UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
Casa abierta al tiempo

TIPIFICACIÓN DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN LESIONES BUCALES RELACIONADAS A VPH EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON VIH

Que para obtener el grado de
Maestra en Patología y Medicina Bucal

PRESENTA

Bertha Alicia Flores Moreno

Comité tutorial:

Co-directora: Dra. Velia Ramírez Amador.

Co-directora: Dra. Gabriela Anaya Saavedra

Asesora: M. en C. Miriam Guido Jiménez.

México, D. F. Diciembre de 2011

“La Especialización y Maestría en Medicina y Patología Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”

Miembros del Jurado:

Dra. Estela de la Rosa García

P R E S I D E N T A

_____

Dra. Martha Beatriz González Guevara

S E C R E T A R I A

_____

Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez

V O C A L

_____

Créditos y agradecimientos

Agradezco el apoyo económico y las facilidades recibidas para la realización de esta tesis a:

- La división de Ciencias Básicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco
- El Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), y al Doctor Alejandro García Carranca

Agradezco las facilidades recibidas para la realización de esta tesis a:

- La Clínica Especializada Condesa
- El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán [INCMNSZ]
- El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias [INER])

Agradezco a las Doctoras Velia Ramírez y Gabriela Anaya, y a la maestra Miriam el haber dirigido este trabajo así como sus valiosas enseñanzas, su apoyo y disposición

Agradezco a mis maestros de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco sus valiosas enseñanzas

Agradezco a mis compañeros su gran apoyo

Agradezco….

A Dios

A mi esposo Felipe por todo su amor, comprensión y apoyo

A mi madre Bertha Alicia por las enseñanzas que me dejó y que siguen dando fruto

A mi padre Emilio, a mis hermanos Héctor, Sonia, Cundo, Fanny y Noris por su amor y apoyo

1. Resumen

Desde que se comenzó a utilizar el Tratamiento Antirretroviral Altamente Activo (TARAA), se ha observado un incremento en la frecuencia de lesiones bucales asociadas al virus del papiloma humano (LB-VPH) en pacientes infectados por VIH. En algunos trabajos se ha sugerido que este incremento se relaciona con el uso de TARAA y con una disminución de la carga viral (CV), sin embargo no se ha comprobado cuál es el mecanismo de este incremento y tampoco se sabe cuáles son los tipos virales específicos relacionados al desarrollo de las LB-VPH en pacientes infectados por VIH.

El presente trabajo es un estudio transversal, observacional y analítico en el cual se incluyó una cohorte de 329 pacientes infectados por VIH de tres centros de referencia. Se encontró una asociación entre la presencia de LB-VPH y el tiempo de uso de TARAA, asimismo se describieron las características clínicas e histopatológicas de las lesiones y se identificaron los tipos virales específicos para las LB-VPH que presentaron los pacientes incluidos en este estudio.

ÍNDICE GENERAL

1 Introducción 11

1.1 Infección por VIH/SIDA …… 11

1.1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) ……..... 12

1.1.2 Patogénesis y características clínicas de la infección por VIH 13

1.1.3 Terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) …… 14

1.2 Virus del Papiloma Humano …… 16

1.2.1 Organización general del genoma del VPH ……... 17

1.2.2 Lesiones bucales (LB) asociadas al VPH en individuos con VIH …. 19

1.3 Terapia Antirretroviral Altamente activa y LB-VPH ……..... 22

1.4 Planteamiento del problema y justificación …… 24

2 Hipótesis ……...…….. 25

3 Objetivos ……...…..... 25

4 Método ……. 25

4.1 Diseño del estudio …… 25

4.2 Sujetos participantes …… 26

4.3 Criterios …… 26

4.4 Aspectos éticos …… 27

4.5 Variables …… 28

4.6 Cálculo del tamaño muestral …… 28

4.7 Manejo de los datos …… 29

4.8 Procedimientos clínicos …… 29

4.8.1 Criterios histopatológicos …….. 30

4.9 Procedimientos de laboratorio …… 31

4.9.1 Extracción y purificación de ADN …… 31

4.9.2 Cuantificación de ADN viral …… 33

4.9.3 Reacciones de PCR …… 33

4.9.4 Amplificación del gen β-globina …… 34

4.9.5 Amplificación de la región L1 de Papilomavirus …… 34

4.9.6 Reacciones de secuenciación ……. 35

4.10 Análisis estadístico ……... 37
5 Resultados ……. **39**
5.1 Características demográficas y clínicas ……. 39
5.2 Pacientes con LB-VPH ……. 40
5.3 Características clínicas de LB-VPH ……... 41
5.4 Características histopatológicas de LB-VPH ……. 41
5.5 Análisis molecular de las muestras ……. 42
5.5.1 Amplificación de oligonucleótidos β-globina y gen L1 de papilomavirus ……... 42
5.5.2 Reacción de secuenciación ……. 42
5.6 Asociación entre diagnóstico definitivo (histopatológico) y tipificación viral …… 43
6 Discusión ……. **45**
7 Referencias ……. **55**
8 Cuadros ……. **68**
9 Figuras ……. **77**
10 Anexos ……. **89**
Anexo 1 Carta de consentimiento informado …… 90
Anexo 2 Ficha de recolección de datos …… 92
Anexo 3 Análisis molecular con tipificación viral de muestras de LB-VPH en pacientes infectados con VIH …… 94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Criterios histológicos utilizados para el diagnóstico histopatológico de las LB-VPH	…….	69
Cuadro 2	Condiciones utilizadas para cada juego de oligonucleótidos	…….	70
Cuadro 3	Condiciones utilizadas para oligonucleótidos GP5+/GP6+	…….	71
Cuadro 4	Características demográficas de individuos infectados por VIH con LB-VPH y sin LB-VPH	…….	72
Cuadro 5	Características clínicas de individuos infectados por VIH, con LB-VPH y sin LB-VPH	…….	73
Cuadro 6	Relación entre los diagnósticos clínicos presuntivos y el diagnóstico histopatológico en las 30 muestras en las que se obtuvo biopsia	…….	74
Cuadro 7	Análisis molecular de las 23 muestras en las que se realizó la reacción de secuenciación	…….	75
Cuadro 8	Relación entre los tipos de VPH y diagnóstico histopatológico	…….	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa genético del VPH	…….	17
Figura 2	Figura representativa de características clínicas de LB-VPH	…….	78
Figura 3	Figura representativa de características clínicas de LB-VPH	…….	79
Figura 4	Características clínicas de papiloma escamoso	…….	80
Figura 5	Características clínicas de papiloma escamoso	…….	81
Figura 6	Características clínicas de hiperplasia epitelial multifocal	…….	82
Figura 7	Características histopatológicas de papiloma escamoso	…….	83
Figura 8	Características histopatológicas de hiperplasia epitelial multifocal	…….	84
Figura 9	Características histopatológicas de hiperplasia epitelial multifocal	…….	85
Figura 10	Características histopatológicas de LB-VPH	…….	86
Figura 11	Figura representativa de amplificación del gen β-globina	…….	87
Figura 12	Figura representativa de amplificación de la región L1 del VPH	…….	87
Figura 13	Ejemplos de las secuencias obtenidas	…….	88

1. Introducción

1.1 Infección por VIH/SIDA

La infección por VIH/SIDA es un problema de salud a nivel mundial debido a los años de vida perdidos y el deterioro en la calidad de vida que sufren los pacientes; en la actualidad se reconocen también sus dimensiones e impactos sociales, culturales, económicos, legales, éticos y políticos. La infección por VIH se ha extendido ampliamente en diferentes países desde su aparición a principios de la década de los 80´s, cerca de 40 millones de hombres, mujeres y niños han sido infectados.[1, 2]

