)

La región E es un largo segmento que representa alrededor del 45% del genoma del viral. Contiene al menos siete marcos de lectura abiertos nombrados de acuerdo a su tamaño relativo. Codifica proteínas involucradas en la transcripción viral (E2), replicación del ADN viral (E1 y E2), la proliferación celular (E5, E6 y E7), la transformación celular (E6 y E7) y posiblemente su infectividad (E4). La región L comprende alrededor del 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos, imprescindibles para la formación de la cápside viral. L1 codifica la proteína principal de la cápside. L2 codifica la proteína menor de la cápside. (Carballal, 2014)

6.1.2. Tropismo viral

Los virus del papiloma humano son específicos para cada especie y tienen un tropismo específico definido por el tejido epitelial estratificado queratinizado en el que pueden proliferar mediante síntesis del ADN viral, producción de proteínas virales y ensamblaje del

virio. El virus penetra en las células basales, donde produce una infección subclínica, latente. La replicación viral interfiere en la maduración epitelial normal y produce un efecto citopáticos con acumulaciones intracitoplasmáticas que se manifiestan como cambios coilocíticos. Estas células epiteliales transformadas proliferan para formar tumores papilomatosos de epitelio escamoso fibroepiteliales. (Leonardo, 2011)

6.1.3. Ciclo de replicación del HPV

El ciclo de vida del VPH puede dividirse en dos etapas: una productiva y otra no productiva. En la etapa no productiva, el genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma (elemento genético autorreplicativo). Este evento ocurre en las células basales del epitelio estratificado, donde el virus replica su ADN para mantener un número de 50-100 copias del genoma dentro de las células basales y parabasales. Al dividirse la célula infectada, una de las células hijas permanece en la parte basal del epitelio, mientras que la otra célula inicia un proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio. (Betancourt, 2004)

El virus necesita la maquinaria replicativa de la célula para la síntesis del ADN vírico, la cual es poco eficiente en las células diferenciadas. Sin embargo, el virus estimula la progresión de la fase celular G1-S en una célula diferenciada y de esta forma produce un ambiente adecuado para la replicación del ADN (ver figura 3). En la etapa productiva, el genoma vírico se amplifica de modo que aumenta el número de copias presentes en la célula y se expresan los genes tardíos que codifican las proteínas de la cápside. (Betancourt, 2004)

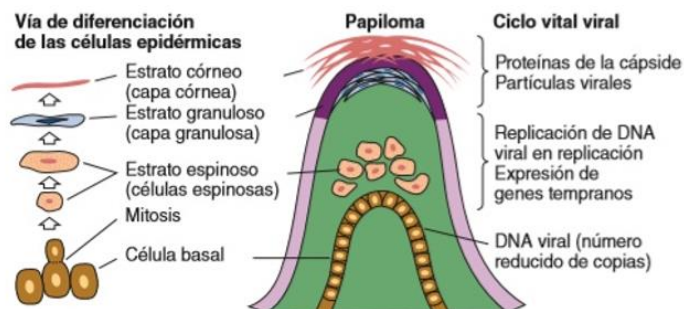


Figura 3. Representación esquemática de una verruga cutánea. El ciclo vital del papilomavirus está ligado a la diferenciación de las células epiteliales. *Izquierdo* células epidérmicas. (Betancourt, 2004).

Podría pensarse que el ciclo vírico productivo y no productivo ocurre de forma independiente, pero sucede dentro de la misma célula. De esta forma las células infectadas y parcialmente diferenciadas amplifican el ADN vírico en la placa granular, transcriben y traducen los genes tardíos en la parte superior del epitelio, donde se ensamblan las partículas víricas infecciosas. (Ver figura 4)

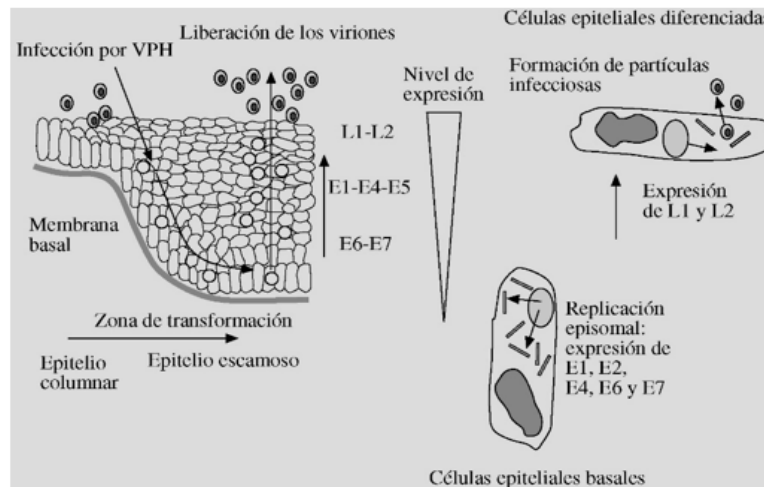


Figura 4. Replicación de las partículas del virus del papiloma humano (VPH). En las células basales, la expresión de los genes víricos está controlada por factores celulares, mientras que en los estratos superiores, las células infectadas amplifican el genoma vírico. Finalmente, las partículas víricas son liberadas a lo largo de las células escamosas, las cuales son exfoliadas a la superficie del epitelio.

6.1.4. Clasificación de los genotipos virales.

Se basa en forma exclusiva en la caracterización del genoma, y se diferencian mediante el parentesco de su secuencia de ADN. Se han identificado más de 130 tipos, aunque solo unos 80 han sido completamente caracterizados. Todos los tipos de VPH se distinguen por ser epiteliotropos y según el epitelio que infectan, clásicamente, se han dividido en cutaneotropos y mucosotropos. Los tipos mucosos infectan preferentemente a la mucosa genital, aunque también han sido detectados en la mucosa respiratoria y digestiva. En ambos grupos se han detectado algunos tipos de HPV con claro potencial oncogénico (HPV de alto riesgo), como sucede en la epidermodisplasia verruciforme y en el carcinoma de cuello de útero. (Serena & Bologna, 2011)

Las diferencias genóticas entre los tipos de papilomavirus vienen marcadas por los diferentes aminoácidos que constituyen la proteína L1 (Proteína estructural del virus que posee además efecto antigénico). Son las características de esta proteína las que hacen que el virus pueda ser tratado como de “Bajo o Alto riesgo” y por ello su genotipo específico es el que se usa para poder clasificar a estos virus. Según el genotipo de la proteína L1 podremos clasificar los virus como: L1 tipo 16, L1 tipo 18 o como VPH-16, VPH18 respectivamente. (Bar & Chalian, 2008)

6.1.5. VPH alto riesgo

Los genotipos más frecuentes son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 82. Estos se consideran de alto riesgo porque pueden encontrarse asociados con cánceres invasivos de cuello uterino, vulva, pene o ano, así como otros sitios anatómicos. Una historia de infección con uno o más genotipos de VPH de alto riesgo, se cree ser un prerrequisito para el desarrollo de cáncer (siendo la mayoría de las infecciones con VPH no son de alto riesgo). (D´Souza, 2007)

En un estudio sobre la asociación de infecciones virales en cáncer presenta que a nivel mundial la frecuencia de cáncer de cabeza y cuello varía según la localización anatómica específica, el cáncer bucal es el más frecuente con un 45,6% (lengua 21%, encima 5%, piso de boca 2%, labio 2.5%, otras localizaciones de la mucosa oral 14.1%); en glándulas salivares mayores es del 15.3%; el cáncer faríngeo abarca el 15% (orofaringe 5.7%, laringofaringe 4.6%, nasofaringe 4.5%) y lugares sin especificar abarcan el otro 24.6%. Es más frecuente en hombres que en mujeres y tiene una máxima incidencia en la quinta y sexta década de la vida. (Serena & Bologna, 2011)

Los tipos 16 y 18 presentan grados de displasia moderada y severa con pocos signos de actividad viral, estas lesiones podrían resultar malignas debiendo considerarse la infección por VPH en la Laringe, especialmente producida por subtipos 16 y 18, como de riesgo, dado que estas serían cofactores carcinogénicos. Cada uno de los tipos de VPH 31, 33, 45, 52 y 58 representa entre un 2% y un 4% de los cánceres. Cada uno de los otros tipos de alto riesgo representa un 1% o menos de los cánceres. (Clifford, Smith, & M., 2003)

La forma diseminada puede mostrar una base ancha que incluso infiltra la submucosa. Es difícil removerlos completamente, es necesario realizar varias sesiones con láser, debido a que esta patología tiende a la recurrencia a pesar del tratamiento. Tienen tendencia a la malignización si llevan mucho tiempo en el árbol traqueo-bronquial. Los papilomas que son positivos a VPH 16 y 18 son los que tienen riesgo de transformación maligna (carcinoma de células escamosas), por lo que es necesaria la vigilancia con broncoscopia de control.

6.1.6. VPH Bajo riesgo

Los genotipos más frecuentes son: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 73, 81. Estos pueden causar cambios benignos o de bajo grado, aparecen en asociación con cánceres invasivos. Los sitios anatómicos afectados son importantes para funciones como el habla, la deglución, el gusto y el olfato, por lo que los tipos de cáncer y sus tratamientos pueden tener considerables secuelas funcionales, con la siguiente alteración de la calidad de vida. (Mehana, 2010)

La papilomatosis laríngea representa una de las formas más comunes de tumores benignos del tracto aero-digestivo inducidos por infección por VPH, que también incluyen a la cavidad oral, hipofaringe, esófago y sistema bronquial. Los genotipos virales más frecuentes detectados son HPV 6 y 11. (Bosh, 2003)

La localización más frecuente es la glotis y subglotis, tiende a producir lesiones exofíticas y puede presentar diseminación traqueo-bronco-alveolar en pocos casos, se cree que diseminan por contagio o por siembra, por lo que los papilomas se pueden extender hacia todo el árbol tráqueo-bronquial. Si se disemina hacia el parénquima pulmonar, pueden producir nódulos que se cavitan. Histológicamente aparecen como masas pedunculadas con protrusiones de dedos de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, suspendido por un estroma de tejido conectivo altamente vascularizado. (Castillo, 2015)

Se caracteriza por una histología proliferativa benigna, sin embargo, por su recurrencia y tendencia a la diseminación, se le considera alta morbilidad, requiriéndose para su tratamiento, en la mayoría de los casos, resecciones quirúrgicas periódicas. El comportamiento clínico es variable: las lesiones regresan con frecuencia, en ocasiones persisten y raramente progresan a cáncer (en general asociado al tabaquismo). (Bosh, 2003)

6.1.7. Patogenia.

Los VPH son virus epidermotróficos con afinidad y capacidad de infectar cualquier tipo de epitelio escamoso. Desde el momento de la infección, que sucede a partir de pequeñas soluciones de continuidad en la superficie cutáneo-mucosa, se establece un periodo de incubación variable que oscila entre 6 semanas y dos años. La célula diana es el queratinocito, situado en la lámina basal, en estas células basales se produce la transcripción de los genes tempranos. (Guerra T. , 2001)

En las lesiones benignas, el ADN viral se localiza en la posición extracromosómica del núcleo celular de lo contrario, en las lesiones displásicas y en los cánceres, el ADN viral se encuentra integrado en el cromosoma celular y se inserta rompiendo la región E2. Esta circunstancia puede explicar la malignización de la lesión, ya que la expresión de la proteína E2 regula la expresión de la proteína E6 y E7, cuyos productos interfieren con las proteínas supresores de tumores, la p53 y el oncogén del retinoblastoma (Rb). Esta actividad transformadora es mayor en los genotipos de VPH que consideramos de alto riesgo (16 y 18). (Guerra T. , 2001)

6.2. Papilomatosis laríngea

La papilomatosis laríngea es una enfermedad viral crónica por Virus del Papiloma Humano (VPH), generando cambios en los queratinocitos del epitelio escamoso estratificado y lesiones hiperproliferativas de las mucosas y de la piel; las cuales pueden desarrollar verrugas, displasia leve hasta un carcinoma epidermoide agresivo. La distribución de la papilomatosis laríngea es bimodal, con distribución en población juvenil prevalente en menores de 5 años hasta en un 25% y la distribución en edad adulta.(Hobbs, 2008).

Debido a su elevado potencial de recurrencia, localización múltiple, especialmente en laringe y el conocimiento incompleto del mecanismo patogénico, el índice de prevalencia de la enfermedad se mantiene elevado y a través del tiempo se ha convertido en un verdadero problema terapéutico. (Jung & Briolat, 2009)

La papilomatosis laríngea presenta un curso impredecible, esto hace que el cuidado para el paciente sea intensivo, laborioso y a veces frustrante para el paciente y su médico. Algunos

estudios reportan, que los costos de cuidados médicos en la población pediátrica pueden ser de 109 millones de dólares por año, distribuidos en uso de quirófanos, hospitalización y cuidados médicos.

La Papilomatosis Laríngea Juvenil es la neoplasia benigna de laringe más común que se detecta en el nacimiento y los primeros años de vida. El diagnóstico de la enfermedad es determinado por la clínica caracterizada principalmente por disfonía, tos, estridor y disnea progresiva; en casos graves de obstrucción intensa, puede provocar la aparición de insuficiencia respiratoria que muchas veces compromete la vida del paciente. El curso de la enfermedad se caracteriza por múltiples ciclos de crecimiento y regresión, en muchos casos se produce una remisión espontánea habitualmente alrededor de la pubertad. Es típico que la PLJ se manifieste como crecimientos verrugosos múltiples friables e irregulares en la laringe. Las lesiones afectan sobre todo las cuerdas vocales verdaderas y falsas aunque también se encuentran en otras partes de la laringe y aparato digestivo superior. Se descubren lesiones traqueo esofágicas en 2 % al 15 % de los casos. (Castillo, 2015)

Las infecciones por VPH 11 presentan una mayor tendencia a ser más graves, a requerir la intervención quirúrgica con más frecuencia, a precisar tratamientos complementarios, a desarrollar patología traqueal y pulmonar y a requerir una traqueotomía. El síntoma de presentación clásico de la PRR es una ronquera o un llanto débil crónicos en un niño de 2 a 4 años. La otra causa más frecuente de ronquera en el niño es el abuso de la voz, con nódulos secundarios en las cuerdas vocales, es decir, una laringitis localizada. Casi el 75% de los pacientes con PRR se diagnostican antes de los 5 años de edad, y casi todos antes de cumplir 7 años. Si se retrasa el diagnóstico, las masas de tipo verrugoso crecen progresivamente y dan lugar a afonía y posteriormente a obstrucción de las vías respiratorias altas. (Zacharisen, 2006)

6.2.1. Epidemiología.

Todos los VPH se transmiten por contacto piel/mucosas a piel/mucosas. Se trata de virus muy estables que no poseen membrana de envoltura. Resisten bien las condiciones adversas del medio y son muy efectivos.

El VPH tiende a inducir una infección latente generalizada debido a la interferencia con la función inmune del huésped. El sitio anogenital es el reservorio primario del VPH. El VPH

puede transmitirse desde el sitio anogenital de la madre al tracto respiratorio del bebé durante e incluso antes del parto a través de la placenta infectada y el líquido amniótico, lo que da como resultado una PRR de inicio juvenil después de meses o años, mientras que en adultos puede transmitirse a través de Contacto sexual oral-genital. Las verrugas anogenitales maternas durante el embarazo pueden ser un factor de riesgo primario para el inicio de la PRR en los jóvenes. En los adultos, la RRP puede ser causada por factores de alto riesgo, como la actividad sexual y / o el sexo oral con múltiples parejas. Además, la enfermedad por reflujo de ácido extraesofágico es un factor de alto riesgo para la PRR. (Xue & Wang, 2010)

La Papilomatosis Laríngea es producida por el virus del papiloma humano, tipo 6 y 11 con mayor frecuencia, con menor frecuencia el tipo 16,18 y 33.

La infección por VPH se adquiere por contacto directo a través de pequeñas roturas de la piel o la mucosa, durante las relaciones sexuales o durante el paso del feto a través del canal del parto infectado.

El curso de la enfermedad se caracteriza por múltiples ciclos de crecimiento y regresión donde el virus persiste en el hospedador y es probable la difusión asintomática, en muchos casos se produce una remisión espontánea habitualmente alrededor de la pubertad. Es típico que se manifieste como crecimientos verrugosos múltiple friables e irregulares en la laringe. Se descubren lesiones traqueo esofágicas en 2 % al 15 % de los casos. Su mayor incidencia en las dos primeras décadas de la vida la colocan como la lesión tumoral benigna de laringe más frecuente de la infancia. (Karagas & Waterboer, 2010)

En Estados Unidos, la incidencia infantil es de 4,3 por 100 000 niños con una frecuencia mayor entre los 2 y 4 años. Debido a su elevado potencial de recurrencia, la localización múltiple, especialmente en laringe, el índice de prevalencia de la infección por virus de papiloma humano se mantiene elevado y a través del tiempo se ha convertido en un problema terapéutico. (Karagas & Waterboer, 2010)

Se conocen dos formas distintas de la enfermedad: la papilomatosis juvenil (más agresiva) y la forma adulta (menos agresiva). En los casos de papilomatosis juvenil, la distribución por género es la misma y se diagnostica entre los 2 y 4 años de edad. En la papilomatosis de

inicio en la edad adulta, existe ligera predilección por el género masculino y es diagnosticada entre los 20 y 40 años. (Alarcon L, 2013)

El modo de transmisión no está bien establecido. Hay reportes en recién nacidos, lo que sugiere infección en el útero. Se ha identificado ácido desoxirribonucleico (ADN) viral en el cordón umbilical de niños de madres con VPH que nacieron por cesárea y se ha encontrado ADN viral en amígdalas de niños sin papilomatosis respiratoria, en 2 % de la población general, ello sugiere que no es suficiente la infección para la aparición de la enfermedad. (Herrera E & Torres, 2013)

6.2.2. Etiopatogenia.

La papilomatosis laríngea se caracteriza por el rápido y recurrente crecimiento de lesiones exofíticas que se ubican en la mucosa respiratoria, con mayor frecuencia en la región glótica, provocando disfonía que puede progresar a la afonía, a medida que aumenta la cantidad de papilomas en la región glótica se presenta un cuadro de obstrucción respiratoria variable con disnea y estridor inspiratorio que de no tratarse progresará invariablemente a la obstrucción total de la laringe y a la muerte por asfixia lo que obliga a realizar escisiones quirúrgicas frecuentes para evitar la oclusión total de la vía aérea. (Ver anexo, figura 6)

La enfermedad se caracteriza por la tendencia a la recidiva, observándose un patrón particular que puede estar relacionado con el tipo de VPH, aspectos genéticos y factores inmunológicos propios en cada paciente. (McKenna & Brodsky, 2005)

El número total de genotipos de VPH se ha incrementado notoriamente en los últimos 20 años, de los cuales unos 25 han sido detectados en la laringe.

La tipificación virológica de las cepas involucradas es muy importante por dos razones: 1) los tipos VPH 6 y 11 están relacionados con la recurrencia de la papilomatosis laríngea y con la condilomatosis genital y 2) Los tipos VPH 16, 18 y 30 se relacionan con procesos de malignización especialmente de laringe.

Se ha demostrado una clara relación entre los condilomas de la madre y el desarrollo de papilomas laríngeo en niños, los pacientes afectados con el tipo 11 tienden a tener un peor

curso de enfermedad, la cual llega a producir mayor obstrucción de la vía aérea, más tempranamente y por lo tanto existe mayor necesidad de traqueotomía.

6.2.3. Anatomía patológica

Las lesiones con apariencia clínica blanquecina presentan capas de queratina más gruesa, se puede encontrar en la capa de células espinosas un alto concentrado de coilocitos, que son células epiteliales con núcleos pequeños, oscuros y halo claro característico de VPH. En algunos papilomas se puede encontrar hiperplasia basilar, así como actividad mitótica, que puede ser confundida con una displasia epitelial leve.

Las primeras lesiones suelen aparecer en las cuerdas vocales y se pueden extender a toda la laringe, e incluso sobrepasarla invadiendo hipofaringe y árbol traqueo bronquial. La localización extra laríngea de la papilomatosis respiratoria se ha identificado en el 30% de los niños y en el 16% de los adultos con Papilomatosis laríngea. Los lugares extra laríngeos más frecuentes en orden decreciente son: la cavidad oral, tráquea, bronquios y esófago. Estas localizaciones poseen características histológicas comunes: se trata de uniones entre dos tipos de epitelio, uno escamoso y otro ciliado. Los papilomas localizados en labios, vestíbulo nasal, velo del paladar o pilares amigdalinos tienen poca tendencia a extenderse y raras veces recidivan después de la exéresis. No ocurre lo mismo con los papilomas traqueales y bronquiales. Macroscópicamente son lesiones grisáceas, blanquecinas o rosadas, pediculadas o sésiles cuyo aspecto puede cambiar debido a la presencia de fibrosis y cicatrices laríngeas. (Schraff, Derkay, & Burke, 2004)

En ocasiones existen atipias celulares que son más numerosas cuanto más extendida esté la enfermedad y más grave es su curso. Estudios histoquímicos han encontrado la presencia de altas concentraciones de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y proteína P53 en las células afectas. Su significado no está claro: puede ser un indicio de la actividad proliferativa del epitelio o fruto de una mutación del gen p53, lo que sería un factor favorecedor de transformación maligna. Es posible detectar ADN de VPH de los tipos 6 y 11 en las lesiones y mucosa adyacente.

6.2.4. Respuesta inmune

Los virus a diferencia de las bacterias, no son microorganismos independientes, pues necesitan de una célula para insertar su material genético y así estar activos. Una vez que invaden la célula pueden estar en dos fases: lisogénica y lítica. Durante la fase lisogénica, la célula huésped continúa con su función normal a pesar de la invasión viral. Durante la fase lítica, el virus se apropia de la célula alterando sus funciones y la utiliza para su reproducción. Una vez concluida su reproducción, la célula muere y el virus sale a continuar su proceso de reproducción en otras células. Es por tal motivo que el virus puede estar presente en el ser humano sin manifestar lesiones inmediatas, sino hasta después de un cierto periodo. (Bar & Chalian, 2008)

Durante la replicación del virus se produce una interferencia con la diferenciación de las células huésped, que provoca efectos citopáticos como la acumulación de material viral con formación de inclusiones intracitoplasmáticas o nucleares o bien la vacuolización perinuclear que caracteriza a las células coilocíticas.

La inmunidad celular y la innata son probablemente los factores más importantes en la resistencia del huésped, lo que es sugerido por el infiltrado de células T y la necrosis celular que se observa en el sitio de regresión de las verrugas, así como la participación de las células presentadoras de antígenos y la secreción de citoquinas proinflamatorias. (Concha, 2007)

La inmunidad específica contra el HPV incluye la formación de anticuerpos y de células T citotóxicas específicas. Tal proceso requiere la exposición de antígenos virales por las células presentadoras de antígenos, en conjunto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Partículas virales o antígenos liberados por las células infectadas, después de la endocitosis, son procesados en los lisosomas y se presentan a los linfocitos T CD4. Por otro lado, los antígenos expresados intracelularmente son transferidos a la superficie celular y se presentan como péptidos a los linfocitos T CD8. (Carballal, 2014)

Dependiendo de los alelos del MHC, la presentación de los antígenos virales puede estar aumentada o disminuida, según el individuo, lo cual lleva a diferentes grados de susceptibilidad para la infección por el HPV.

El papel de la inmunidad está bien documentado por el surgimiento de varios tipos de verrugas en poblaciones inmunodeprimidas. La inmunidad humoral es importante en la neutralización e inactivación de los virus, además de la prevención y diseminación de la

infección por el HPV, y se manifiesta por la presencia de anticuerpos anticapside. La inmunidad celular está relacionada con la regresión de verrugas.

6.2.5. Mecanismos de transmisión

El VPH se caracteriza por su afinidad a los epitelios (epilotrópico), es decir, a todas las zonas cubiertas por piel, mucosa o ambas. La transmisión de este virus ocurre cuando entra en contacto con dichas áreas permitiéndole así su transferencia entre las células epiteliales.

Esta infección se adquiere por contacto con la mucosa cervical al atravesar el canal del parto en una mujer con condilomas vaginales, infección intrauterina a través de la placenta o por vía hematogena (debido a que se ha encontrado ADN viral en la sangre del cordón umbilical de recién nacidos en madres con condilomatosis asintomáticas) y contacto sexual.

Sun y colaboradores niegan la transmisión horizontal de la papilomatosis y defienden la transmisión vertical de la madre al hijo por los condilomas vaginales; estudiaron la presencia de HPV en las mucosas de las vías aerodigestivas superiores y en los papilomas de siete niños con papilomatosis recidivante, así como en las mucosas de sus familiares mediante la reacción en cadena de la polimerasa y las técnicas de hibridación de DNA. En seis de los siete pacientes detectaron la presencia del HPV en los papilomas y en la mucosa endolaríngea, cuatro del tipo 6 y dos del tipo 11. Los resultados fueron negativos en los familiares, lo que induce a pensar que no es posible la transmisión horizontal del HPV y sí la transmisión vertical de madre a hijo por los condilomas vaginales. (Duarte, 2012)

6.2.6. Factores de riesgo asociados con Papilomatosis laríngea.

El hábito de fumar produce un efecto químico supresor del sistema inmunológico e inhibe la capacidad del epitelio de protegerse así mismo del VPH. La respuesta inmune está considerada como un mecanismo efector en la resistencia a tumores y se relaciona desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión.

El tabaco por una parte contiene cancerígenos que dañan el ADN celular, siendo esto una fase precursora del cáncer. Por otra parte el consumo del etanol (presente en bebidas alcohólicas) inhibe la producción y la actividad del gen p53, siendo este el encargado de

reparar el ADN dañado en la célula o de producir apoptosis, para que no ocurra una reproducción de una célula dañada. (Lewin *et al.*, Gallegos; 2005)

La combinación del consumo crónico de estas sustancias nocivas a la salud, produce una vulnerabilidad ideal para que el VPH pueda actuar y reproducirse formando lesiones tumorales. (Lewin *et al.*, Gallegos; 2005)

Los resultados de diversos estudios sugieren una infección latente de las cuerdas vocales y tienen valor la predisposición genética como la asociada a los factores de riesgo como la edad, el comportamiento sexual y actividad del sistema inmunológico. (González *et al.*; 2008)

El conocimiento de la etiología de estas lesiones atribuidas al virus del papiloma humano posibilita que las personas tomen conciencia de los factores de riesgo para disminuir su prevalencia.

6.3. Diagnóstico

Las técnicas disponibles son técnicas morfológicas para la detección del virus (citología, histopatología, incluso técnicas de microscopía electrónica. Técnicas basadas en la detección del ADN viral mediante hibridación o amplificación.

Estudios han establecido los límites de sensibilidad y especificidad de cada una de las técnicas y variantes descritas. Al igual que ocurre con la citología, la calidad del análisis del ADN está condicionada por una serie de factores técnicos y de conservación de la muestra que en ocasiones son determinantes para el resultado.

La Detección del ADN del VPH sugiere que su material genético está presente en más de 90% de las lesiones escamosas pre malignas y malignas de los carcinomas escamosos y sus localizaciones. La enfermedad se caracteriza por la tendencia a la recidiva, observándose un patrón particular que puede estar relacionado con el tipo de VPH, aspectos genéticos y factores inmunológicos propios de cada paciente.

6.3.1. Detección del genotipo viral por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Técnicas de biología molecular: se usan para la detección y tipificación de HPV, especialmente cuando el diagnóstico clínico o histopatológico es dudoso. También se recurre a ellas para determinar la presencia de virus en las lesiones pre malignas o malignas ya tratadas, lo cual constituye un factor de riesgo de recurrencia.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares. Fue desarrollada en 1986 por el Dr. Kary Mullis. La idea fundamenta la necesidad de obtener un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN.

La ampliación *in vitro* de la PCR se apega a las mismas reglas de replicación; esto se basa en una secuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. También, la síntesis de la cadena sigue la dirección 5'-3', ya que requiere de un oligonucleótido con el extremo 3' libre que proporciona el grupo OH para la adición del siguiente oligonucleótido, con lo que se forma el enlace fosfodiéster.

Para que se lleve a cabo la PCR se requiere una cadena de ADNg o ADNc que sirva de molde, una enzima ADN polimerasa, cofactores necesarios para la actividad correcta de la ADN Polimerasa, desoxinucleótidos (dNTP) para la síntesis del producto de PCR y oligonucleótidos o *Primers*.

Los modernos métodos comerciales como el denominado Hybrid Capture 2® (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) a diferencia de las versiones anteriores, tienen una adecuada relación entre sensibilidad y especificidad si se establecen puntos de corte adecuados (1pg de ADN; equivalentes a 100,000 copias del genoma viral. La utilización de un Cocktail de 13 sondas de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y otro grupo de bajo riesgo que incluye 5 tipos (6, 11, 41, 43, y 44) permite la detección de cualquiera de estos tipos en la reacción, si bien no permite la identificación de VPH específicos. Este ensayo fue el primero aprobado por la FDA en el cribado de cáncer de cuello uterino.

Se pretende que al realizar análisis moleculares se convierta en una técnica esencial en el diagnóstico y manejo de la papilomatosis laríngea, debido a que en pacientes tipificados para los genotipos 6 y 11 dieron positivos, lo cual describe al VPH como agente etiológico. (Peñaloza & Montoya, 2000)

El DNA extraído y purificado de la muestra clínica de Tejido laríngeo, se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual debe su nombre a la actividad de la enzima ADN polimerasa que permite crear ADN a partir de su cadena complementaria. Con este método se logra la amplificación de un fragmento específico de ADN gracias a la multiplicación exponencial del mismo. (Eva Mas, 2001)

Empleando cebadores genéticos específicos de los genotipos virales 6 y 11 (Primers 6F-6R y Primer 11F-11R), y el cebador ALBUMINA que se encuentra en todos los individuos independiente mente de la presencia o no de genotipos de VPH, por lo que constituye un control interno de la reacción. Es posible detectar mediante esta manera un amplio espectro de HPVs que habitualmente afectan el trato aerodigestivo. El producto de esta amplificación puede verse como múltiples bandas en un gel de Agarosa. (Ver figura 9 ,10).

PCR en punto final, es aquella en la que el producto se analiza después de 25 a 35 ciclos en el punto previo a la saturación de la reacción, mediante un gel de electroforesis. La detección en punto final depende de la resolución del gel agarosa, que puede ser baja y no permite detectar cambios en la concentración, más de una molécula de bromuro de etidio puede unirse a un solo producto de PCR y, por tanto presenta una sensibilidad menor que la PCR en tiempo real.

Los estudios de biología molecular son de gran potencial como herramienta diagnóstica y pronóstico, utilizando métodos basados en la amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa. Sin embargo, el procedimiento de extracción de DNA a partir de muestras biológicas, demuestra que tiene un impacto significativo sobre la sensibilidad y reproducibilidad de esta prueba molecular. Por ello es de vital importancia desarrollar un método de extracción de DNA que permita obtener genoma amplificable con un óptimo rendimiento.

Para la ciencia es relevante el esclarecimiento de los VPH relacionados con esta secuencia de transformación maligna a través de la tipificación molecular. Además se contribuye a las imprecisiones de diagnóstico clínico por metodologías convencionales que dificultan la detección precoz del cáncer de vías aerodigestivas. La realización entre genetistas y médicos en diagnóstico molecular por PCR son tan contundentes que contribuyen a la toma de decisiones de programas de prevención y control de diferentes tipos de neoplasias malignas. (Quer et al., 2001)

6.3.2. Tratamiento para papilomatosis laríngea.

En el momento actual, ningún tratamiento único ha mostrado efectividad para erradicar la PPR. El tratamiento estándar actual es exéresis quirúrgica completa de los papilomas y la preservación de estructuras normales. En pacientes con afectación de la comisura anterior o posterior con papilomas de alta agresividad, el objetivo debe ser asegurar la vía aérea preservando el tejido sano para evitar complicaciones como estenosis glóticas o subglóticas, o la formación de sinequias que reduzcan el espacio glótico. Debemos prestar especial atención a la comisura anterior: en esta zona solo debe tratarse un lado por sesión. En las formas graves a veces es necesario recurrir a una traqueotomía pero en cuanto la extensión de las lesiones lo permite debemos retirarla para evitar la diseminación de los papilomas.

El tratamiento de la PPR infantil depende del grado de afectación de las vías respiratorias. Si el niño se presenta con dificultad respiratoria aguda por obstrucción de las vías altas, puede ser necesaria una traqueotomía. Los métodos actuales más comunes de tratamiento son la exéresis con láser CO2 o microdesbridador endolaríngeo por laringoscopia directa.

6.3.2.1. Cidofovir:

El cidofovir es un agente antiviral que se utiliza en el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus en personas con SIDA. El cidofovir suprime la replicación viral por inhibición selectiva de la síntesis de ADN viral, al actuar sobre la ADN polimerasa. También fue utilizado en el tratamiento del virus del Herpes y adenovirus. El cidofovir se aplica en el sitio de implantación de los papilomas luego de su exéresis. Se utiliza en una concentración de entre 5 a 15 mg/ml, en una serie de cuatro aplicaciones con un intervalo de 15 días entre

ellas. Si la patología recidiva, se re interviene al paciente y se inyecta nuevamente este fármaco.

Numerosos estudios han despertado un importante interés en la inyección intralesional de Cidofovir para el tratamiento de la PRR. Aunque la mayoría de estudios sobre su uso en la PRR son series de casos, los resultados son suficientemente alentadores para considerarlo como una opción de tratamiento en pacientes con PRR severa. Cidofovir es en la actualidad el tratamiento adyuvante más utilizado en niños con PRR.

La vacuna tetravalente recombinante anti-VPV contiene los tipos 6, 11, 16 y 18. El efecto previsto de esta nueva vacuna sobre la PRR causada por estos tipos es prometedor, pues el 90% de las verrugas genitales se deben a ellos.