Se estima que en el mundo, el número de personas infectadas por el VIH ha aumentado de 26.2 millones (24.6 millones–27.8 millones) en 1999 a 33.3 millones (31.4 millones–35.3 millones) en 2009.[1] En México, hasta junio de 2011 se han reportado 149,883 casos de VIH/SIDA, de los cuales 123,162 (82%) son hombres y 26,721 (18%) son mujeres. En relación a la categoría de transmisión, el primer lugar lo ocupó la vía sexual con 95,451 (63.7%) casos registrados, siendo la heterosexualidad la que mayor número de casos registró (50,554/53%), seguido de la categoría hombres que tienen sexo con hombres (HSH) con 45,100 (30%) casos. [3] El Distrito Federal es una de las entidades con mayor número de casos de SIDA diagnosticados, hasta junio de 2011 se reportaron 23,949 (15.9%) casos, de los cuales el 98.1% (147,085) se encuentran entre los 15 y los 44 años de edad. [3]

La infección por VIH es un proceso crónico que implica una producción elevada y constante de nuevos viriones, acompañada de la consecuente destrucción o muerte o fusión celular de linfocitos T de tipo $CD4^+$, esta destrucción es compensada con una producción aumentada de

linfocitos $CD4^+$ durante varios años, que permanecen en el organismo pero no lo protegen, hasta que las reservas se agotan, desembocando finalmente en una disminución de estos que origina una inmunodeficiencia adquirida. [4]

1.1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El VIH pertenece a la familia retroviridae y se relaciona con la subfamilia lentiviridae. Los retrovirus son virus que contienen RNA y se replican mediante una DNA polimerasa, dependiente de RNA, denominada transcriptasa inversa. El VIH es un virus con envoltura que contiene una región central, en la que se encuentran dos copias idénticas de RNA genómico de una cadena y las enzimas requeridas para su replicación.[4]

El ciclo principia con la unión de la envoltura viral al receptor celular CD4+, presente principalmente en la superficie de las células T (cT) inmaduras, las cT CD4+, cT Helper circulantes y en menor grado en monocitos, macrófagos, células dendríticas foliculares y células microgliales.[4, 5] La entrada del virus a estas células depende de los receptores específicos entre los que destaca la molécula CD4+ y los más recientemente descubiertos correceptores (CCR5 y CXCR4), el primero correceptor en macrófagos y el segundo en linfocitos T. [6]

La molécula CD4+ que habitualmente es el receptor de las moléculas de clase II del sistema principal de histocompatibilidad sobre las células presentadoras de un antígeno, se une de manera específica y con una afinidad extremadamente alta a la subunidad exterior de la gp 120 de la envoltura de VIH. La conformación de la gp120 es importante para su unión a CD4+,

pues se requiere de la interacción entre la región V1 de la gp120 con una región que une CD4+ en la cuarta porción conservada, cerca de la región C terminal de la gp120 de la envoltura del VIH. [5, 7]

Después de la unión al receptor, el VIH1 entra al citoplasma de la célula blanco por un mecanismo de fusión entre la envoltura del virus y la membrana celular. Una vez que el virus ha entrado a la célula como una ribonucleocápside es transcrita a una copia de DNA de doble cadena por la acción de las enzimas virales transcriptasa inversa y ribonucleasa. Esta reacción ocurre en el citoplasma de la célula dentro de las primeras 6 horas de la infección .[4, 5]

Una característica particular del ciclo de vida retroviral después de la integración es su capacidad para persistir en un estado aparentemente inactivo, es decir, sin la producción de mensajes virales o de proteínas. Sin embargo, en este período los pacientes tienen un deterioro gradual del sistema inmune que se manifiesta en alteraciones de la función cooperadora de las células T CD4+. [4, 8]

1.1.2 Patogénesis y características clínicas de la infección por VIH

Con la identificación del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en 1983 y la comprobación de su relación etiológica con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en 1984,[2] y con la disponibilidad de pruebas diagnósticas sensibles y específicas para la infección por VIH, la definición de casos de infección por VIH/SIDA ha sufrido varias revisiones con el paso de los años. La última revisión tuvo lugar en 2008, [9] en este sistema de clasificación de los CDC revisado para adultos y adolescentes mayores de 13 años con

infección por VIH se requieren pruebas de laboratorio confirmatorias de la infección: pruebas de tamizaje de anticuerpos para VIH, PCR, antígeno p24 de VIH, y cultivo viral. Asimismo se establecen cuatro estadios de la infección categorizados de menor a mayor severidad: estadio 1, estadio 2, estadio 3, estadio desconocido. Los estadios 1 y 2 se consideran asintomáticos, los estadios 3 y desconocido se consideran como SIDA.

El sistema se basa en el conteo de linfocitos CD4+ y en el porcentaje del total de linfocitos, definiéndose de la siguiente manera:

- Estadio 1: prueba confirmatoria de la infección, $\geq$ 500 células/mm^3, $\geq$ 29%
- Estadio 2: prueba confirmatoria de la infección, 200 - 499 células/mm^3, 14-28%
- Estadio 3: prueba confirmatoria de la infección, < 200 células/mm^3, < 14%
- Estadio desconocido: con/sin prueba confirmatoria de la infección, sin información sobre conteo ni porcentaje de linfocitos CD4+

Cuando en un paciente la enfermedad ha progresado y éste ha sido clasificado en un estadio más severo, no se puede reclasificar en un estadio menor. [9]

1.1.3 Terapia antirretroviral altamente activa (TARAA)

El objetivo general de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) es la supresión máxima y prolongada de la carga viral (CV) reduciendo sus niveles plasmáticos hasta un nivel no detectable basado en las técnicas moleculares actuales (<50 copias de ARN viral/ml), y mejorar el grado de inmunosupresión mediante la elevación de las cuentas de células CD4+

durante el mayor tiempo posible. Esto con el fin de mejorar la expectativa y calidad de vida de las personas infectadas.[10, 11]

El momento óptimo del comienzo de la terapia antirretroviral es hasta la fecha tema de discusión, sin embargo en la guía de tratamiento antirretroviral revisado por la OMS en 2010 se recomienda iniciar la terapia antirretroviral en pacientes con un conteo de linfocitos CD4+ < 350 células/mm^3. [1] Esto es en relación a que en los pacientes con cuentas de linfocitos CD4+ superiores a 350 células/mm^3 el riesgo de desarrollo de enfermedades relacionadas al VIH es bajo. [12] Asimismo, la determinación de CV es importante para tomar la decisión. Si ésta es igual o mayor a 55,000 copias/ml, el riesgo de progresión es alto por lo que se recomienda iniciar tratamiento. [13]

Los medicamentos antirretrovirales (ARVs) se clasifican en Inhibidores nucléosidos de la transcriptasa inversa (ITIN), Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN), Inhibidores de la proteasa (IP).[14]

Los esquemas de TARAA deben contener tres o cuatro fármacos con al menos dos mecanismos de acción diferentes:[10]

- 2 ITRAN + 1 ITRNN
- 2 ITRAN + 1 IP
- 3 ITRAN

1.2 Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH) forma parte de la familia Papovavirus, también llamada Papillomaviridae, el cual tiene afinidad por los epitelios y puede inducir el desarrollo de lesiones benignas y malignas tanto en piel como en mucosas. [15-20]