7. Diseño metodológico.

7.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal, con el propósito de determinar la frecuencia de los genotipos del Virus de Papiloma Humano, en lesiones papilomatosas de laringe en pacientes que acuden a un Hospital de Managua, febrero 2017-enero 2018.

7.2. Universo

Total de Pacientes Diagnosticados con Papilomatosis Laríngea en el período comprendido de febrero 2017- enero del 2018.

7.3. Muestra.

La muestra está representada por 24 pacientes con diagnóstico histopatológico de papiloma escamoso, que son atendidos en un hospital de Managua.

7.4. Tipo de muestreo

No probabilístico por conveniencia, aplicando los siguientes criterios de selección.

7.4.1. Criterios de inclusión

- ✓ Pacientes con tumoraciones en la laringe, tráquea y cuerdas vocales.
- ✓ Pacientes a los cuales se envió la muestra al laboratorio de biología molecular POLISAL.

7.4.2. Criterios de exclusión

- ✓ Pacientes que asistan a la consulta fuera del periodo que abarca el estudio, febrero 2017- enero 2018.
- ✓ Muestras de pacientes que hayan llegado al laboratorio de biología molecular POLISAL, fuera del periodo de estudio, febrero 2017- enero 2018

7.5. Procedimientos de recolección de la información.

Las muestras de tejido laríngeo fueron llevadas al laboratorio por el médico tratante de los pacientes, con sus respectivos datos (código de la muestra, edad, sexo, número de cirugías).

7.6. Métodos

7.6.1. Recolección de muestras

Las muestras de tejido laríngeo fueron tomadas por el Otorrinolaringólogo del hospital, quien posteriormente transportó las muestras a través de tubos falcon con reactivos amortiguadores TWEEN/20 + TBS 1X en refrigeración, hacia el laboratorio de Biología Molecular POLISAL UNAN-Managua

7.6.2. Extracción de ADN en muestras de Tejido Laríngeo.

La extracción de ADN se realizó a partir de 25 mg aproximadamente de tejido laríngeo, mediante la utilización de *QIAamp® DNA Mini Kit*, aplicando el protocolo DNA purification from Tissue, indicados en el manual *QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*. Este protocolo se siguió en un 80%, realizando modificaciones en la cantidad de muestra a extraer y reactivos precipitantes.

7.6.3. Materiales y reactivos

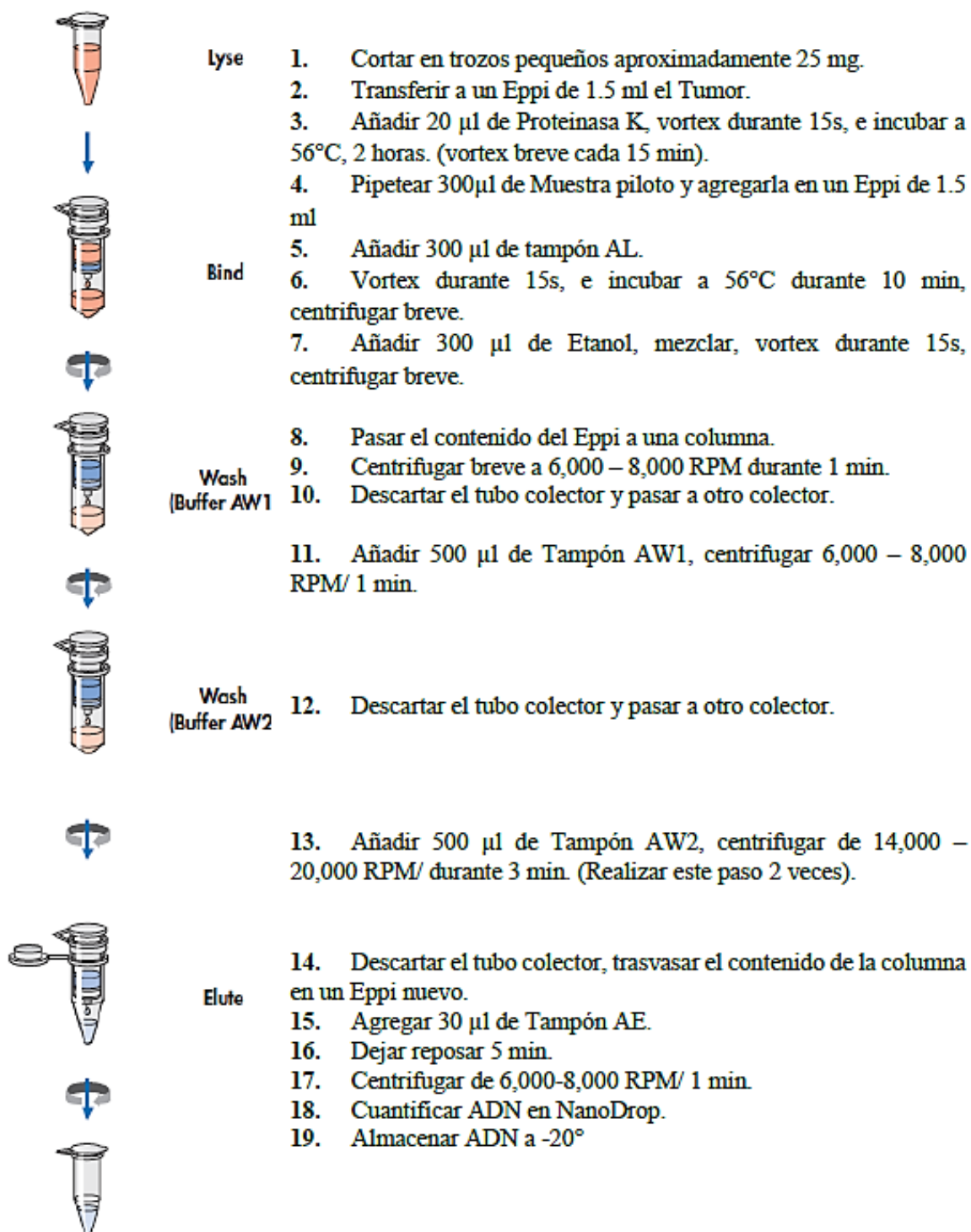
- Etanol al 100%
- PBS 1X + TWEEN20
- Tissue Protocol (QIAamp DNA Mini Kit only) (para producir ADN copia)
- Kit para PCR (Buffers, enhancer, dNTPs, Enzima-taq, H₂O) para realizar mix PCR.
- Primers específicos para la detección de genotipos HPV 6,11.
- Agarosa en polvo
- Buffer TBE al 1x
- Bromuro de etidio.
- Guantes de nitrilo
- Eppendorf de 1.5 ml nuevos y autoclaveados (exclusivos para extracción de ADN)
- Eppendorf de 0.5 ml nuevos y autoclaveados (exclusivos para preparar master mix)
- Eppendorf de 0.2 ml nuevos y autoclaveados (exclusivos para PCR)
- Micropipetas y puntas para volúmenes de 0.5 – 10 ul
- Micropipetas y puntas para volúmenes de 2 – 20 ul
- Micropipetas y puntas para volúmenes de 100 – 1000 ul
- Centrifugadora refrigerada (4°C)
- Vortex
- Termociclador para PCR.
- Cámara electroforética
- Fuente de poder para electroforesis
- Transiluminador UV.

Acciones que se deben de tomar antes de comenzar:

- ❖ Equilibrar la muestra a temperatura ambiente (15 – 25° C)
- ❖ Bloque térmico a 56° - 70° C
- ❖ Equilibrar buffer AE a temperatura de 56° C
- ❖ Asegúrese de que los Buffers AW1 Y AW2 han sido preparados correctamente.
- ❖ Si se ha formado un precipitado en el tampón ATL o el Tampón AL, disuelva incubando a 56°C.
- ❖ Todos los pasos de centrifugación de realizarse a temperatura ambiente (15- 25° C)
- ❖ Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas de las muestras almacenadas, ya que esto conduce a la reducción del tamaño de ADN.

Técnica de extracción y amplificación de ADN optimizada para la genotipificación del virus de Papiloma humano (VPH), en muestras de tejido laríngeo.

Protocolo de extracción de ADN genómico en TEJIDO QIAamp® DNA Mini Kit



7.6.1. Cuantificación de ADN.

El ADN se cuantificó y se realizó la medición de la pureza (Abs 260-280, 1.8-2.0) Mediante el uso del Espectrofotómetro NanoDrop lite Thermo Scientific.

7.7. Detección de los genotipos del virus de papiloma humano en lesiones papilomatosas de laringe mediante PCR punto final.

Tomando como referencia la estandarización del protocolo descrito por Vargas Cruz, Zuñiga Pilarte, se realizó la identificación de los genotipos VPH 6 y VPH 11. Las temperaturas y tiempos de amplificación, así la corrida electroforética fueron las mismas a las de referencia. La secuencia se tomó del artículo Genotyping of Human Papillomaviruses by a Novel One-Step Typing Method with Multiplex PCR and Clinical Applications (Morie Nishiwaki, Tomohiro Yamamoto, 2008). Siguiendo sus tiempos y temperaturas de reacción.

7.7.1. Mezcla de reacción.

- a) La identificación de los genotipos 6 y 11 de VPH se realizó mediante PCR punto final, para la reacción se utilizó:

<i>Reacción Genotipo 6</i>	<i>Reacción Genotipo 11</i>
<i>Enhancer 5X</i>	<i>Enhancer 5X</i>
<i>Buffer s 10X</i>	<i>Buffer s 10X</i>
<i>dNTPs</i>	<i>dNTPs</i>
<i>Primer 10uM; 6 Forward</i>	<i>Primer 10uM; 11 Forward</i>
<i>Primer 10uM; 6 Reverse</i>	<i>Primer 10uM; 11 Reverse</i>
<i>Dream taq DNA polimerase 5U/μl</i>	<i>Dream taq DNA polimerase 5U/μl</i>
<i>ADN [250ng/ul]</i>	<i>ADN [250ng/ul]</i>
<i>H2O</i>	<i>H2O</i>

b) La identificación de los genotipos Alto riesgo de VPH fueron detectados mediante la técnica PCR Multiplex, para la reacción se utilizó las mezclas:

Primers Mezcla (I)		Primers Mezcla (II)		Primers Mezcla (III)	
33	<i>139pb</i>	58	<i>128pb</i>	59	<i>169pb</i>
16	<i>217pb</i>	18	<i>187pb</i>	45	<i>205pb</i>
31	<i>360pb</i>	39	<i>229pb</i>	51	<i>299pb</i>
35	<i>434pb</i>	66	<i>277pb</i>	CI	<i>99pb</i>
52	<i>517pb</i>	56	<i>330pb</i>	16UF	<i>397pb</i>

Mezcla de reacción para la detección de genotipos VPH AR		
Mezcla (I)	Mezcla (II)	Mezcla (III)
<i>Enhancer 5X</i>	<i>Enhancer 5X</i>	<i>Enhancer 5X</i>
<i>Buffer S</i>	<i>Buffer S</i>	<i>Buffer S</i>
<i>dNTPs</i>	<i>dNTPs</i>	<i>dNTPs</i>
<i>Enzima Taq</i>	<i>Enzima Taq</i>	<i>Enzima Taq</i>
<i>Primer mix* (1)</i>	<i>Primer mix* (2)</i>	<i>Primer mix* (3)</i>
<i>ADN (250 ng/μl)</i>	<i>ADN (250 ng/μl)</i>	<i>ADN (250 ng/μl)</i>
<i>H₂O</i>	<i>H₂O</i>	<i>H₂O</i>

*Para secuencias de Oligonucleótidos. (Ver anexo tabla 9)

7.8. Amplificación mediante PCR punto final.

Para la amplificación del material genético se utilizó el programa: Desnaturalización inicial 95°C / 5', seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C / 30'', hibridación a 70 °C / 1'30'', Elongación a 72 °C / 1', El último ciclo se llevó a cabo con una extensión final a 72°C / 2'.

7.9. Electroforesis en gel de agarosa post PCR.

Se realizó la comprobación de material genético mediante la técnica de electroforesis en gel Agarosa. Se preparó una concentración de gel agarosa al 1.5%, donde se utilizó 2 µl de Loading Green con 8 µl de producto PCR, 3 µl del marcador molecular (Ladder). Los productos fueron teñidos con Bromuro de etidio utilizando 3 µl, con un tiempo de 1 hora a 120 voltios que dicha corrida sería observada a través de un transiluminador en luz UV, observando las líneas de los productos.

7.10. Plan de tabulación y análisis.

Para la edición de este trabajo se utilizaron el Software Microsoft Office Word. La información se organizó en una base de datos con asistencia del Software Microsoft Excel. En continuación se diseñará la presentación de la defensa con el programa Microsoft Office PowerPoint.

7.11. Ética de la información.

El médico tratante de los pacientes del hospital comunicó previo a la realización del estudio sobre el objetivo de la investigación. Las muestras fueron tomadas por el otorrinolaringólogo del hospital quien las transportó al laboratorio de Biología Molecular POLISAL UNAN-Managua, los autores de este estudio no tuvieron contacto alguno con los pacientes. Una vez obtenido los resultados, estos fueron extendidos únicamente al médico tratante. Toda la información como los datos generales y resultados del análisis molecular de los pacientes son estrictamente confidenciales. No se divulgará ningún dato o información que pudiera exponer la identidad de los pacientes.

7.11.1. Los beneficios para estos pacientes son:

- El resultado proporcionado al médico tratante le permitirá conocer la cantidad de genotipos de alto riesgo o genotipos de bajo riesgo, monitorear la recurrencia de la enfermedad, establecer el pronóstico en la evolución de la papilomatosis.
- Al médico, conocer la frecuencia de los genotipos en los pacientes, valorar el uso de tratamientos que puedan disminuir la recurrencia quirúrgica.

- A todos los pacientes se les realizó la detección de los genotipos de bajo y alto riesgo sin costo alguno.
- Con estos datos se puede retomar un segundo estudio para la investigación de una posible vacuna.

7.12. Limitantes del estudio.

- Una de las limitantes de este estudio fue el número de muestras analizadas, se recibieron 24 muestras de tejido laríngeo en el periodo del estudio, por lo cual se necesitaba una muestra más grande para lograr obtener con un mayor nivel de confianza y precisión a lo que corresponde la frecuencia de genotipos, diferencias según sexo y según las distribuciones de edad, cabe destacar que con este tamaño limitado de muestras no se pudo establecer relación estadística con respecto a genotipo con el número de cirugías.
- Solo se realizó la detección de 15 genotipos de VPH. La amplia gama de genotipos que existen de VPH ya sea de bajo o alto riesgo no lograron ser incluidas en el estudio, debido a que nos basamos en los genotipos ya detectados en la región anatómica de la laringe según la literatura descrita y investigaciones, eso nos redujo la posibilidad de encontrar otros genotipos además de los ya causantes de la PRR, el no haber identificado estos tipos de VPH nos excluye la posibilidad de detectar más de estos genotipos en esta región, diciendo de esta forma que los genes 6 y 11 son los causantes de la PRR, pero podrían existir otros genes asociados.
- El estudio de análisis mediante biología molecular demuestra que tiene un impacto significativo sobre la sensibilidad y reproducibilidad, incluye, extracción, amplificación y detección del ADN, por todo lo anterior descrito además de las ventajas que influyen en realizar detección de genotipos de VPH mediante biología molecular, también incurren en gastos debido a que se necesitan obtener resultados de calidad y para esto se necesita materiales, reactivos y un área perfectamente equipada para el manejo de muestras altamente infecciosa como lo es el papiloma virus, además de costos elevados en la utilización de enzimas, primers, kits de extracción de ADN...Etc.

8. Operacionalización de las variables

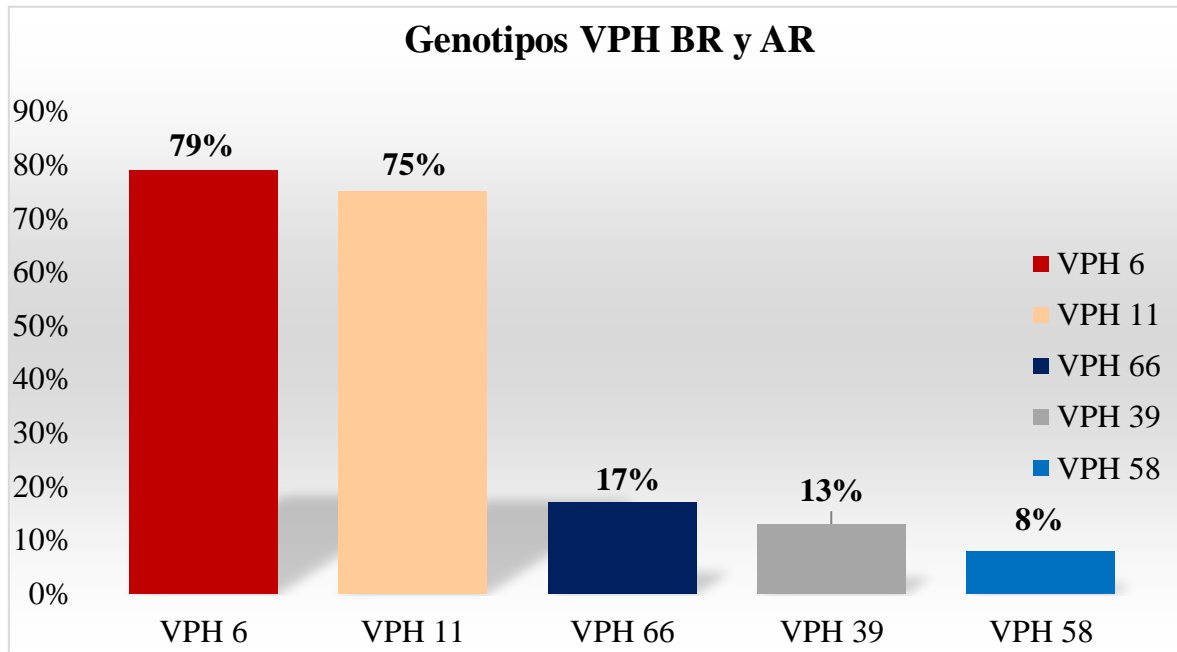
Variable	Sub variables	Criterios	Indicador	Valor
Determinación de Genotipos a través de PCR	Presencia de ADN	Detección a partir de control albumina	Banda Alb: 350 pb	Si - No
	Concentración de ADN	El aumento y disminución de ADN puede formar bandas muy marcadas, delgadas o ausencia.	250ng/μl	Si - No
	Presencia de genotipos 6 y 11.	Detección a partir de primers y ADN.	Banda 6: 263 pb 11: 472 pb	Si - No
	Concentración de primers	Puede aumentar la formación de dímeros de primer	10pM	Si - No

Genotipos	Tipo de VPH que presenta el paciente	La presencia de un genotipo indica infección leve.	6 11 6 y 11	Positivo
		La presencia de dos o más genotipos indica infección y posible malignización.	Alto Riesgo	Negativo
	Coinfección	La presencia de un genotipo indica infección leve.	6 y 11	Positivo
		La presencia de dos o más genotipos indica infección y posible malignización.	6 y 11 con Alto Riesgo	Negativo

Edad	Grupos etarios	Papilomatosis laríngea juvenil Papilomatosis laríngea del Adulto	0 – 10 11 – 21 22 – 32 33 – 43 44 – 54 55 – 65	Si__ No__
Sexo	Femenino Masculino	Presencia de genotipos según el sexo	6 11 6 y 11 Alto Riesgo	Positivo Negativo
Papilomatosis laríngea recurrente.	Recurrencia a intervenciones quirúrgicas	Crecimiento y diseminación del tumor en menor tiempo después de la papilomectomía Apariencia del tumor en un tiempo prolongada.	<10 11 – 20 21 – 30 31 – 40 41 – 50 >50	Positivo Negativo

9. Análisis y discusión de resultados

Gráfico n°1. Genotipos del Virus del Papiloma Humano (VPH) de bajo y alto riesgo detectados mediante PCR punto final, en pacientes con papilomatosis laríngea en un Hospital de Managua en el periodo febrero 2017, enero 2018.



Fuente: Tabla n° 1

El gráfico 1 representa los genotipos de VPH detectados mediante PCR punto final, en pacientes con papilomatosis laríngea. El 100% de estos pacientes mostraron la presencia de al menos uno de los 15 genotipos de VPH investigados. Se obtuvieron los siguientes resultados para genotipos de bajo riesgo (BR), donde predominó VPH 6 en un 79% de los casos correspondiente a 19 pacientes, VPH 11 con un 75% de positivos correspondiente a 18 pacientes, además se encontraron genotipos de alto riesgo (AR) con un 17% positivos para VPH 66 correspondiente a 4 pacientes, 13% positivos para VPH 39 correspondiente a 3 pacientes y VPH 58 en un 8% (2/24) de los pacientes.

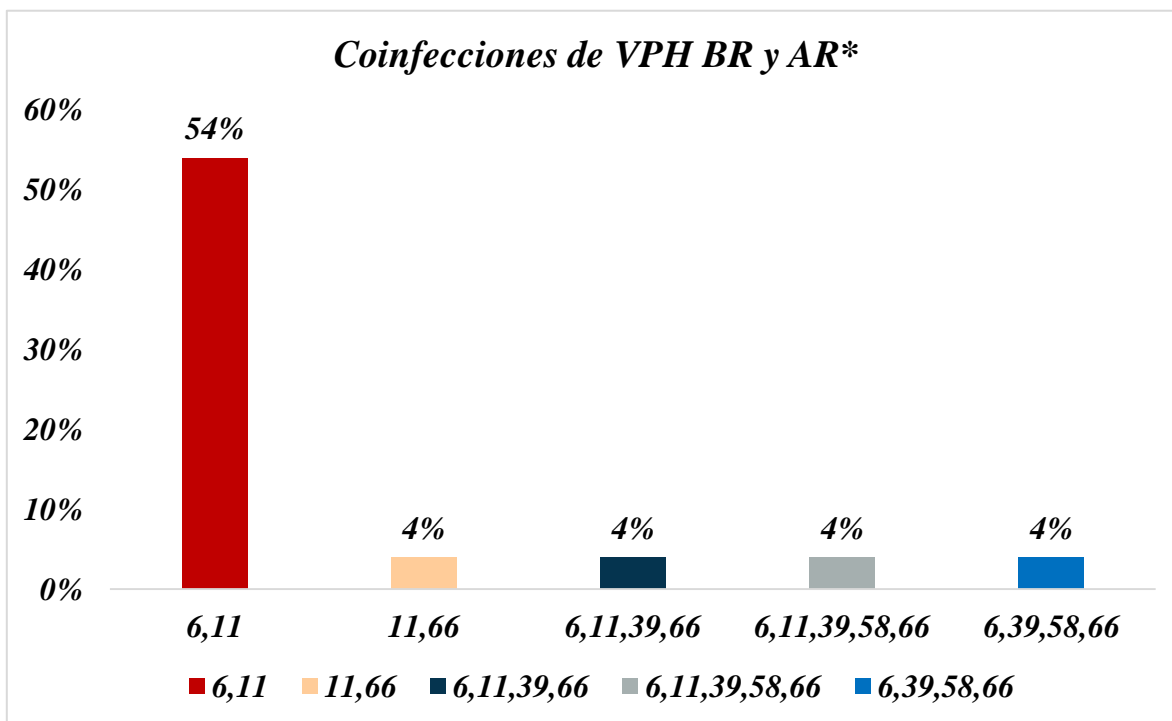
La presencia de los genotipos 6 y 11 sugieren ser los causantes de la papilomatosis laríngea según nuestros resultados, además de la presencia de los genotipos de Alto riesgo 39, 58, 66. Un estudio que se asemeja al nuestro, fue realizado por el Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Bulgaria de Bulgaria, identificaron el VPH-DNA en pacientes

juveniles con Papilomatosis Respiratoria Recurrente. Se estudiaron 23 pacientes y sus resultados revelaron que predominó el VPH-11 en un 61.9% de los casos y VPH-6 en el 23.8%. Doble Positividad de VPH6 y VPH11 se encontró en el 14.3% de los casos. Sus conclusiones son que la Papilomatosis Laríngea Recurrente es mucho más agresiva con el VPH-11 en las infecciones del tracto respiratorio superior. (Draganov & Todorov, 2005)

Un estudio realizado por Jeong WJ en el año 2009 no solo describe al genotipo VPH 11 como el más frecuente con el cambio maligno, ellos encontraron la presencia de VPH 6 en displasia y carcinoma de Papilomatosis respiratoria recurrente. El VPH tipo 6 estuvo presente en todas las muestras que dieron positivo. Sus conclusiones son que el VPH tipo 6 también puede contribuir a desempeñar un papel igualmente importante en la carcinogénesis de la PRR. (Jeong WJ, 2009).

Se realizó la detección de los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 59, considerados como alto riesgo de forma tal que estos no estuvieron presentes en ningunos de los pacientes. La papilomatosis laríngea es la lesión tumoral benigna de laringe más frecuente de la infancia, producida principalmente por los genotipos 6 y 11, la infección por genotipos de alto riesgo se considera poco frecuente. (Karagas & Waterboer, 2010)

Gráfico n° 2. Coinfecciones de los genotipos de VPH de alto y bajo riesgo identificadas en un Hospital de Managua en el periodo febrero 2017, enero 2018.



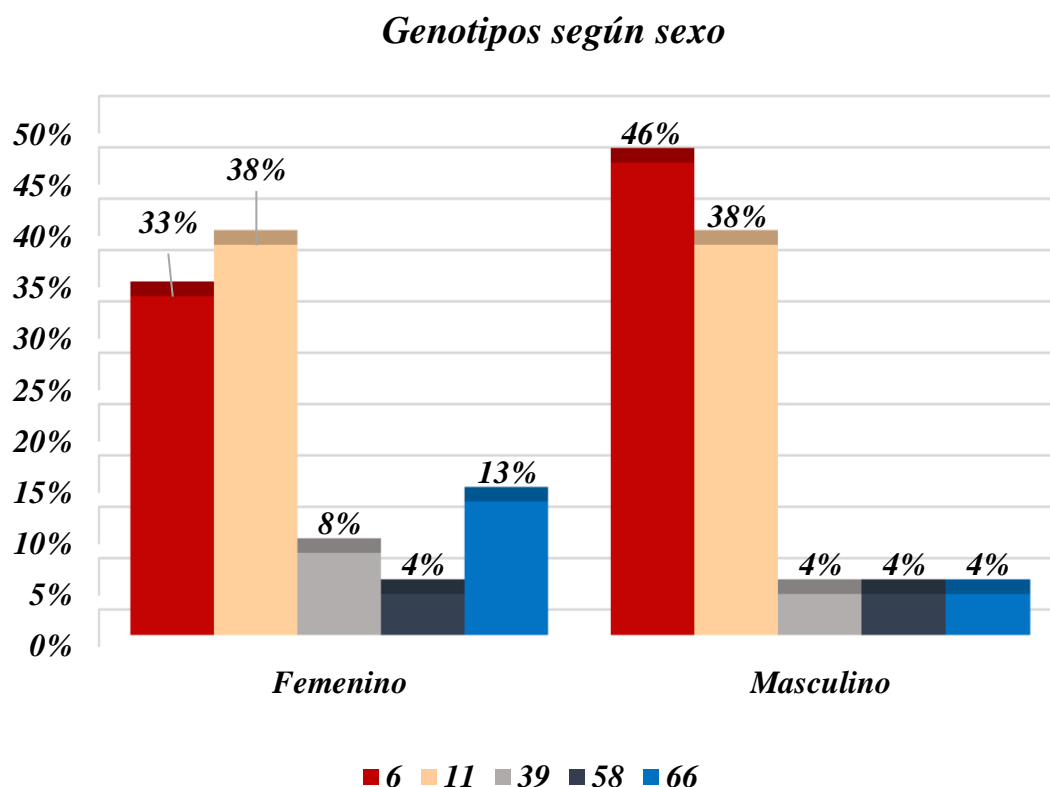
Fuente: Tabla n° 2

El gráfico 2 representa las coinfecciones presentes en los pacientes en estudio, una coinfección es cuando hay dos o más genotipos presentes. La doble infección con VPH 6/11 estuvo presente en el 54% de los casos. Las coinfecciones con VPH 11/66, VPH 6,11,39,66, VPH 6,11,39,58,66, VPH 6,39,58,66 fueron detectados en un 4% para cada uno respectivamente.

En este estudio, la doble positividad con VPH 6 y 11 se encontró con mayor frecuencia, coincidiendo con un estudio realizado en Caracas para detectar los tipos de VPH en 15 pacientes, entre 3 y 20 años de edad con diagnóstico de Papilomatosis Laríngea Juvenil en donde encontraron que en el 53% de los casos, se identificaron los genotipos de VPH 6 y VPH 11 (Bello de Alford, M, 2011)

En un estudio realizado en Noruega donde investigaron sobre Papilomatosis Respiratoria Recurrente en 207 pacientes, todos los pacientes fueron positivo para BR (HPV 6 u 11), que comprende VPH 6 en 64%, VPH 11 en 19% de los casos y VPH 6/11 en 7% de los casos. Coinfección con VPH de alto riesgo junto con VPH 6 o HPV 11 estuvo presente en el 10% de los pacientes (Omland et al, 2014). Este estudio se asemeja al nuestro, con relación a las coinfecciones de alto y bajo riesgo.

Gráfico n°3. Frecuencia de los genotipos de VPH en pacientes con papilomatosis laríngea, según sexo dado en un Hospital de Managua en el periodo febrero 2017, enero 2018.



Fuente: Tabla n°3,4

Este gráfico muestra los genotipos detectados según el sexo de los pacientes, obteniendo que el genotipo 6 predominó en los pacientes masculinos con 46% (n=11) en cambio en las pacientes femeninas con un 33% (n=8). El genotipo 11 estuvo presente con un 38% en ambos sexos. El genotipo 66 se presentó en un 13% en mujeres y un 4% para los varones. El genotipo 39 fue detectado en un 8% en el sexo femenino y en un 4% en el masculino. El genotipo 58 se presentó en igual porcentaje (4%) en ambos sexos.

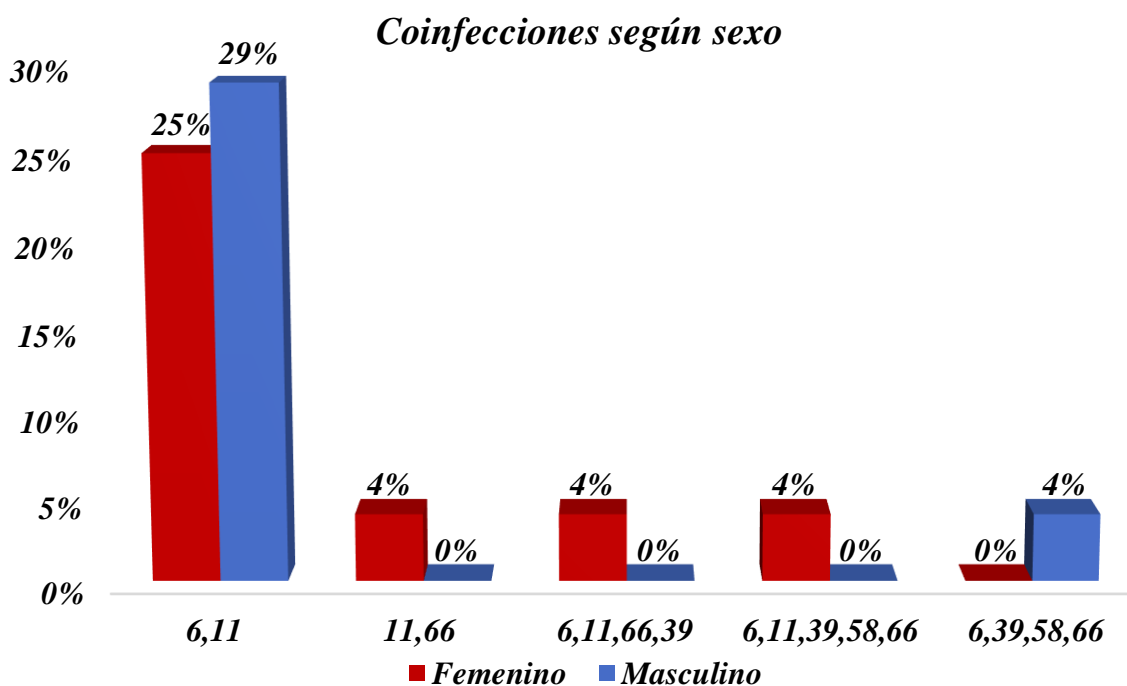
Estos resultados nos muestran que la infección por VPH afecta a ambos sexos. El VPH 6 se presentó con mayor frecuencia en varones, sin embargo, los genotipos VPH-AR 39 y 66 se encontraron en mayor frecuencia en mujeres. Un estudio realizado en Venezuela en el servicio de otorrinolaringología del Hospital J. M de los Ríos donde se evaluaron 120 casos

de papilomatosis laríngea juvenil, predominó el sexo masculino (61,1 %). (Castillo & González, 2013).

Otro estudio donde logramos encontrar la relación con la presencia de los genotipos de VPH con el sexo fue un estudio en España en el año 2010. Sus resultados demostraron que es más prevalente en el sexo masculino en un 65.5% de casos, con leve predominio de única localización laríngea frente a multilocalización de lesiones. Se detectó DNA vírico del Virus del Papiloma Humano en el 75.8% de los casos, predominaron los subgrupos 6 y 11. Presentaron recidiva el 44.8% de los casos, con una media de recidiva de 2-3 episodios por paciente. Presentó malignización un caso. (Castillo, 2010)

Se necesita continuar estudiando la relación entre el sexo y los genotipos de VPH en un mayor número de muestras.

Grafico n° 4. Coinfecciones en pacientes con Papilomatosis laríngea según sexo dado en un Hospital de Managua en el periodo febrero 2017, enero 2018.