Hasta la fecha se ha aislado y secuenciado el genoma alrededor de 120 tipos de VPH, [21, 22] sin embargo hay trabajos donde se ha reportado la existencia de más de 200 tipos diferentes. [23, 24] Los diversos tipos de VPH se describen basándose en su secuencia genómica y se identifican con un número.[18] Si la secuencia genómica varía en más de un 10% se reconoce un nuevo tipo viral, si la variación es entre un 2% y 10% se define como subtipo, y si la variación es menor a 2% se define como una variante. [17, 18, 20, 23]

De acuerdo al potencial para desarrollar lesiones malignas, los tipos virales se clasifican en bajo riesgo y alto riesgo. Las LB-VPH benignas como el papiloma escamoso y la hiperplasia epitelial multifocal se han asociado a los tipos virales de bajo riesgo 2, 4, 6, 7, 11, 13 y 32, mientras que los tipos virales 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 son de alto riesgo y se han relacionado con el desarrollo de lesiones bucales malignas como el carcinoma escamocelular. [20]

Los papilomavirus comprenden un grupo de virus icosahédricos que se replican en el núcleo celular, sin envoltura y con un ADN circular de doble hélice formado por 8000 pares de bases (pb). La partícula viral contiene 72 capsómerospentaméricos que rodean el ADN. [17, 25, 26]

1.2.1 Organización general del genoma del VPH

Los genomas de los diferentes tipos virales presentan una estructura básica muy similar, en la cual se han identificado tres regiones principales: región de expresión temprana (E), región de expresión tardía (L) y región larga de control (LCR), como se puede observar en la figura 1 donde se hace referencia al VPH 16.[20, 25]

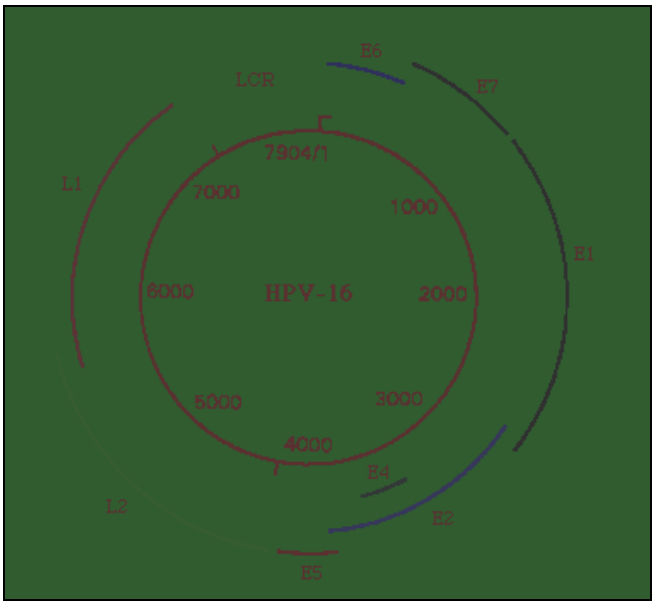


Figura 1. Mapa genético del papillomavirus tipo 16, donde están representados las distintas regiones del genoma viral.
Tomado de http://www.respyn.uanl.mx/ii/2/ensayos/papiloma.html

En la región temprana se encuentran todos los genes reguladores de la transcripción, replicación y ciclo viral (E1, E2, E4, E5, E6 y E7); en la región tardía se encuentran los genes que regulan las proteínas mayor (L1) y menor (L2) de la cápside viral. La región larga de control (LCR), que no tiene función codificante, es un segmento del genoma viral de aproximadamente 1,000 pb, en ella se encuentran los genes reguladores de la transcripción viral (p97) y del origen de la replicación (ori) la cual ocurre exclusivamente en el núcleo de la célula huésped. [20, 23, 24, 25]

Las proteínas de expresión temprana (por sus siglas en inglés E: early) tienen funciones específicas: E1 participa en el inicio de la replicación viral, E2 participa en la replicación del virus y en la regulación de la transcripción de los oncogenes E6 y E7, E4 participa en la ruptura de citoqueratinas, E5 es una proteína transformadora de membranas. E6 se une a p53 e induce su degradación y activa a la telomerasa, el gen E7 se une a una serie de proteínas celulares regulatorias: pRB, p130 y c-jun. [27, 28, 29] Los productos de los oncogenes E6 y E7 inducen el mantenimiento del estado inmortalizado de las células que contienen secuencias de VPH. [20, 27, 29]

El VPH infecta las células epilteliales mitóticamente activas, específicamente a los queratinocitos a través de microabrasiones mediante contacto directo de célula a célula, llegando primero a la membrana basal y sin ocasionar signos clínicos de viremia.[16, 30,31]

La infección comienza cuando las proteínas de la cápside viral se unen a los receptores de la membrana celular. Después de la unión a la célula, el genoma viral se traslada al núcleo donde ocurre la integración del ADN viral en el genoma celular permaneciendo en estado de latencia.[19, 20, 27, 32]

El genoma viral se replica en los siguientes estadios:

- Primer estadio: las proteínas tempranas E1 y E2 son sintetizadas y como resultado se replican de 10 a 200 copias virales
- Segundo estadio: En este estadio ocurre proliferación viral sin que se presente destrucción de las células hospederas. Durante el ciclo celular ocurre la replicación. Ocurre la expresión

de los genes E6 y E7, las células presentan un ciclo de vida corto y divisiones celulares frecuentes, lo cual se traduce en la formación de lesiones exofíticas benignas.

- Tercer estadio: Las proteínas E1 y E2 se activan y se producen miles de copias de ADN viral, asimismo se activan los genes L1 y L2 necesarias para el ensamblado de la cápside viral. [20]

La producción final de viriones y su liberación requiere de la diferenciación terminal de las células infectadas en el epitelio, mediante el proceso normal de descamación.[18, 19] Se piensa que la especificidad epitelial de VPH pueda estar determinada por la región larga de control. Algunos autores[26, 33] han establecido in vitro, que el VPH16 utiliza Proteoglucano Heparin Sulfato (PHS) para infectar células. PHS es una proteína de membrana celular y también es un componente de la membrana basal epitelial, la cual está involucrada en funciones como regulación de la permeabilidad de la membrana basal y adhesión celular.[26]

1.2.2 Lesiones bucales asociadas al VPH (LB-VPH) en individuos con VIH

Las lesiones bucales asociadas al VIH (LB-VIH) han sido características clínicas frecuentes, tanto en etapas tempranas como en etapas avanzadas de la enfermedad por VIH/SIDA, asimismo han cobrado gran importancia ya que afectan la calidad de vida de los pacientes.[34] Algunas LB-VIH como candidiasis bucal y leucoplasia vellosa son consideradas indicadoras de la infección y signos clínicos de progresión de la enfermedad, tanto por su asociación con la replicación viral, como por la inmunosupresión que caracteriza a la infección por VIH.[35-37] Por otro lado, algunas LB-VIH podrían ser tomadas en cuenta como indicadores clínicos relacionados con el tiempo de uso de tratamiento antirretroviral.[38]

Las relaciones directas entre la infección por VIH y otras enfermedades infecciosas son complejas. Por un lado, la infección por VIH favorece las enfermedades llamadas oportunistas, y por el otro, ciertas infecciones locales de los órganos genitales facilitan la infección por el VIH.[13, 39] En este sentido, diversos estudios han establecido que desde el inicio del uso de TARAA la incidencia de LB como candidiasis bucal y leucoplasia vellosa ha disminuido;[40] sin embargo, en algunos trabajos[41-45]se observó que desde que se comenzó a usar TARAA se ha presentado un incremento en la incidencia de lesiones bucales asociadas al VPH (LB-VPH) en individuos infectados por el VIH.

La susceptibilidad de los individuos con VIH para adquirir el VPH es alta.[39,46] En diversos trabajos,[47, 48] se ha establecido la asociación del VPH con el desarrollo de lesiones del cuello uterino en mujeres infectadas por el VIH, asimismo algunos autores[13, 47, 48] han observado que las mujeres con cuentas de linfocitos CD4+ menores de 200 tienen mayor riesgo de tener VPH en cérvix. Sin embargo hay estudios[36, 39] donde se encontró que mujeres infectadas con VIH y un conteo de linfocitos CD4+ $\leq$ 300 tuvieron un riesgo significativamente alto de tener VPH en cérvix.

En la mucosa bucal de individuos con VIH, la infección por VPH se ha asociado con un grupo multiforme de lesiones exofíticas nodulares, papulares o hiperplásicas. Las lesiones bucales asociadas al VPH (LB-VPH) pueden tener la superficie lisa o presentar un patrón parecido a una coliflor o digitiforme, con base sésil o pediculada y se han clasificado en cuatro lesiones principales: papiloma escamocelular, verruga vulgar, hiperplasia epitelial multifocal y condiloma acuminado.[35, 49]

Papiloma escamoso. Esta LB-VPH se observa con mayor frecuencia en mucosa de paladar duro, paladar blando y úvula, extra oralmente se presenta principalmente en borde bermellón de labios. Estas lesiones exofíticas pueden presentarse como únicas o múltiples, miden alrededor de un centímetro, su color puede ser blanquecino o igual a la mucosa adyacente, la superficie puede ser digitiforme recordando a una coliflor, o multilobulada, la base en la mayoría de las lesiones es pediculada, pero también puede ser sésil, y son lesiones asintomáticas.[50] Los tipos virales involucrados en el desarrollo de esta lesión son el VPH-6, VPH-11, y en menor frecuencia el VPH-16. [51]

Verruga vulgar. Clínicamente puede presentarse como lesión exofítica única o lesiones múltiples (regularmente agrupadas), la superficie puede ser suave y digitiforme o parecida a una coliflor, la base puede ser pediculada o sésil, y se localiza en cualquier parte de la cavidad bucal.[35] A esta lesión se encuentran involucrados los tipos virales VPH-2, VPH-4 y VPH-57.[51]

Hiperplasia epitelial multifocal. Esta LB-VPH clínicamente se caracteriza por la presencia de múltiples pápulas o nódulos bajos de color igual a la mucosa adyacente, la superficie es suave y verrucosa, el tamaño puede variar de 0.1 a 1.0 cm. y se localizan en mucosa no queratinizada, generalmente en mucosa de labios. Tienden a desaparecer al traccionar la mucosa afectada.[52, 53] En el desarrollo de esta lesión se encuentran involucrados los tipos virales VPH-13 y VPH-32.[52, 53]

Condiloma acuminado. Generalmente se presenta como múltiples nódulos pequeños que tienden a coalescer, de color igual a la mucosa adyacente, con superficie digitiforme. Se

presenta con mayor frecuencia en mucosa labial, paladar blando y frenillo lingual.[35] Los tipos virales involucrados son VPH-6 y VPH-11, en menor frecuencia VPH-16 y VPH-18.[51, 54]

A pesar que los datos acerca de los tipos virales involucrados en el desarrollo de estas lesiones en individuos con VIH son limitados, los tipos virales de bajo riesgo que se han asociado a las LB-VPH son: VPH-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13 y 32. Asimismo, los tipos virales de alto riesgo que se han encontrado son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 69, 72 y 73.[18, 20, 46, 51, 55] Un hallazgo interesante es que las LB-VPH con mayor número de coilocitos son positivas a tipos de riesgo alto (31, 33, 51, 16, 18).[25, 37, 46]

Un grupo de investigación en Brasil[40] informó que los pacientes con infección por VPH genital tienen una frecuencia alta (89.7%) de LB-VPH, y se encuentra asociada a contacto oro-genital. Estos resultados contrastan con lo reportado por Fakhry y cols.[48] quienes analizaron lavados en la mucosa bucal y genital realizados en mujeres con y sin VIH, e identificaron que la presencia de VPH en la mucosa bucal es menor que en el cérvix, y solo el 16.7% de la población estudiada presentaban simultáneamente infección en ambos sitios; sin embargo, no hacen referencia a la presencia de lesiones bucales específicas.

En México, un reporte preliminar en individuos con VIH, identificó una prevalencia de LB-VPH de 3.03%, encontrando a los tipos 13 y 6 como los más frecuentes.[56]

1.3 Terapia antirretroviral altamente activa y LB - VPH

Con el inicio del uso de TARAA, desde el año 1996, se ha observado una reducción en la frecuencia de algunas lesiones bucales, sin embargo diversos estudios realizados en el

extranjero han reportado un aumento en la incidencia de LB-VPH en pacientes con TARAA. [41, 42, 43, 44, 45] En México, en un estudio realizado por Ramírez-Amador y cols.[57] con una cohorte de 1,000 pacientes, se encontró que la prevalencia de LB-VPH fue mayor en los pacientes que se encontraban dentro de un período de 1996 al 2001, bajo TARAA (0.4% al 1.2%).

Los mecanismos por los cuales interactúan el VIH y el VPH no están claros. El VIH no tiene afinidad por células epiteliales, y el ciclo viral del VPH está restringido a epitelios, y en individuos con VIH, a mucosas. Recientemente se ha encontrado evidencia de que existe una interacción entre el VPH y las proteínas Tat, Rev, Vpr del VIH [22]

1.4 Planteamiento del problema y justificación

En algunos estudios se ha observado que con la introducción de TARAA la frecuencia de LB-VPH se ha incrementado considerablemente. Algunos autores sugieren que este incremento se relaciona a una disminución en la CV y al uso de TARAA.[37] Sin embargo no se ha comprobado aún cuál es el mecanismo de dicho incremento, así como tampoco se sabe qué tipos virales específicos están involucrados en el desarrollo de las LB-VPH en pacientes con VIH.

El análisis del espectro clínico de las LB-VPH en individuos con VIH en 3 centros de referencia para VIH/SIDA brindará información acerca de la prevalencia de LB-VPH en esta población. Asimismo la descripción de las características clínicas de las LB-VPH ayudará a caracterizar estas lesiones en pacientes infectados por VIH.

La información que se obtenga de este estudio será de utilidad para establecer los tipos virales específicos relacionados al desarrollo de las LB-VPH en individuos infectados por VIH, así como para definir las características clínicas de las LB-VPH que se presentan en estos pacientes.

Por otro lado, dicha información podrá ser utilizada en estudios de seguimiento, con el fin de determinar su comportamiento a largo plazo, y la posible instauración de las medidas terapéuticas más efectivas.

2. Hipótesis

Los tipos de VPH identificados en las LB-VPH en pacientes infectados por VIH/SIDA son de bajo riesgo y se relacionan con el tiempo de uso de TARAA.