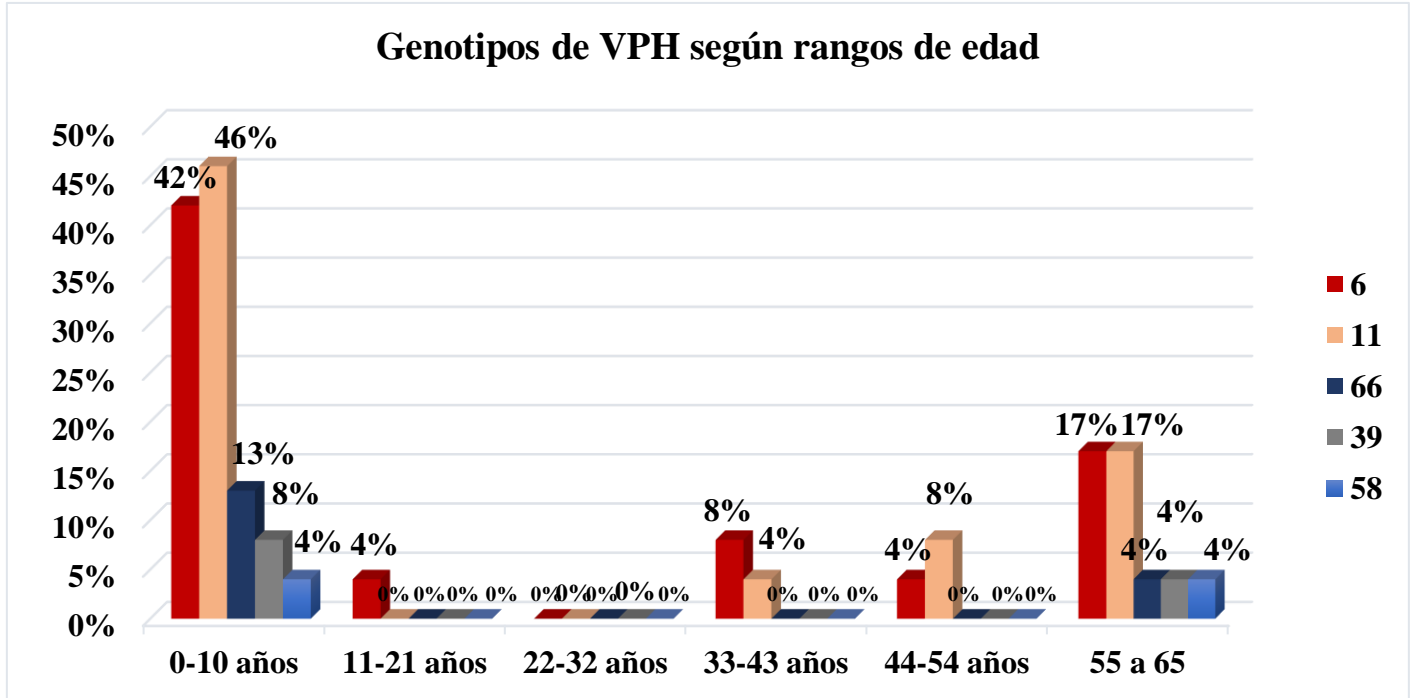


Fuente: Tabla n° 5

El gráfico 4 representa las coinfecciones según el sexo de los pacientes, con respecto a la coinfección con genotipos de bajo riesgo VPH6/11 se encontró con mayor predominio en el sexo masculino con un 29% seguido del sexo femenino con un 25%. Las coinfecciones VPH 11/66, VPH 6/11/66/39 y VPH 6/11/39/58/66 estuvieron presentes con 4% para el sexo femenino, la coinfección VPH 6/39/58/66 se presentó con un 4% en el sexo masculino.

En una revisión realizada por Craig Derkay en E.E.U.U. sobre papilomatosis laríngea sugiere que la forma juvenil de esta afecta a hombres y mujeres en igual número, y la forma adulta afecta a los varones un poco más a menudo que a las mujeres esto se asimila a nuestros resultados, ya que la coinfección por VPH 6/11 afectó más a los varones. (Craig Derkay, 2016)

Gráfico 5. Frecuencia de los genotipos de VPH en pacientes con papilomatosis laríngea según rangos de edad, dado en un Hospital de Managua en el periodo febrero 2017, enero 2018.



Fuente: Tabla n° 6

El gráfico 5 nos muestra la frecuencia de genotipos detectados según la edad de pacientes. En el rango 0-10 años se detectó una mayor frecuencia de genotipos VPH 11, 6, 66 y 39. El VPH 11 se detectó en el 46% seguido del VPH 6 con un 42%, VPH 66 con un 13%, y VPH 39 con un 8%. El segundo grupo que obtuvo más frecuencia fue entre las edades de 55-65 años el genotipo 6 y 11 estuvieron presentes en un 17% para cada uno, VPH 66, VPH 39 y VPH 58 en un 4% de los casos para cada uno respectivamente. En las edades de 33-43 años el VPH 6 se encontró en un 8% y el VPH 11 en un 4%. En el grupo de 44-55 años el genotipo 6 estuvo presente en un 4% y genotipo 11 en un 8%, en las edades de 11-21 se detectó solo VPH 6 con un 4%.

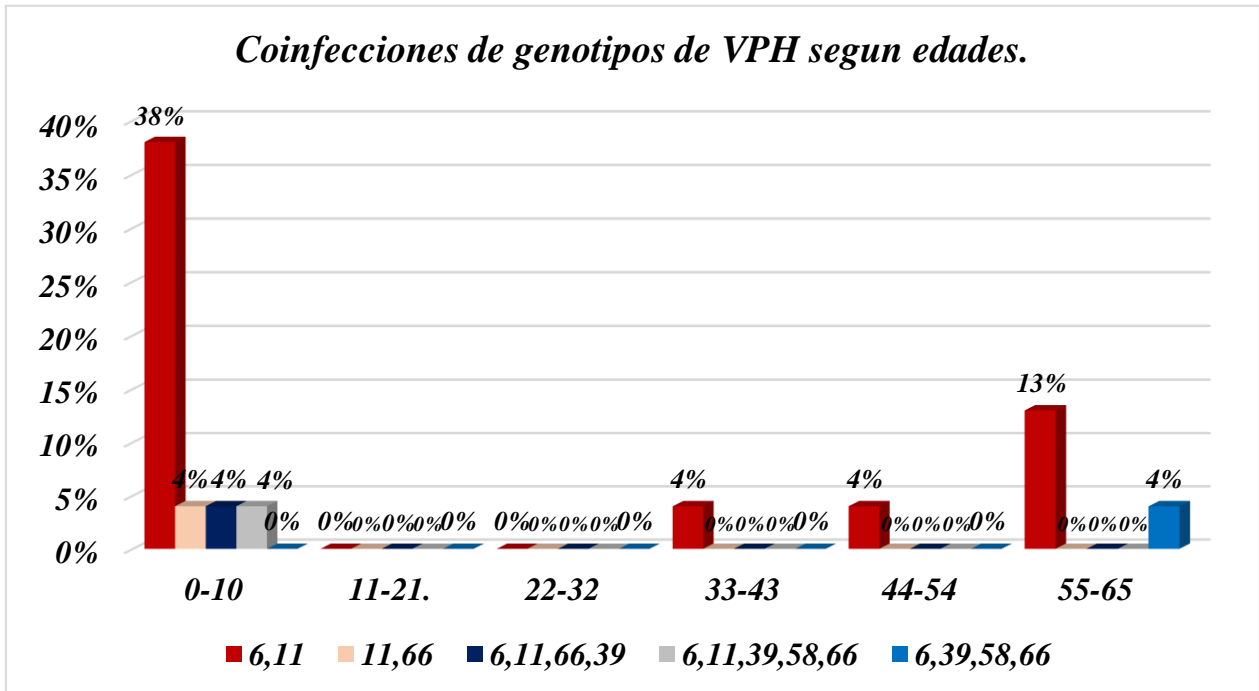
La distribución por edad resultó ser de carácter bimodal entre las edades juveniles y adultos. Estos resultados nos muestran que las edades más afectadas fueron las de 0 – 10 años, asemeándose a un estudio realizado en Zimbabwe sobre VPH el cual observaron casos de PRR de inicio juvenil durante el período de dos años y el 64% de los pacientes fueron

positivos al VPH. Los tipos 6 y 11 de HPV fueron los tipos dominantes que constituyen el 85% de todos los tipos de HPV.

Por otra parte la sociedad holandesa determinó la distribución de las edades de PRR lo que resulto ser de carácter trimodal, siendo la edad adulta y tercera edad los de mayor significado que podría estar relacionados con factores de riesgo e inmunidad. (Matinhira & Soko, 2019) (Colbs, 2012)

En un estudio para determinar la distribución de edad en la Papilomatosis Respiratoria Recurrente en 12 Hospitales Europeos publicado en el año 2012. Se incluyeron 639 pacientes. La Distribución por edad resulto ser de carácter trimodal con una distribución entre las edades medias de 7 años, 35 años y 64 años. (Colbs, 2012) Sus resultados reflejan tres picos de edad, que son: pediátrico, edad adulta y un pico en la tercera edad (64 años). Este estudio se relaciona con el nuestro ya que las distribuciones de edades fueron similares y podemos decir que la papilomatosis laríngea afectó tanto a niños como a adultos.

Gráfico 6. Coinfecciones los genotipos de VPH en pacientes con papilomatosis laríngea, según rangos de edad atendidos en un Hospital de Managua en el periodo febrero 2017, enero 2018.



Fuente tabla n° 7

En este gráfico se logra apreciar las coinfecciones según rangos de edad, se presentó una mayor frecuencia de doble positividad con VPH 6/11 en pacientes entre las edades de 0-10 años con un 38%, seguido por pacientes entre 55-65 años con 13% y en un 4% entre las edades de 33-54 años. Para las coinfecciones VPH 11/66, VPH 6/11/66/39 y VPH 6/11/39/58/66 se obtuvo una frecuencia del 4% para cada una entre las edades de 0-10 años. La coinfección VPH 6/39/58/66 se presentó en un 4% en pacientes con edades entre 55-65 años.

Los resultados obtenidos muestran que las edades más afectadas por la coinfección con VPH 6/11 son las de 0 – 10 años con un 38% y afecta también a las de 55 – 65 años con menor frecuencia, un estudio realizado en Caracas en 15 pacientes con diagnóstico de Papilomatosis Laríngea Juvenil para detectar los tipos de VPH, encontraron que en el 53% de los casos, se identificaron los serotipos de VPH 6 y VPH 11, predominando en los niños en la primera década de la vida, coincidiendo con nuestro estudio en el caso de las edades de 0 – 10 años.

Gráfico n°7. Frecuencia de los genotipos de VPH según intervenciones quirúrgicas en pacientes diagnosticados con Papilomatosis laríngea.

Genotipo	Pacientes	Promedio de cirugías en 1 año	Probabilidad (p)
6	79%	2	0.008
11	75%	3	0.13
<i>Coinfección 6/11</i>	54%	4	0.17
<i>Coinfección BR/AR*</i>	16%	5	0.21

* Coinfección Bajo riesgo/ Alto riesgo

Fuente: Tabla n° 6

En este gráfico se muestran el promedio de cirugías al año con respecto a la presencia de los genotipos. Se calculó el promedio de cirugías por año, en donde se obtuvieron los siguientes datos: un promedio de 2 cirugías al año en pacientes infectados con VPH 6 con una probabilidad de 0.008, los pacientes con VPH 11 presentaron un promedio de 3 intervenciones quirúrgicas en un año con una probabilidad de 0.13, en pacientes con coinfección VPH 6/11 se observó un promedio 4 visitas al quirófano al año con una probabilidad de 0.17, y los pacientes con coinfección bajo/alto riesgo mostraron un promedio de 5 cirugías al año con una probabilidad de 0.21.

Rabah et al. Encontró que la infección por VPH-11 confiere un curso más agresivo al RRP que el VPH-6. Los pacientes con VPH-11 se diagnostican a una edad más temprana (3 vs 2 años), son más propensos a tener una enfermedad activa y requieren más procedimientos quirúrgicos. Esto se relaciona con nuestros hallazgos, debido a que el VPH11 presenta un promedio mayor con respecto al número de cirugía en comparación al VPH 6. (Rabah, 2001)

La agresividad de la enfermedad se puede medir por la descripción proporcionada por Doyle. Éste sugiere que la gravedad de la enfermedad se puede medir por un requisito de más de un total de diez operaciones quirúrgicas, por más de tres procedimientos en un año y también por la progresión de los papilomas más allá de la región subglótica. En nuestro estudio todos los pacientes tenían papilomas laríngeos. Sin embargo, las coinfecciones 6/11 presentan un promedio de 4 cirugías al año y las coinfecciones bajo/alto riesgo muestran un promedio 5 cirugías al año. Las infecciones por 2 o más genotipos presentaron una probabilidad más alta con respecto al número de intervenciones quirúrgicas en comparación a las que poseen un solo genotipo. Esto sugiere que con una coinfección de bajo y alto riesgo se espera un mayor número de visitas al quirófano al año..

10. Conclusiones

1. Todas las muestras resultaron positivas para alguno de los genotipos 6, 11 de bajo riesgo (BR), en el 21% de estas, además se detectaron genotipos de alto riesgo (AR) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66. En relación a la frecuencia de los genotipos VPH-BR se obtuvo VPH 6 en el 79% de los casos, VPH 11 con un 75%. En cuanto a la frecuencia de VPH-AR se encontró 17% de positividad para VPH 66, 13% para VPH 39 y 8% correspondiente a VPH 58. Los genotipos 6 y 11 son causantes de la papilomatosis laríngea, debido a que estuvieron presentes en el 100% de las muestras en estudios, la localización, recurrencia del tumor y afección a nivel de la laringe.
2. Se detectaron coinfecciones con VPH 6/11 en el 54% de los casos. Las coinfecciones con VPH 11/66, VPH 6,11,39,66, VPH 6,11,39,58,66, VPH 6,39,58,66 fueron detectados en un 4% para cada uno respectivamente. Es necesario realizar más estudios con una mayor muestra de pacientes donde se analice la relación entre las coinfecciones con VPH y la papilomatosis.
3. Los rangos de edades afectados fueron de 0-10 años (46% con VPH 11) y de 55-65 años (17% con VPH6/11). En el rango 0-10 años se detectó una mayor frecuencia de genotipos VPH 11, 6, 66 y 39 así como de doble positividad con VPH 6/11 con un 38%. La infección por VPH afectó a ambos sexos, inclinándose un poco más al sexo masculino, una frecuencia similar en cuanto a coinfección por VPH 6/11 para ambos sexos, las coinfecciones de alto riesgo estuvieron presentes en menor frecuencia.
4. En relación entre la presencia de uno o más genotipos con el número de intervenciones quirúrgicas, los resultados sugieren que los pacientes con coinfección por VPH-AR/BR se espera tengan un mayor número de visitas al quirófano con una media de 5 intervenciones al año y los pacientes con VPH 11 se estima presenten una media de 3 intervenciones quirúrgicas en un año.

11. Recomendaciones

- 1) **Al Ministerio de Salud en conjunto con los Hospitales de Managua;** promover la detección de genotipos virales de bajo riesgo y alto riesgo de VPH mediante la técnica PCR como un método que permita brindar resultados confirmativos, específicos y en menor tiempo que permita evaluar la progresión de la enfermedad.
- 2) **A la UNAN Managua;** promover investigaciones científicas dentro del análisis molecular para la detección del resto de los genotipos del Virus de Papiloma Humano en laringe con un mayor número de muestras con el fin de mejorar la significancia de la presencia de este virus.
- 3) **A los estudiantes de la Licenciatura en Bioanálisis Clínico;** realizar estudios acerca de la genotipificación del Virus de Papiloma Humano en Laringe, esto permitirá establecer el pronóstico en la evolución de la papilomatosis, monitorear la respuesta a los tratamientos antivirales específicos, indicar la necesidad de una vacunación y desde el punto de vista epidemiológico la implementación de medidas de prevención en la salud pública.

12. Bibliografía

- Aburto, A. Y. (2014). *Ventajas de la papilomectomía asistida con endoscopia de 0 grados en relación a papilomectomía convencional*. Servicio de Otorrinolaringología, Managua, Nicaragua.
- Alarcon L, A. J. (2013). Papilomatosis laríngea recurrente con transformación a carcinoma pulmonar. *Cirug parag.*, 27-29.
- Bar, A.V. & Chalian, A. (2008). *Management of clinically negative neck for the patients with head neck squamous cell carcinomas in the modern era*. *Oral Oncol.*, 44(9).
- Benuto. (2009). *Virus oncogenes: el paradigma del virus del papiloma humano*. Mexico: *Dermatol Rev Mex*; 53: 234-242.
- Betancourt, M. L. (2004). *Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano*. *Rev Oncol.* 6(5): 263-17.
- Bello de Alford, M, Caibe R, G. (2001) *Tipificación del Virus del Papiloma Humano en Papilomatosis Laríngea Recurrente Juvenil*. *Revista de la Facultad de Medicina*
- Bologna, C. M. (2006). *Virus del papiloma humano y su asociación con cáncer bucal*. Mexico: *Rev. Med. Inst Mex Seguro soc*, 147-153.
- Bosh, F. (2003). *Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality*. *Natl Cancer Inst Monogr*.
- Brooks, k. C. (2010). *Microbiología médica*. Mexico: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.
- Carballal, G. J. (2014). *Virología Médica*. Argentina: Corpus.
- Castellsagué. (2008). *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer*. *Gynecol Oncol*.
- Castillo, H., & Caro, V. (2015). Papilomatosis laríngea juvenil y su relación con la infección genital por virus de papiloma humano durante el embarazo. *Revi Obst Ginecol*, 260-268.
- Castillo G Carmen, et al cols. (2010) *Papiloma y papilomatosis laríngea. Tratamiento con láseres CO2*. *Servicio de Otorrinolaringología, Hospital General Universitario*, Alicante, España.
- Castro, J. M., & Vera, C. ., (2006). *Epidemiología del cáncer de cuello uterino*. Colombia: *Rev Colom ObstetGinecol*, Scielo.
- Clifford, G., Smith, J., & M., P. (2003). *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide a meta-analysis*. *Br J Cancer*.