3. Objetivos

Objetivo General

- Identificar los tipos virales involucrados en las LB-VPH en individuos infectados con VIH/SIDA

Objetivos Particulares

- Estimar la posible asociación de las LB-VPH con el tiempo de uso de TARAA
- Estimar la posible asociación de las LB-VPH con el conteo de linfocitos CD4+ y los niveles de carga viral

4. Método

4.1 Diseño del estudio

Estudio transversal, observacional y analítico, en el que se incluyó de forma consecutiva a pacientes infectados con VIH, que acudieron a la consulta de Patología y Medicina Bucal de la Clínica Especializada Condesa (CEC) de la Ciudad de México, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), durante un periodo de un año (de enero a diciembre de 2010).

4.2 Sujetos participantes

Se incluyeron consecutivamente a todos los pacientes, mayores de 18 años de 3 centros de referencia para VIH/SIDA de la Ciudad de México (Clínica Especializada Condesa [CEC], Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán [INCMNSZ] y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias [INER]). A los pacientes que presentaron LB-VPH en la mucosa bucal se les pidió su consentimiento informado por escrito, en el caso de que aceptaran la toma de biopsia y/o cepillado citológico. El presente protocolo está basado en los lineamientos incluidos en la Ley General de Salud, y fue aprobado por los Comités Revisores Institucionales (IRB) de cada una de las instituciones participantes, antes de su aplicación.

4.3 Criterios

Criterios de inclusión.

- Individuos con infección por VIH, mayores de 18 años
- Consentimiento para su participación en el estudio
- Posibilidad para autorizar por escrito su consentimiento de participación.

Criterios de exclusión.

- Individuos sin infección por VIH
- Incapacidad para autorizar por escrito su consentimiento de participación.

Criterios de eliminación.

- Muestras que al análisis histopatológico no correspondan con las características definidas para LB-VPH

- Muestras donde no haya suficiente cantidad de ADN viral

4.4 Aspectos éticos

Proceso de obtención del consentimiento informado

A todos los individuos participantes se les proporcionó una carta que incluía el consentimiento informado (Anexo 1), en la que se explican las condiciones en las que se desarrolló el estudio. Se solicitó a cada participante que leyera la carta de consentimiento, se contestaron las dudas que tuvieron respecto al estudio y se pidió que firmaran la carta de consentimiento. Se informó a los pacientes acerca de los riesgos y molestias asociadas con los procedimientos para el desarrollo del protocolo, verbalmente y en la carta de consentimiento. Es importante destacar que se hizo saber a todos los participantes que la negativa en relación a su participación en el estudio no tendría consecuencias negativas en la atención médica u odontológica que recibe en la CEC, INCMNSZ o el INER. La participación de los pacientes fue totalmente voluntaria. El paciente podría suspender su participación en cualquier momento, sin que se afectara su atención institucional.

Se registraron los datos de cada uno de los participantes en una ficha de recolección de datos (Anexo 2). A cada individuo se le aplicó un cuestionario que incluyó variables de importancia para el estudio (edad, género, ocupación, estado civil, escolaridad, lugar de residencia, tabaquismo). Los datos relativos al uso de TARAA, tiempo de administración de TARAA, niveles de CD4+ y ARN-HIV (carga viral) fueron obtenidos del expediente clínico del paciente.

Todos los registros, formas de evaluación y reportes se identificaron por un código para mantener el carácter confidencial del paciente.

4.5 Variables

Las variables a considerar fueron:

Variable dependiente:

- LB-VPH

Variables independientes:

- Conteo de linfocitos CD4+, niveles de carga viral, uso tiempo y tipo de TARAA, categoría de transmisión, género, edad, estado civil, lugar de nacimiento, escolaridad, ocupación y consumo de tabaco.

4.6 Cálculo del tamaño muestral.

De acuerdo con los resultados de un estudio previo realizado en la misma población, en el que durante un periodo de un año, en un grupo de 195 pacientes con VIH, se identificaron 26 pacientes que presentaban LB-VPH, lo cual representa una prevalencia de 13%. Considerando que anualmente se examinan aproximadamente 200 pacientes en la Clínica de Patología y Medicina Bucal de la CEC, el total de individuos que se planeó incluir con LB-VPH ascendió a 25.

4.7 Manejo de los datos.

Los datos de la ficha de recolección de los mismos se codificaron previamente. Una vez que las fichas fueron llenadas completamente, se capturaron los hallazgos en una base de datos. Se utilizó el programa computacional SPSS (v.15) para el análisis de los datos.

4.8 Procedimientos clínicos

En los individuos en los que se identificó clínicamente alguna LB-VPH, se realizó el diagnóstico clínico presuntivo correspondiente (papiloma escamoso, verruga vulgar, hiperplasia epitelial multifocal o condiloma acuminado), de acuerdo a las características clínicas descritas en el apartado 1.2.2. Se utilizó el término "Lesión asociada a Virus del Papiloma Humano" (LB-VPH) cuando la lesión no tenía características clínicas definidas de una u otra entidad.

Se registraron las características clínicas de la lesión (color, textura, apariencia, extensión, tamaño y localización), y fueron fotografiadas. A todos los participantes que dieron su consentimiento, se les realizó la toma de una biopsia de la lesión por medio de sacabocados desechables. A cada muestra se le asignó un número consecutivo conforme se obtuvieron. En aquellos pacientes que no aceptaron la toma de biopsia, o en quienes no contaban con las condiciones clínicas óptimas para realizar el procedimiento quirúrgico (conteos plaquetarios <50 p/mm^3), se les tomó un cepillado citológico de la lesión.

La biopsia fue dividida en dos partes, una sección se utilizó para el estudio histopatológico, la cual fue fijada con formalina al 10% y teñida con hematoxilina-eosina (H-E). Las biopsias

fueron procesadas en el laboratorio de Histopatología de la UAM-X, los estudios histopatológicos se llevaron a cabo por Patólogos bucales del laboratorio de Histopatología de la UAM-X.

La segunda sección del tejido obtenido fue introducida en un tubo cónico con 5 ml de un preservador celular (PreservCyt, Cytyc Co, Marlborough MA, USA) para su análisis molecular. Del mismo modo, en aquellos pacientes en los que no fue posible realizar biopsia, el cepillado citológico se realizó mediante un cepillo cónico desechable estéril, el cual se pasó 3 veces sobre la lesión y se introdujo en un tubo Falcon de 10 ml. que contenía 8 ml de PreservCyt.

4.8.1 Criterios histopatológicos.

Los criterios histológicos utilizados en el diagnóstico de las LB-VPH se basaron en los establecidos previamente[58, 59] y son descritos en el Cuadro 1.

Papiloma escamoso. Histológicamente se presenta como una lesión conformada por múltiples lesiones dactiliformes de epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado con marcada acantosis, en el que se pueden observar coilocitos. Dichas proyecciones epiteliales se apoyan sobre un tallo de tejido fibroconectivo laxo bien vascularizado, la lesión puede presentar escaso infiltrado inflamatorio dispuesto de manera difusa.[59]

Verruga vulgar. Las características histológicas de la verruga vulgar son las de una lesión de estirpe epitelial, cuyo epitelio escamoso estratificado presenta marcada hiperparaqueratosis,

abundantes gránulos de queratohialina y numerosos coilocitos. El tejido conectivo subyacente puede presentar escaso infiltrado inflamatorio de tipo crónico.[35]

Hiperplasia epitelial multifocal. Histológicamente, se presenta como una lesión de estirpe epitelial compuesta por epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado, acantótico, con procesos epiteliales ancho y convergente hacia el centro de la lesión, muchos de los cuales se fusionan entre sí. Se observan abundantes células vacuoladas (coilocitos). Como característica particular, hay presencia de células con degeneración nuclear llamados cuerpos mitosoides.[58]

Condiloma acuminado. Se observa como una lesión de estirpe epitelial con un epitelio escamoso estratificado acantótico dispuesto en proyecciones despuntadas y anchas, con apariencia de criptas llenas de queratina en el tejido conectivo fibrovascular subyacente.[58]

4.9 Procedimientos de laboratorio

El análisis molecular de las muestras se realizó en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

4.9.1 Extracción y purificación del ADN

La extracción del ADN de las muestras se llevó a cabo por medio del Wizard Genomic ADN Purification kit (Promega). Se tomó un fragmento de la muestra, con una hoja de bisturí diferente para cada muestra se cortó el tejido en pequeños fragmentos, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 14,000 rpm, se decantó el Preservcyt, y se dejaron destapados los

tubos durante 12 horas para su correcto secado.

Posteriormente se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

- En un tubo Eppendorff de 1.5 ml se colocó la pastilla obtenida y se le añadieron 300 µl de solución lítica nuclear.
- Se añadió 17.5 µl de proteinasa-K (20 mg/ml) incubándose a 65°C en termomixer durante 5 horas.
- Se colocó a temperatura ambiente hasta que se enfrió la muestra y se le agregó 1.5 µl de solución RNAsa, incubando a 37°C durante 30 minutos.
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 100µl de solución precipitadora de proteínas, agitando vigorosamente y se colocó en hielo durante 5 minutos.
- Se centrifugó 4 minutos a 14,000 rpm. Se removió el sobrenadante y fue transferido a un tubo limpio de 1.5 ml al que se le agregaron previamente 300 µl de isopropanol. Se mezcló suavemente hasta que se vieron las cadenas de ADN.
- Se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm y se retiró el sobrenadante.
- Se agregaron 300 µl de etanol al 70% y se invirtió varias veces el tubo para lavar el ADN, después se centrifugó durante 5 minutos.
- Se aspiró el etanol cuidando de no tocar la pastilla del ADN y se invirtieron los tubos destapados sobre una servilleta limpia hasta que se secaron por completo.
- Se añadió 30 µl de solución rehidratante de ADN y se incubó a 65°C por una hora.
- Finalmente, el ADN obtenido fue almacenado a -20°C en alícuotas de 5 µl.

4.9.2 Cuantificación de ADN viral

La cuantificación del ADN viral se realizó en un equipo Nanodrop por medio de espectrometría de luz, obteniendo valores nanométricos. Se utilizó un programa computacional, donde se analizaron las densidades ópticas (nanómetros), lo cual permitió obtener la cantidad de ADN en cada muestra.

4.9.3 Reacciones de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. La amplificación requiere un par de oligonucleótidos de ADN (fragmentos cortos de ADN sintéticos de aproximadamente 25 pares de bases) complementarios a los extremos de la región que se quiere amplificar. La amplificación se lleva a cabo a través de ciclos repetidos de tres temperaturas diferentes, desnaturalización de la cadena de ADN generalmente a 95ºC, hibridación de los oligonucleótidos al ADN (entre 30ºC a 70ºC) y elongación del ADN con la polimerasa (72ºC), la cual usa al ADN como molde para extender cada hebra a partir del oligonucleótido.

Este proceso se llevó a cabo de manera automatizada mediante un termociclador (Mastercycler® gradient, Eppendorff). En cada una de las reacciones de PCR se incluyeron como controles positivos ADN de las líneas celulares HeLa (positiva para VPH 18) y SiHa (positiva para VPH 16), asimismo se incluyó una mezcla de reacción libre de ADN como

control negativo.

4.9.4 Amplificación del gen β-globina

Para comprobar la calidad del ADN obtenido de las muestras durante la extracción, se hizo análisis de PCR en todas las muestras con oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen β-globina,[60] el cual es un gen constitutivo en las células humanas.

Se utilizó el siguiente par de oligonucleótidos, que amplifican un fragmento de aproximadamente 260-280 pb:

GH20 5' - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC - 3'

PC04 5' - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC - 3'

4.9.5 Amplificación de la región L1 de Papilomavirus

Posteriormente, las muestras fueron amplificadas con los oligonucleótidos universales MY09/MY11,[61] localizados dentro de la región L1 del genoma del VPH, que incluye los nucleótidos 6722 al 7170 del VPH-16, y las regiones correspondientes a otros tipos virales. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento aproximado de 450 pb:

MY09 5' - CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC - 3'

MY11 5' – GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG - 3'

Las condiciones utilizadas para los oligonucleótidos del gen β-globina y del gen L1 (MY09/MY11), se pueden observar en el Cuadro 2. Las condiciones del ciclo para ambos oligonucleótidos se llevaron a cabo como se describe a continuación:

- Pre-calentamiento por 10 min a 94°C
- Seguido por 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 45 seg a 72ºC,
- Extensión final de 7 min a 72°C
- Mantenimiento de 4°C

Las muestras cuyo resultado fue negativo a la amplificación de MY09/MY11 se sometieron a amplificación con los oligonucleótidos universales GP5+/GP6+,[62] los cuales amplifican un fragmento de 150 pb y pueden detectar los tipos virales 6, 11 16, 18, 31, 33 y 32.

GP5+ 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'

GP6+ 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'

Las condiciones utilizadas para el oligonucleótido del gen L1 (GP5+/GP6+) se pueden observar en el Cuadro 3.

Las condiciones del ciclo fueron llevadas a cabo de la siguiente manera:

- Pre-calentamiento por 10 min a 94°C
- Seguido por 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 48°C, 45 seg a 72ºC,
- Extensión final de 7 min a 72°C
- Mantenimiento de 4°C

4.9.6 Reacción de secuenciación

Los productos de PCR que resultaron positivos fueron secuenciados. En un termociclador programable (Mastercycler® gradient, Eppendorff) y utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing(AppliedBiosystems), dichas muestras fueron amplificadas usando uno

de los oligonucleótidos del PCR (GP5' and MY09).

Se procedió a limpiar el ADN contenido en los productos de PCR que resultaron positivos, mediante la reacción de Exonucleasa 1 Fermentas y Fosfatasa alcalina, Fermentas (ExoSap). Las condiciones utilizadas para ExoSap fueron: Sap 2.0 µl, Exo 0.5 µl, ADN (PCR) 5.0 µl.

Las condiciones del ciclo fueron llevadas a cabo de la siguiente manera:

- Pre-calentamiento a 105°C
- Seguido por un ciclo de 15 min a 37ºC, 15 min a 80ºC
- Mantenimiento de 4ºC

Después se marcó un fragmento de 350 pb de doble cadena mediante la reacción de BigDye. Las condiciones utilizadas en la reacción de BigDye fueron: Buffer 5x 2.0 µl, BigDye 2.0 µl, GP5 (0.8 µM/ µl) 2.0 µl, ADN (ExoSap) 4.0 µl.

Las condiciones del ciclo fueron llevadas a cabo de la siguiente manera:

- Pre-calentamiento por 3 min a 94°C,
- Seguido por 25 ciclos de 30 seg a 96°C, 15 seg a 50°C, 4 min a 60°C,
- Mantenimiento de 4°C.