- Companies, Q. (2012). *Qiagen*. Obtenido de www.qiagen.com
- Concha, R. (2007). Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Chil infect*, 209-214.
- Craig Derkay Review Eastern Virginia Medical School Papilomatosis respiratoria recurrente, (2016) <http://rarediseases.org/rare-diseases/recurrent-respiratory-papillomatosis/>
- Dekelboun, A. (1965). *Papillomas of the Latynx*. San Francisco California 94122: Arch Otolaryng-Vol 81.
- D.J. Doyle, G.J. Gianoli, T. Espinola, R.H. Miller. (1994). *Recurrent respiratory papillomatosis: juvenile versus adult forms Laryngoscope*, pp. 523-527
- Dragonov S, P., Torodov, I. (2005). *Identification of HPV DNA in patientes with juvenile- onset recurrent respiratory papillomatosis*. National Center of Infectious and Parasitic Disease. Sofia, Bulgaria
- D' Souza, G.; Baan, R.; Straif. (2007). *Carcinogenecity of human papillomaviruses. Lancet Oncol.*, 6(4): 204.
- Eva Mas, J. (2001). Fundamento de la Reaccion en Cadena de la Polimerasa. *AquaTIC*, 10-15.
- Fuentes, G. F. (2000). *Virus de papiloma humano y cancer cutaneo no melanoma*.
- Gallegos, J. F. (2005). *Epidemiologia, prevencion y diagnostico oportuno del cancer de vias aero-digestivas superiores (VADS)*. *Acta medica*, 3(4) 247-52.
- Garcia, C. (2004). *VPH y los carcinomas de cavidad bucal y bucofaringe*. *Cancerol*.
- Geo, B. K. (2010). *Microbiología Médica (25° Edición ed.)*. Mexico: MC GRAW HILL.
- Gonzalez, G., Hernandez, G. (2008). *Factores asociados al virus del papiloma humano*. Area V. Cien fuegos. Medisur.
- Guerra, T. (2001). *Infeccion por el virus de papiloma humano*. *Prog Obstet Ginecol*.
- Guerra, T., & Gonzalez, G. (2002). La infeccion por virus del papiloma humano en los niños. *Ped Rur ext.*, 296.
- Herrera E, A. J., & Torres, K. (2013). Tipificacion del virus del papiloma humano en lesiones del epitelio respiratorio. *An Orl Mex*, 207-210.
- Hobbs, S. J. (2008). *Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Clin Otolaryngol*.
- Jeong WJ, Park SW, Shin M, et al. (2009). *Presencia de HPV tipo 6 en displasia y carcinoma por papilomatosis respiratoria recurrente*.31: 1095–1101.

- Jung, A., & Briolat, J. (2009). *Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus infection in oropharynx squamous cell carcinoma*. Int J Cancer.
- Karagas, M., & Waterboer, T. (2010). Genus beta human papillomaviruses and incidence of basal cell and squamous cell carcinomas of skin: Population bases case-control study. *BMJ*, 341.
- Leonardo, A. (2011). *Indice del virus de papiloma humano en la cavidad bucal en las escuelas de guayaquil*. Mexico.
- Lewin, F.; Norell, S. E.; Johansson, H. (1998). *Smoking tobacco, oral snuff and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population-based case- referent study in sweden*. *Cancer*, 82 (7):1367-75.
- Matinhira, N., Soko, N. (2019). *Tipos de virus de pailoma humano que causan papilomatosis respiratoria recurrente en Zimbabwe*. El sevier,
- Mehana H, Paleri V, West MC, Nutting C. (2010). *Cancer de cabeza y cuello*. *BMJ*; 341: c4684.
- McKenna, M., & Brodsky, L. (2005). Extraesophageal acid reflux and Recurrent Respiratory Papilloma in children. *International Journal of pediatric Otorhinolaryngology*, 597-605.
- Omland, Kathrine A. Lie, Harriet Akre, et al. (2014). Recurrent Respiratory Papillomatosis: HPV Genotypes and Risk of High-Grade Laryngeal, P1.
- Peñaloza, M., Montoya, H., Flores, S. (2000). *Molecular idenrification of Human Papillomavirus Types in Recurrent Respiratory Papillomatosis*, Arch Otorinol Head and Neck surg.126.
- Perla, C., Maria, V., & Graciela., Z. (2015). *Presence of Human Papillomavirus in Oral Cavity: Review and Update of Literature*. Mexico: Scielo.
- Rabah R, Lancaster WD, Thomas R, et al. (2001). *La papilomatosis respiratoria recurrente asociada al papilomavirus humano 11 es más agresiva que la enfermedad asociada al papilomavirus humano 6*. *Pediatr Dev Pathol.*; 4 : 68–72.
- San Guiorgi, M,R and Colbs. (2005). *Age of onset of recurrent respiratory papillomatosis: a distribution analysis*. British Association of OtolaryngologistNederlandse Vereniging voor Keel-Neus
- Sanchez Gloria Msc,PHD and Colbs. (2011), *Human Papillomavirus genotype detection in recurrent respiratory Papillomatosis in Colombia*. Infections and Cancer Group, School of Medicine ,University of Antioquia,Colombia.

Serena-Gomez, E; Bologna-Molina. (2011). *Prevalencia del VPH en el proceso de malignización de lesiones de vías aerodigestivas superiores*. Int. J. Odontostomat.

Schiffman MP, C. P. (2010). *Human papillomavirus and cervical cancer*. The Lancet.

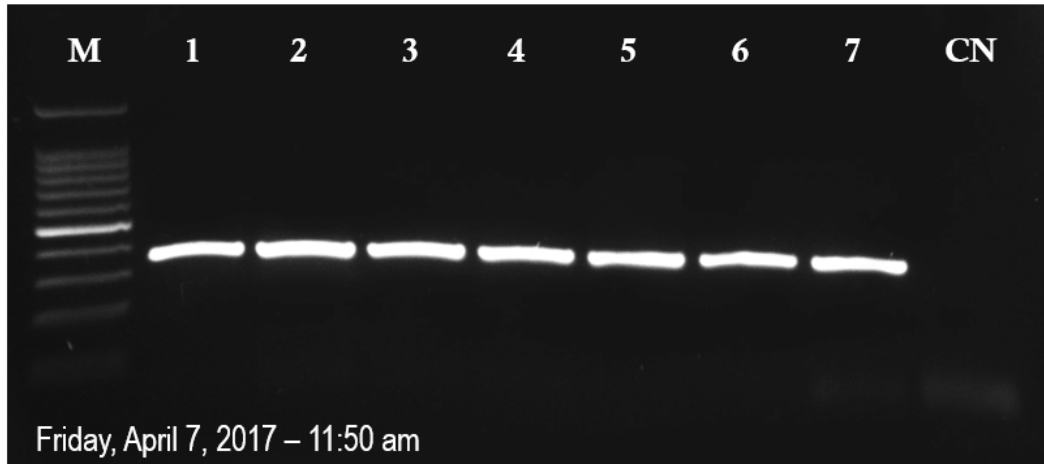
Schraff, S., Derkay, C., & Burke, B. (2004). Experience with recurrent respiratory papillomatosis and the use of adjuvant therapy. *Arch Otolaryngol head neck surg*.

Stamataki, N. T. (2007). *Juvenile Recurrent Respiratory Papillomatosis: Still a Mystery Disease With Difficult Management*. HEAD & NECK.

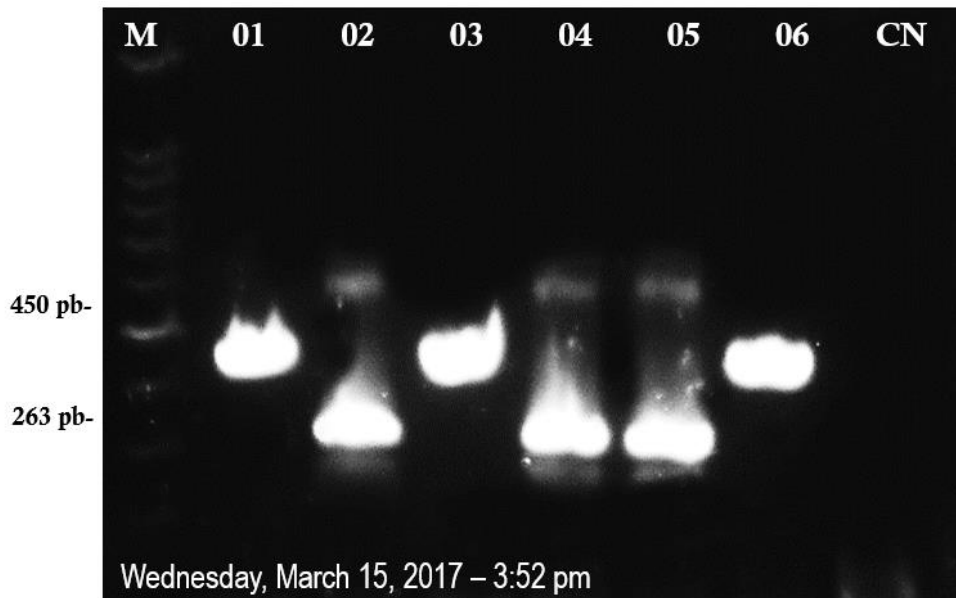
Turid Omland and cols. *Recurrent Respiratory Papillomatosis: HPV Genotypes and Risk of High-Grade Laryngeal Neoplasia*. Department of Otorhinolaryngology/Head and Neck Surgery, Oslo University Hospital. Institute of Clinical Medicine, Oslo, Norway. 2014.

Zacharisen, M. C.; Conley, S. (2006). *Papilomatosis respiratoria recurrente en el niño: simulador de procesos respiratorios comunes*. Department of pediatrics, Wisconsin, Estados Unidos.

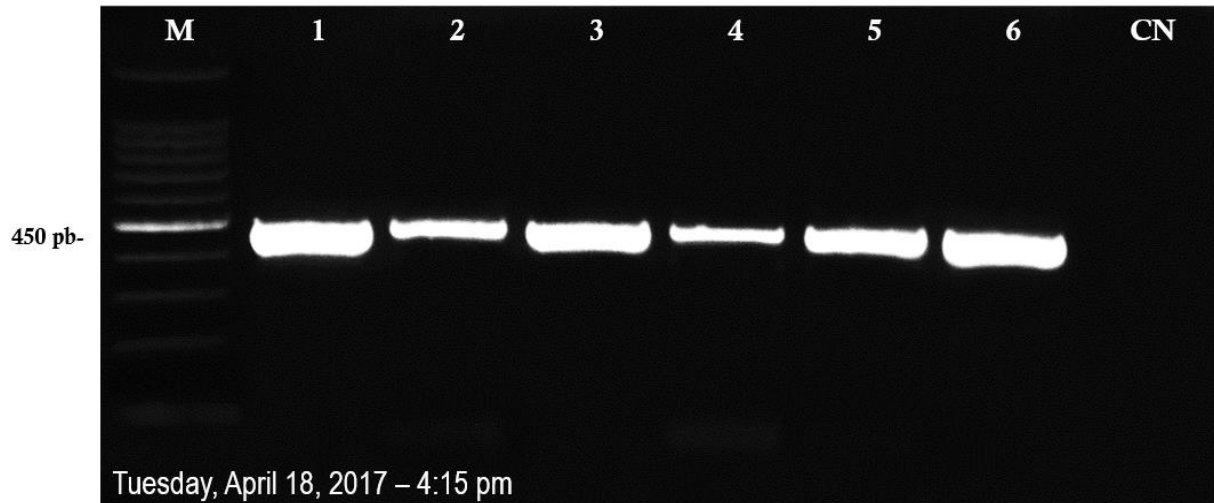
ANEXOS



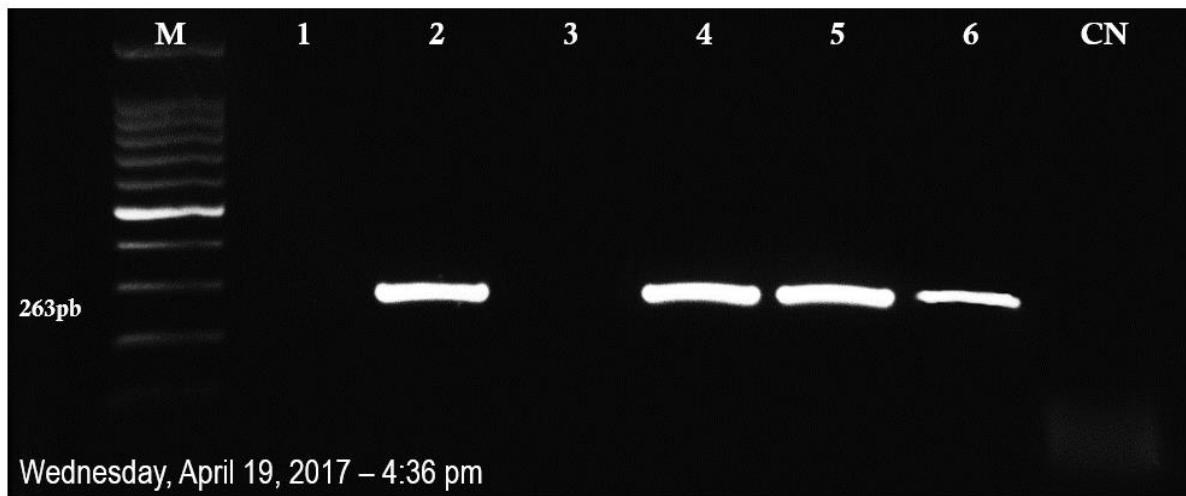
Ensayo 1. Correspondiente a la confirmación de material genético utilizando como control *Albumina: 350pb*. Presencia de material genético. **Interpretación resultados de pacientes:** VPHL 001; VPHL 002; VPHL 003; VPHL 004; VPHL 005; VPHL 006; VPHL 007; Control negativo.



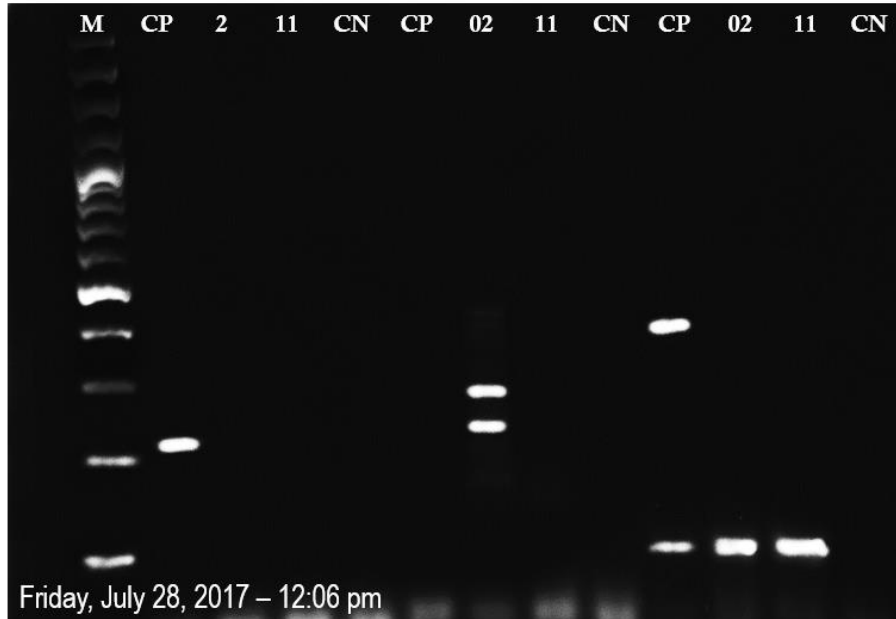
Ensayo 2. Correspondiente a la primera corrida de pacientes. Se observa que el resultado obtenido no es satisfactorio, existe una competencia entre primers. **Interpretación resultados de pacientes:** VPHL 001; VPHL 002; VPHL 003; VPHL 004; VPH L 005; VPHL 006; Control negativo. **Primer 11: 450pb, primer 6: 263pb.**



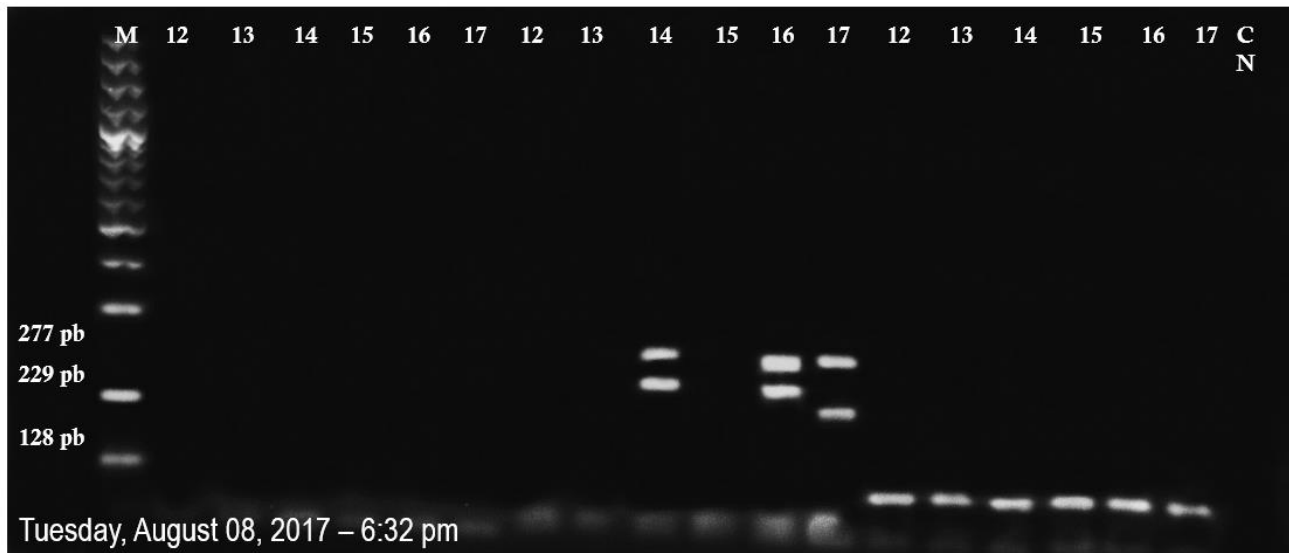
Ensayo 3. Correspondiente a la determinación del genotipo 11 mediante PCR single primer 11: 450pb. Se observan bandas en pesos moleculares esperados. **Interpretación resultados de pacientes:** VPHL 001; VPHL 002; VPHL 003; VPHL 004; VPH L 005; VPHL 006; Control negativo.