Posteriormente se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

- Se hizo una mezcla con un volumen final de 80 µl consistente en 3 µl de Acetato de Amonio 3M, 62.5 µl de Etanol grado biología molecular y 14.5 µl de H_2O.
- Dicha mezcla se agregó a los tubos de PCR de BigDye, y se agitaron muy suavemente con los dedos

- Los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min.
- Después se centrifugaron durante 20 min a 14,000 rpm. Se aspiró el sobrenadante con pipeta de 200 µl sin tocar la pastilla
- Posteriormente se agregaron 250 µl de Etanol al 70% (frío)
- Se centrifugó durante 10 min. Y se eliminó el sobrenadante con pipeta de secuencia, se dejaron secar toda la noche los tubos destapados cubiertos por una cinta
- Se añadió 20 µl de HiDl (Formamida) y se mezclaron en el vórtex
- Se desnaturalizaron durante 2 min a 96°C e inmediatamente se pasaron al hielo
- Se llevaron los tubos a realizar la secuenciación

El análisis de las secuencias fue realizado por medio del ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzerSystem (AppliedBiosystems). Las secuencias que se obtuvieron en dicho análisis se compararon con la base de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) utilizando el programa BLAST.

4.10 Análisis estadístico.

La descripción de las variables se realizó a través de sus medidas de centralización y dispersión. Con fines descriptivos, las variables continuas se expresaron como medidas aritméticas, medianas y desviaciones estándar, y las variables categóricas como proporciones. La asociación entre la presencia de LB-VPH y las variables consideradas en el estudio fueron analizadas a través de la prueba de Chi^2 o exacta de Fisher a dos colas.

Se construyó un modelo de regresión logística no condicional para la presencia de LB-VPH y la duración de TARAA y para la edad del paciente al momento del examen bucal. Se probaron las posibles interacciones considerando la teoría y se construyeron los valores de la razón de momios para las categorías correspondientes. Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando el valor de $p \leq$ a 0.05.

5. Resultados

5.1 Características demográficas y clínicas

Se incluyeron 329 individuos, 294 (89.4%) hombres, con una mediana de edad de 35 (Q_1-Q_3, 29-41) años. Del total de pacientes, 206 (62.6%) contaban con al menos estudios de nivel medio superior. Por otro lado, de los individuos que tenían trabajo (201/61.1%), la mayoría se dedicaban al comercio (94/28.6%). (Cuadro 4).

Como se puede observar en el Cuadro 5, cerca de la mitad del total de los pacientes consumían tabaco (153/46.5%); por otro lado, la categoría de transmisión más frecuente fue la de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) (276/83.9%). Ciento noventa (57.8%) pacientes eran asintomáticos, mientras que 139 (42.2%) se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad. Más de dos terceras partes (247/75.1%) de los individuos usaban antirretrovirales, con una mediana de uso de 289 (Q_1-Q_3, 83-762) días. El esquema de TARAA más usado incluía 2 ITRAN + 1 ITRNN (148/45%).

Se obtuvo información sobre el conteo de linfocitos CD4+ en 254 (77.2%) pacientes, la mediana de linfocitos CD4+ fue de 300 (150-476) cel/mm^3, más de la mitad (165/50.2%) de los pacientes tenían más de 200 cel/mm^3. Adicionalmente, en 243 (73.9%) individuos se contaba con carga viral (CV), de los cuales 126 (38.3%) se encontraban indetectables al momento del examen bucal.

5.2 Pacientes con LB-VPH

De los 329 pacientes con VIH/SIDA incluidos en el estudio, 34 (10.3%) presentaron LB-VPH, 33 (97.1%) hombres y una (2.9%) mujer. Los pacientes sin LB-VPH fueron más jóvenes (34/28-41) que los que pertenecían al grupo con LB-VPH (40/32-44) (p=0.003). No hubo diferencias estadísticamente significativas en relación al grado de escolaridad (p=0.618) y ocupación (p=0.978) entre los dos grupos, sin embargo cabe señalar que la proporción de individuos que contaban con estudios de al menos nivel medio superior era mayor en el grupo sin LB-VPH (189/64.1%) que en el grupo con LB-VPH (17/50.0%), (Cuadro 4).

Como se describe en el Cuadro 5, no hubo diferencias estadísticamente significativas con relación al consumo de tabaco (p=0.945) y categoría de transmisión (p=0.229) entre ambos grupos. En cuanto al estadio de la enfermedad, la proporción de los pacientes que se encontraban en etapas avanzadas de la enfermedad era mayor en el grupo con LB-VPH (21/61.8%) que en el grupo de pacientes sin LB-VPH (118/40.0%) (p=0.015).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de LB-VPH y el uso de TARAA o el conteo de linfocitos CD4+. Sin embargo, el grupo con LB-VPH mostró un tiempo mayor de uso TARAA que el grupo sin LB-VPH (464 vs. 261 días) (p=0.052). La proporción de pacientes en los que se incluía un IP en su esquema antirretroviral fue significativamente mayor en los pacientes con LB-VPH (11/32.4%) que en el grupo sin lesiones (81/27.5%) (p=0.032). Se encontró una mayor proporción de pacientes indetectables dentro del grupo con LB-VPH (18/52.9%) que en los pacientes no afectados (108/36.6%).

5.3 Características clínicas de LB-VPH

Se tomaron 30 biopsias y 4 cepillados citológicos. El diagnóstico clínico presuntivo más frecuente en los 30 casos de los que se obtuvo biopsia fue LB-VPH (13/43.3%) (Figura 3). Doce (40%) fueron clínicamente diagnosticados como papiloma escamoso (Figuras 4 y 5), 3 (10%) HEM (Figura 6), y 2 verrugas vulgares (6.6%), (Cuadro 6).

En cuanto a las 4 lesiones en donde únicamente se obtuvo cepillado citológico, 1 (25%) fue diagnosticada clínicamente como papiloma escamoso, 2 (50%) como HEM, y 1 (25%) como lesión asociada a VPH (Figura 2).

5.4 Características histopatológicas de LB-VPH

El diagnóstico histopatológico más frecuente fue papiloma escamoso (14/30, 46.6%), seguido por LB-VPH (10/30, 33.3%) y HEM (6/30, 20%). En el Cuadro 6 se puede observar la relación entre el diagnóstico clínico y el histopatológico de las biopsias analizadas. Llama la atención que en 8 (61.5%) de los 13 casos clínicamente diagnosticados como LB-VPH (por falta de criterios clínicos específicos para una lesión en particular) tampoco se tuvieron criterios histopatológicos específicos de alguna de las entidades mencionadas previamente, por lo que fueron definidas histopatológicamente como LB-VPH, (Figura 10).

Por otro lado, 10 de las 12 (83.3%) muestras que clínicamente fueron diagnosticadas como papiloma, correspondieron histopatológicamente a esta entidad (Figura 7), y el 100% de las lesiones clínicas denominadas HEM cumplieron los requisitos histológicos para conservar este diagnóstico (Figuras 8 y 9).

5.5 Análisis molecular de las muestras

5.5.1 Amplificación de oligonucleótidos β-globina y gen L1 de papilomavirus

La mediana de la concentración de ADN obtenida en las muestras después de su extracción fue de 172 ng/µl (Q_1-Q_3,29.4-459.1 ng/µl). Posteriormente se encontró que la totalidad de las muestras resultaron ser positivas a la amplificación del gen β-globina (34/100%), de esta manera se comprobó que la calidad del ADN era adecuado, Figura 11.