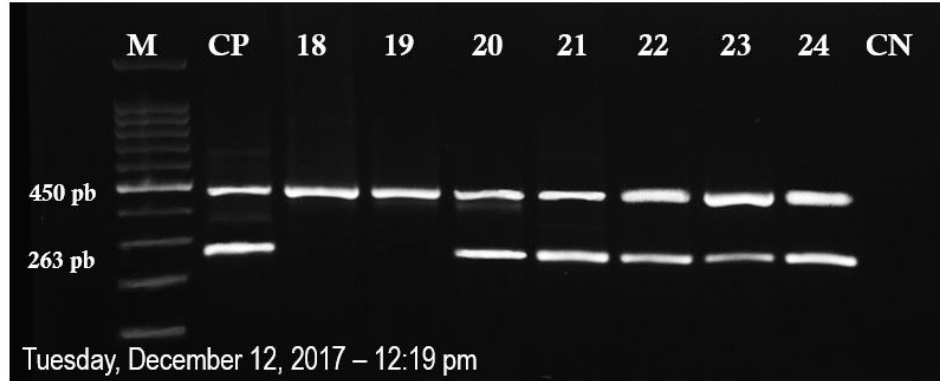
Ensayo 4. Determinación del genotipo 6 mediante PCR single primer 6: 263pb. Se observan bandas en pesos moleculares esperados. **Interpretación resultados de pacientes:** VPHL 001; VPHL 002; VPHL 003; VPHL 004; VPH L 005; VPHL 006; Control negativo.



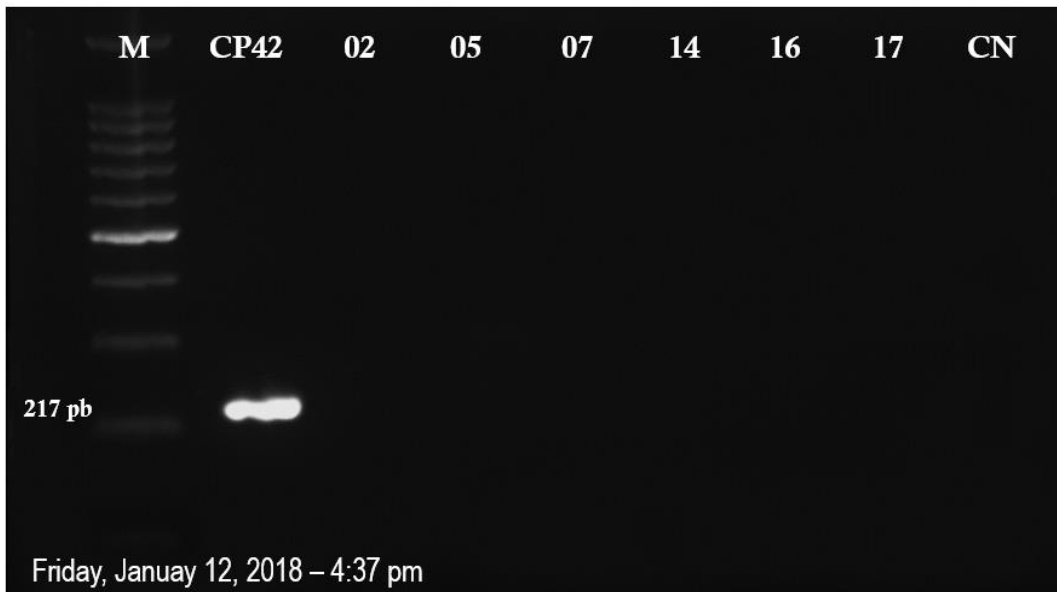
Ensayo 5. Correspondiente a la Determinación genotipos de alto riesgo. Mezcla I,II,III mediante PCR multiplex. primer 16 (I): 217pb, primer 16 (III): 397pb, primer 66(II): 277pb, primer 39(II): 229pb. Condiciones de PCR estandarizada de VPH, controles satisfactorios.. Interpretación resultados de pacientes: Control positivo Genotipo 16; VPH L 02; VPH 11; Control negativo



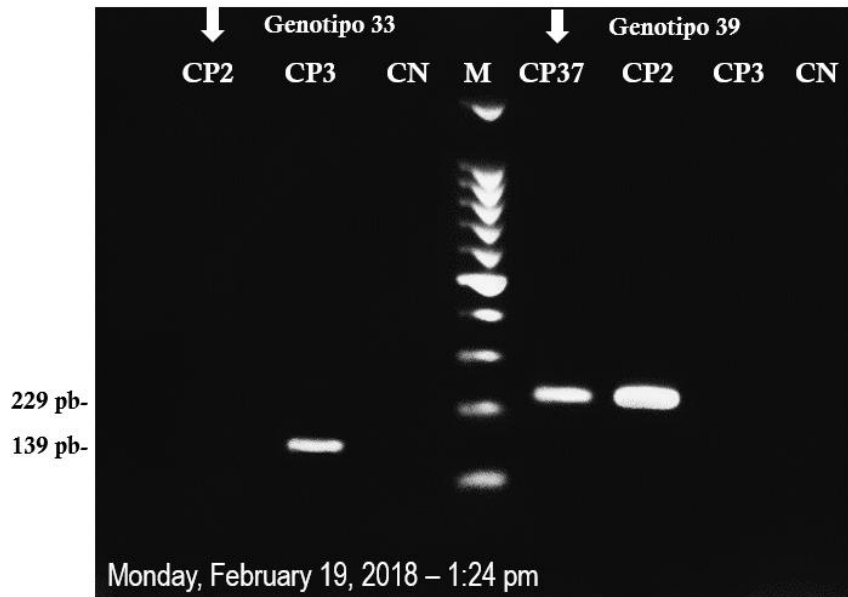
Ensayo 6. Correspondiente a la Determinación genotipos de alto riesgo. Mezcla I,II,III mediante PCR multiplex. primer 66 (II): 277pb, primer 39 (II): 229pb, primer 58(II): 128pb, Control interno (III): 99 pb. Condiciones de PCR estandarizada de VPH, controles satisfactorios.. Interpretación resultados de pacientes: VPH L 012; VPH L 013; VPH L 014, VPH L 015; VPH L016; VPH L 017; Pool Control negativo.



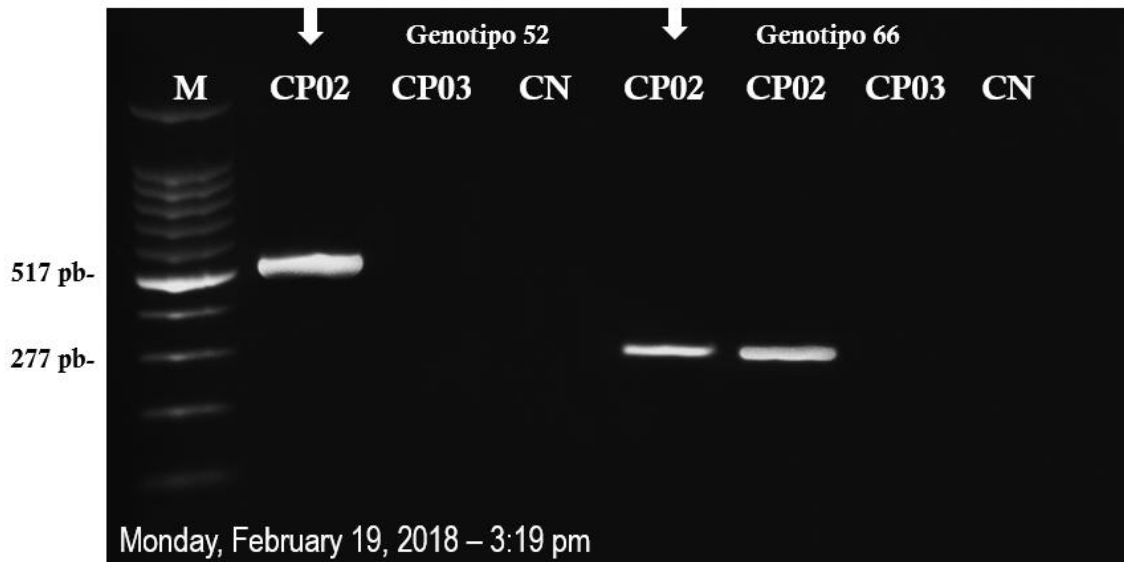
Ensayo 7. Correspondiente a la Determinación del genotipo 6-11 mediante PCR punto final single primer 6: 263pb, primer 11: 450pb. Carga de productos PCR de mezclas individuales en un mismo pozo para corrida electroforética, controles satisfactorios. **Interpretación resultados de pacientes:** Control positivo; VPH L 018; VPH L 019; VPH L 020, VPH L 021; VPH L 022; VPH L 023; VPH L 024; Pool Control negativo.



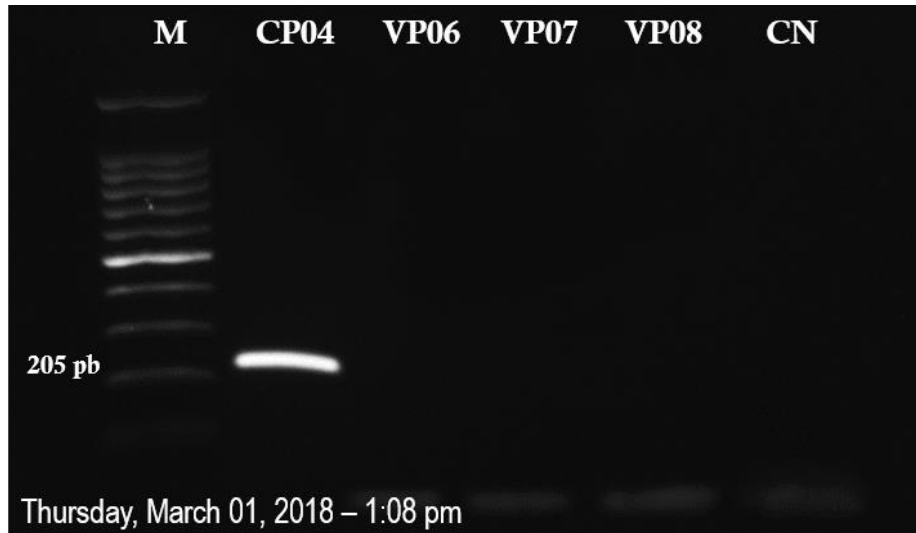
Ensayo 8. Determinación del genotipo 16 mediante PCR punto final single primer 16: 217pb. Detección de gen 16 frente a control positivo individual. Control positivo VPH C042 **Interpretación resultados de pacientes:** VPH L 02; VPH L 05, VPH L 07; VPH L 014; VPH L 015; VPH L 017; Control negativo.



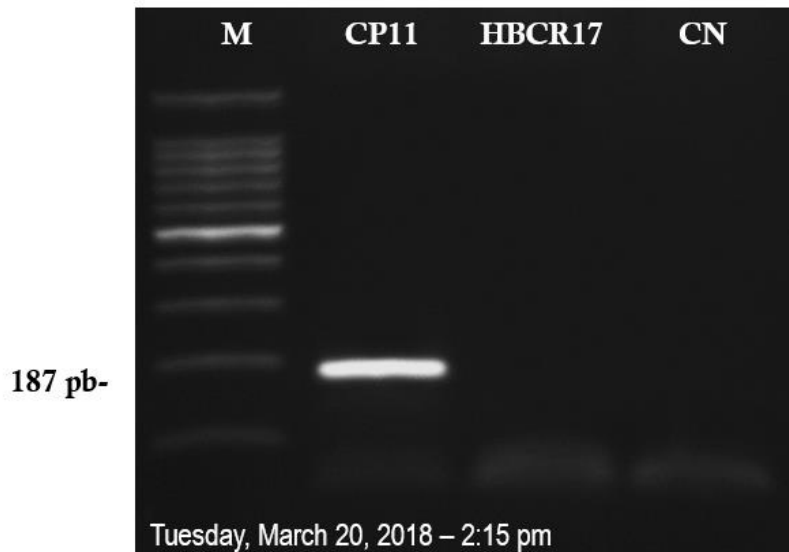
Ensayo 9. Correspondiente a la Determinación del genotipo 33 y 39 mediante PCR punto final single, primer 33: 139 pb primer 39: 229pb; corrida individual, cargando ambos productos de PCR en un mismo gel agarosa. Control Positivo VPH C 02; VPH C 03 ; CP 037. **Interpretación resultados de controles: Positivos.**



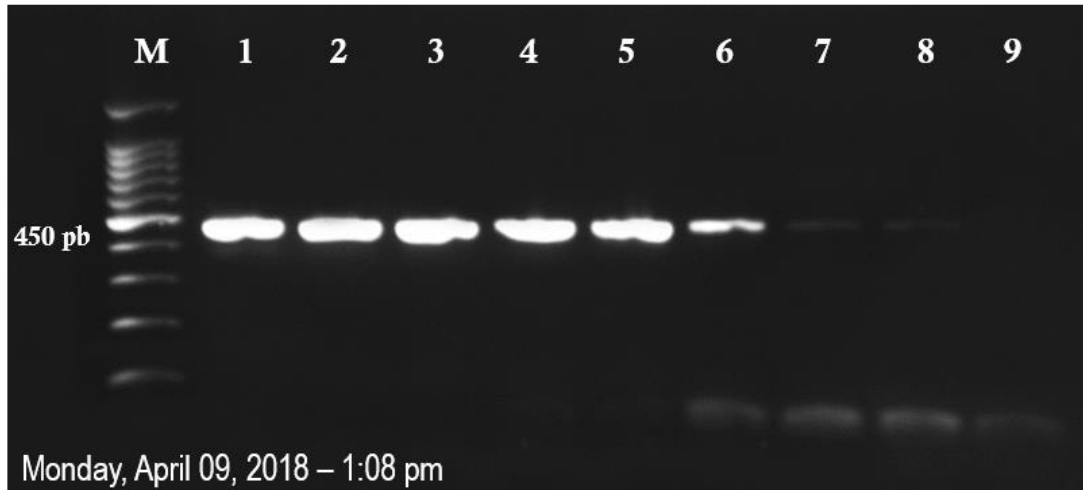
Ensayo 10. Correspondiente a la Determinación del genotipo 52 y 66 mediante PCR punto final single, primer 52: 517pb primer 66: 277pb; primer en corrida individual, cargando ambos productos de PCR en un mismo gel agarosa. Control Positivo VPH C 02; VPH C 03. **Interpretación resultados de controles: Positivos.**



Ensayo 11. Correspondiente a la Determinación del genotipo 45 mediante PCR punto final single, primer 45: 205 pb; primer en corrida individual. Control Positivo VPH C 04; Controles negativos VP06, VP07, VP08. **Interpretación resultados:** Positivo, **Control negativo:** Satisfactorio.



Ensayo 12. Correspondiente a la Determinación del genotipo 18 mediante PCR punto final single, primer 18: 187 pb; primer en corrida individual. Control Positivo VPH C 011; Control negativo HBCR17. **Interpretación resultados:** Positivo.



Ensayo 13 . Ensayo límite de detección. primer 11: 450 pb; La concentración mínima de ADN en la cual la amplificación mediante PCR es óptimo y permite la visualización de las bandas en la agarosa de forma clara es de 9.37 ng/ul. **Marcador molecular,** 1. CP (150ng/ul), 2. CP (75ng/ul), 3. CP (37.5ng/ul), 4. CP (18.75ng/ul), 5. CP (9.375ng/ul), 6. CP (4.68ng/ul), 7. CP (2.34ng/ul), 8. CP (1.17ng/ul), 9. CP (0.58ng/ul).



Tabla n°1: Genotipos de VPH detectados mediante técnica PCR punto final.

<i>Genotipos</i>	<i>Frecuencia (n:24)</i>	<i>%</i>
<i>Genotipo 6</i>	<i>19</i>	<i>79% (19/24)</i>
<i>Genotipo 11</i>	<i>18</i>	<i>75% (18/24)</i>
<i>Genotipo 39</i>	<i>3</i>	<i>13% (3/24)</i>
<i>Genotipo 58</i>	<i>2</i>	<i>8% (2/24)</i>
<i>Genotipo 66</i>	<i>4</i>	<i>17% (4/24)</i>
<i>Genotipo 16</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 18</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 31</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 33</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 35</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 45</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 51</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 52</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 56</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Genotipo 59</i>	<i>0</i>	<i>0% (0/24)</i>
<i>Total f: 46</i>		<i>n: 24</i>

Fuente: Resultados por PCR/ análisis molecular

Tabla n° 2: Coinfecciones presentes en los pacientes con papilomatosis laríngea.

<i>Genotipos</i>	<i>Frecuencia (n:24)</i>	<i>%</i>
<i>6 y 11</i>	<i>13</i>	<i>54%</i>
<i>11, 66</i>	<i>1</i>	<i>4%</i>
<i>6, 11, 66, 39</i>	<i>1</i>	<i>4%</i>
<i>6, 11, 39, 58, 66</i>	<i>1</i>	<i>4%</i>
<i>6, 39, 58, 66</i>	<i>1</i>	<i>4%</i>
<i>Total: 17</i>		

Fuente: Resultados por PCR/ análisis molecular



Tabla n° 3: Total de pacientes con papilomatosis laríngea según el Género

Características	Frecuencia (n:24)	Porcentaje (%)
<i>Genero</i>		
Masculino	13	54%
Femenino	11	46%
TOTAL	24	100%

Tabla n°4: Presencia de genotipos de virus de papiloma humano en relación al sexo

Características	Genotipos									
	6		11		39		58		66	
<i>Sexo</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Femenino	8	33%	9	38%	2	8%	1	4%	3	13%
Masculino	11	46%	9	38%	1	4%	1	4%	1	4%

Tabla n°5: Presencia de coinfecciones de VPH en relación al sexo

Características	Genotipos									
	6,11		11,66		6, 11, 66, 39		6, 11, 39, 58, 66		6, 39, 58, 66	
<i>Sexo</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Femenino	6	25%	1	4%	1	4%	1	4%	0	0%
Masculino	7	29%	0	0%	0	0%	0	0%	1	4%



Tabla n°6: Presencia de Genotipos del virus de papiloma humano según variable edad, sexo y visitas al Quirófano, en pacientes con papilomatosis laríngea.

<i>Genotipos</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad Diagnóstica</i>	<i>Edad</i>	<i>N° Cirugías</i>	<i>Años con Papilomatosis</i>	<i>Cirugías en 1 año</i>
6	F	36	39	12	3	4
6	F	6	54	61	48	1
6	M	9	14	5	5	1
6	M	56	58	6	2	3
6	M	17	24	10	7	2
11	F	54	56	2	2	1
11	F	4	9	29	5	6
11	M	57	60	7	3	2
11	M	3	10	4	7	1
6,11	F	8	10	9	2	5
6,11	F	10	42	21	32	2
6,11	F	4	14	61	10	6
6,11	F	66	70	10	16	1
6,11	M	1	3	10	2	5
6,11	M	5	10	33	5	7
6,11	M	5	9	53	4	13
6,11	M	10	17	10	7	2
6,11	M	36	42	9	6	1
6,11	M	55	68	30	13	3
6,11	M	52	55	5	3	2
11, 66	F	3	7	26	4	7
6,11, 66, 39	F	5	19	128	14	10
6, 11, 39, 58, 66	F	4	37	14	33	1
6, 39, 58, 66	M	62	65	6	3	2



Tabla n°7 Frecuencia de los genotipos de VPH, según edad

Edades		GENOTIPOS				
		6	11	66	39	58
0-10	Frecuencia porcentaje	10 42%	11 46%	3 13%	2 8.0%	1 4%
11-21	Frecuencia porcentaje	1 4%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
22-32	Frecuencia porcentaje	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
33-43	Frecuencia porcentaje	2 8%	1 4%	0 0%	0 0%	0 0%
44-54	Frecuencia porcentaje	1 4%	2 8%	0 0%	0 0%	0 0%
55-65	Frecuencia porcentaje	4 17%	4 17%	1 4%	1 4%	1 4%

Tabla n° 8: Frecuencia de coinfecciones de genotipos del VPH presentes según edades

Edades		Coinfecciones				
		6,11	11,66	6, 11, 66, 39	6, 11, 39, 58, 66	6, 39, 58, 66
0-10	Frecuencia porcentaje	9 38%	1 4%	1 4%	1 4%	0 0%
11-21	Frecuencia porcentaje	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
22-32	Frecuencia porcentaje	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
33-43	Frecuencia porcentaje	1 4%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
44-54	Frecuencia porcentaje	1 4%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
55-65	Frecuencia porcentaje	3 13%	0 0%	0 0%	0 0%	1 4%



Tabla n° 9: Protocolo de trabajo para amplificación de ADN de genotipos de VPH

Mezcla de reacción para la detección de genotipos VPH 6/11			
Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
<i>Enhancer 5X</i>	<i>10μl</i>	<i>Enhancer 5X</i>	<i>10μl</i>
<i>Buffer S</i>	<i>5μl</i>	<i>Buffer S</i>	<i>5μl</i>
<i>dNTPs</i>	<i>1μl</i>	<i>dNTPs</i>	<i>1μl</i>
<i>Enzima Taq</i>	<i>1μl</i>	<i>Enzima Taq</i>	<i>1μl</i>
<i>Primer 6 forward</i>	<i>1μl</i>	<i>Primer 11 forward</i>	<i>1μl</i>
<i>Primer 6 Reverse</i>	<i>1μl</i>	<i>Primer 11 Reverse</i>	<i>1μl</i>
<i>ADN (250ng/μl)</i>	<i>1μl</i>	<i>ADN (250ng/μl)</i>	<i>1μl</i>
<i>H₂O</i>	<i>30μl</i>	<i>H₂O</i>	<i>30μl</i>
Volumen final: 50μl			



Tabla n°10: Secuencia de oligonucleótidos de genotipos de VPH

Genotipo	Primers	Secuenciación	Pares de bases
6	PP6 forward	5'GCT AAA GGT CCT GTT TCG AGG CGG CTA-3'	<i>263 pb</i>
	PP6 Reverse	5'GGC AGC GAC CCT TCC ACG TAC AAT-3'	
11	PP11 forward	5'GCG TGT TTT GCA GGA ATG CAC TGA C-3'	<i>450 pb</i>
	PP16 Reverse	5' TGC CAT ACC CGC TGT CTT CGC TTT- 3'	
18	PP 18 Forward	5' AAC AGT CCA TTA GGG GAG CGG CTG GA-3'	<i>187 pb</i>
	PP18 Reverse	5' TGC CGC CAT GTT CGC CAT TTG-3'	
31	PP 31 Forward	5'GCG GTC CAA ACG CTC TAC AAA ACG CAC T-3'	<i>360pb</i>
	PP 31 Reverse	5'GCA GGG GCA CCA ACA TCA ACA ATT CCA -3'	
33	PP 33 Forward	5' ACA CAG AGG CAG CCC GGG CAT TGT TT-3'	<i>139pb</i>
	PP 33 Reverse	5' CAC GGG TTT GCA GCA CGA TCA ACA-3'	
35	PP 35 Forward	5' CCA TAA CAT CGG TGG ACG GTG GAC AGG 3'	<i>434pb</i>
	PP 35 Reverse	5' CCA TTA CAT CCC GTC CCC TCC CCT TCA-3'	
39	PP 39 Forward	5' CCG ACG GAG TGT CCC TGG ACC ATC TTA-3'	<i>229 pb</i>
	PP 39 Forward	5' CCA TTA CAT CCC GTC CCC TCC CCT TCA-3'	



Genotipo	Primers	Secuenciación	Pares de bases
45	PP 45 Forward	5' TGT TGG ACA TCA CAC CTA CCG TGG A-3'	205pb
	PP 45 Reverse	5'TCC GTA CCT GAC CCA GAA GAT GCA A-3'	
51	PP 51 Forward	5' CAA CTA GCA ACG GCG ATG GAC TG-3'	299pb
	PP 51 Reverse	5' CTG CTT CGC GGG CTG ACT AGA A-3'	
52	PP 52 Forward	5' GGT GTT GGT GCT GGT GCT TTT GCT A-3'	516pb
	PP 55 Reverse	5' CAG TTA CAG GGG GAC GAA TGG TGG A-3'	
56	PP 56 Forward	5'TGT TGT TTT TCC GCC ATT TTG TAC ATG CAA CC-3'	330pb
	PP 56 Reverse	5'TGG CCT ACA TAG TGT ATT CTG CAA GCC AAA AC3'	
58	PP 58 Forward	5'ACC ACC GAG GCC ACC AAC AAC GAA AGT-3'	128pb
	PP 58 Reverse	5' CGT GGT CTA CTG TCC ACG GCG CAG TCT-3'	
59	PP 59 Forward	5'CCG AGC AAG ACA CCT AAG ACA GCA ACG-3'	169pb
	PP 59 Reverse	5' TCG GAG TCG GAG TCA GGT AAT TGC T-3'	
66	PP 66 Forward	5' GCG GGC GGC TCC TAC CTC TTC CTC TTC -3'	277pb
	PP 66 Reverse	5' CCA CCT AAC CTG ACA CAC ACT GCC CAA GG-3'	
Albúmina	PPAlbForward	5' GCC CTC TGC TAA CAA GCT GTA C-3'	350pb
	PPAlb Reverse	5' GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC-3	
IC	PP IC/Forward	5' TTA TCC CGA GTC CCC CAG GCC TTT CT-3'	99pb
	PP IC/Reverse	5' TGG CTT GGC CCC AAC TTC CAT CA 3'	



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
"LUIS FELIPE MONCADA"



Reporte de Análisis Molecular

NOMBRE:

EDAD:

CENTRO ASISTENCIAL:

FECHA:

EXPEDIENTE:

CODIGO:

PRUEBA REALIZADA: Reacción en cadena de la polimerasa, PCR punto final para los genotipos del Virus de Papiloma Humano (VPH), bajo riesgo (no oncogénico): 6, 11 y alto riesgo (oncogénico): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66.

GENOTIPOS

RESULTADO

Bajo riesgo (no oncogénico)	
Alto riesgo (oncogénico)	

OBSERVACIONES: Se realizó la tipificación para genotipos de Virus de papiloma humano, un resultado negativo no excluye la presencia de otro genotipo de bajo o alto riesgo. .

Laboratorio Biología Molecular
POLISAL/ UNAN–Managua.



Figura 1. Microcirugía laríngea bajo microscopio, paciente con papilomatosis laríngea. Servicio, Otorrinolaringología.



Figura 2. Microcirugía laríngea bajo microscopio, paciente con papilomatosis laríngea. Servicio, Otorrinolaringología



Figura 3. Microcirugía de Laringe. *Tratamiento del trastorno de la voz. ORL clínica.*

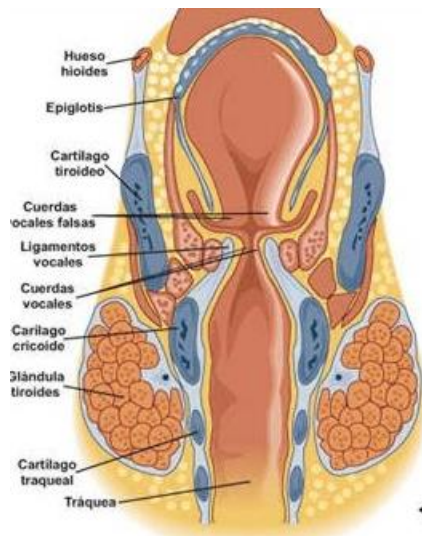


Figura 4. Anatomía y fisiología de la Laringe. *Tomado de Atlas de Anatomía Humana*



Figura 5. Anatomía y fisiología de la Laringe. *Tomado de Atlas de Anatomía Humano*

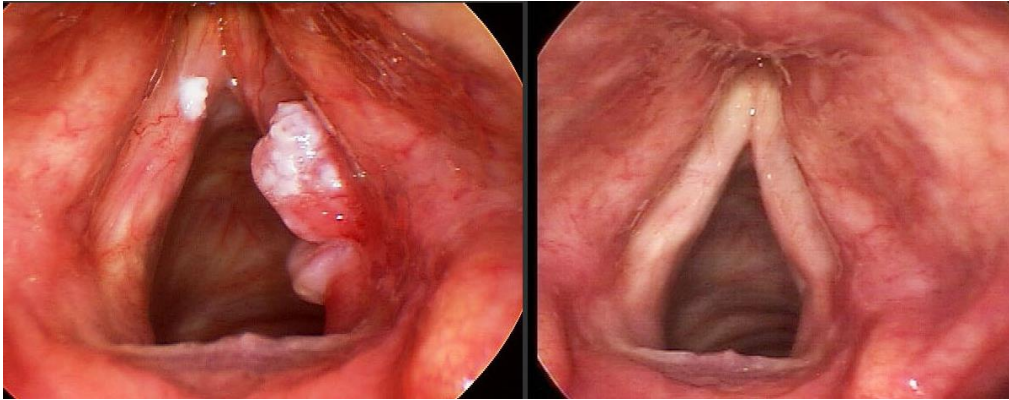


Figura 6. *Izquierdo* papiloma región glótica, *Derecho* Tratamiento Quirúrgico del papiloma glótico Temprano.



Figura 7. Papiloma laríngeo. Tomado de Dr. Manuel Gil. México/

GLOSARIO

A:	Adenina.
ADN:	Acido Desoxirribonucleico.
ARN:	Ácido Ribonucleico.
ANTIGENO:	Todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo.
ANTICUERPOS:	Son glicoproteínas del tipo gamma globulina.
BENIGNO:	Que no es de naturaleza maligna.
BIOPSIA:	Procedimiento realizado con el propósito de obtener tejido.
BROMURO DE ETIDIO:	Sustancia que se intercala entre las bases de DNA y es fluorescente cuando se ilumina en luz ultravioleta.
BUFFER:	Soluciones de lisis o lavado
CARCINOMA:	Se define como la existencia de enfermedad metastásica.
C:	Citosina.
CN:	Control Negativo.
CP:	Control positivo.
DISFONIA:	Dificultad para producir sonidos al hablar o un cambio en el tono.
DISNEA:	Sensación subjetiva de falta de aire.
dNTPs:	Nucleótido fosfatado
ESTRIDOR:	Sonido agudo que se produce en la inspiración.
EXÉRESIS:	Extirpación de un órgano o de un tejido corporal.
ETANOL:	Precipita el ADN del material extraído.
ENHANCER	Aumenta la capacidad transcripcional de genes estructurales.
E:	Región temprana (Early)
GENOTIPO:	Conjunto de los genes que existen en el núcleo celular
G:	Guanina
LARINGE:	Órgano tubular del conducto respiratorio.

LCR	Región larga de control
L:	Región tardía (Late)
LADDER:	Marcador molecular, es un segmento de ADN situado en un lugar específico del genoma (locus) en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear.
ng/ul:	Nanogramo por microlitro
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
Pb:	Pares de bases.
PRIMERS:	Oligonucleótidos (fragmentos cortos monocatenarios).
Taq:	Polimerasa, enzima que transcribe o replica ácidos nucleicos.
TBE:	Disolución tampón formulada con Trisborato y EDTA.
T:	Timina
TWEEN 20:	Es un tenso activo tipo polisorbato cuya estabilidad y relatividad ausenta la toxicidad.
PROTEINASA K:	Cataliza la descomposición de las proteínas celulares dividiéndolas en péptidos.
PBS:	Tampón fosfato salino, constituye una solución amortiguadora de pH
RECIDIVA:	Repetición de una enfermedad poco después de terminada la convalecencia
SINEQUIA:	Unión o adherencia anormal de tejidos u órganos.
URR:	Región no codificadora
VPH	Virus de Papiloma Humano.
LCR:	Región larga de control.