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a la amplificación de un fragmento de la región L1 (450 pb) a través de los oligonucleótidos universales MY09/MY11. Los resultados obtenidos se pueden observar en el Anexo 3: veintiún muestras (61.8%) amplificaron el fragmento de 450 pb, confirmándose la presencia de genoma viral y por lo tanto se procedió a realizar la reacción de secuenciación en dichas muestras. Por otro lado, 13 de las muestras (38.2%) fueron negativas para esta amplificación, por lo cual se sometieron a amplificación con los oligonucleótidos universales GP5+/GP6+, obteniendo un resultado positivo, por lo que se procedió a secuenciarlas, Anexo 3.

5.5.2 Reacción de secuenciación

Como se puede observar en el Cuadro 7, de las 34 muestras se obtuvo la secuencia de 23 (67.6%), las 11 (32.4%) muestras restantes no se pudieron secuenciar debido a que en cinco de ellas (14.7%) había infección múltiple, y en seis (17.6%) el ADN sufrió un proceso de degradación después de la amplificación del VPH-ADN.

En las 23 muestras secuenciadas, se encontraron 17 (73.9%) tipos virales de bajo riesgo, y 6 (26.1%) de alto riesgo. De los tipos virales de VPH de bajo riesgo, el tipo 13 se encontró en 13 (56.5%) muestras. Cabe mencionar que el resultado del ferograma obtenido de la secuencia de dos (8.7%) muestras nos sugiere que tenían infección múltiple, en una de ellas se encontraron los tipos 13 y 16, en la otra muestra los tipos 13 y 18. Los tipos 6, 11 y 32 se encontraron en 2 (8.7%) muestras cada uno.

De los tipos virales de alto riesgo, se encontró el 31 y 16 en dos (8.7%) muestras cada uno, y los tipos 18 y 74 en una (4.3%) muestra cada uno. En la Figura 13 pueden observarse ejemplos de las secuencias encontradas.

5.6 Asociación entre diagnóstico definitivo (histopatológico) y tipificación viral

Como se puede observar en el cuadro 8, en las 14 (48.3%) muestras diagnosticadas histológicamente como papiloma escamoso, se encontraron los tipos virales 13 (7/50%), 11 (2/14.3%), 18 (1/7.1%) y 74 (1/7.1%). Cabe señalar que en una (7.1%) de las muestras se encontraron los tipos virales 13 y 18, y que no fue posible secuenciar cuatro (28.6%) muestras por presentar infección múltiple.

En 3 de las 10 muestras diagnosticadas como LB-VPH (30%) se encontró VPH-13; los tipos virales 6 y 31 se encontraron en 2 (20%) muestras cada uno, y los tipos virales 16 y 32 se encontraron en 1 (10%) muestra cada uno. En 2 (20%) de las muestras categorizadas como LB-VPH no fue posible obtener la secuencia viral debido a que el ADN se encontraba degradado.

Por otro lado, de las seis lesiones diagnosticadas como hiperplasia epitelial multifocal, se encontraron los tipos virales 13 (1/16.7%), 16 (1/16.7%) y 32 (1/16.7%); en una muestra (16.7%) no fue posible identificar el tipo viral debido a que el ferograma mostraba infección múltiple. En dos muestras (33.3%) no se obtuvo el resultado de la secuencia debido a que el ADN se encontraba degradado.

De las cuatro muestras obtenidas mediante cepillado citológico, una fue diagnosticada clínicamente como papiloma escamoso (VPH-13) (25%). Una segunda muestra fue diagnosticada clínicamente como LB-VPH y se obtuvo el tipo 13 (25%). En dos (50%) muestras que fueron diagnosticadas clínicamente como HEM, a pesar de que en el análisis molecular preliminar se logró amplificar tanto β-globina como ADN-VPH, no fue posible obtener el tipo viral debido a que el ADN se encontraba degradado.

6. Discusión

En el presente estudio se identificó una prevalencia de 10.3% de LB-VPH en los individuos que acudieron a los centros de referencia para VIH/SIDA, en más de dos terceras partes de las cuales se amplificaron tipos virales de bajo riesgo, y se encontraban significativamente asociadas con un mayor tiempo de uso de TARAA.

Casi el 90% de nuestra población de estudio correspondió a hombres (89.4%) jóvenes (35 años), lo cual es similar a lo informado en las estadísticas de VIH/SIDA en México por CONASIDA,[3] que reporta que el 82% de los casos acumulados de SIDA hasta junio de 2011 pertenecen al género masculino y la mayoría se encuentra entre los 25 y 44 años de edad (65.7%).

En cuanto al nivel educativo, la mayor parte de los individuos (62.6%) contaban con al menos estudios de nivel medio superior; lo cual pudiera contribuir a la adquisición de un mayor entendimiento de su enfermedad y a su vez, tener un buen apego al tratamiento antirretroviral. En un estudio sobre el nivel de educación y la progresión de la enfermedad en una cohorte de 989 pacientes,[63] se observó que los individuos con mayor nivel educativo mostraron un riesgo menor de morir por cualquier causa relacionada con la infección por VIH/SIDA.

Casi la mitad de los pacientes incluidos en el presente estudio (46.5%) fumaban, proporción mayor a la frecuencia reportada por la Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos de México 2009 (GATS),[64] donde se indica que el 15.9% de la población mayor de 15 años es fumadora, y que la mayoría de los fumadores se encuentran entre los 25 y 44 años de edad.

En cuanto a la categoría de transmisión, el 92.2% de los pacientes masculinos eran HSH, proporción mayor a la reportada por CENSIDA, donde se informa que el 56.5% de los casos acumulados de SIDA en hombres al 30 de junio del 2011 pertenecen a dicha categoría de transmisión (44,369 de los 78,534 de los casos acumulados de 15 y más años por vía de transmisión sexual).[3] La diferencia tan marcada de proporciones tal vez pudiera deberse a que nuestra muestra fue tomada de centros de referencia donde se concentra solo una parte de los individuos con VIH/SIDA de la Ciudad de México, mientras que el reporte de CENSIDA incluye información sobre los casos notificados en todo el país.

Más de la mitad (57.8%) de los individuos de este estudio se encontraban asintomáticos y más de dos terceras partes (75.1%) de nuestra población estaban bajo TARAA. De acuerdo con las estadísticas de ONUSIDA, [1] entre el 50% y el 80% de los pacientes con VIH/SIDA en países en vías de desarrollo reciben tratamiento antirretroviral. Cabe mencionar que particularmente en la Ciudad de México, gracias a los programas de salud que se han instaurado en la última década, los pacientes tienen acceso a tratamiento antirretroviral. Sin embargo, en ciertos países de bajos recursos, solo el 37% de la población con VIH/SIDA recibe tratamiento antirretroviral, y la mayoría no incluye TARAA. La meta propuesta por ONUSIDA es que para el año 2015 todos los pacientes infectados por VIH tengan acceso al tratamiento antirretroviral en todo el mundo. [1]

En cuanto al conteo de linfocitos CD4+, solo el 27% de ellos tenía un conteo menor a 200 células/mm^3. Por otro lado, si bien la mayoría de los pacientes se encontraban bajo TARAA, sólo el 37.7% tenían carga viral indetectable, lo cual pudiera ser explicado por el hecho de que muchos de los pacientes incluidos en este estudio se encontraban en las fases iniciales del tratamiento antirretroviral, por lo que una alta proporción no habían alcanzado supresión virológica y/o reconstitución del sistema inmunológico. El esquema utilizado con mayor (72/21.9%) frecuencia por individuos con CV indetectable incluía ITINN, este último dato pudiera compararse con una revisión realizada por Chou y cols.[65] donde contrastando el efecto de esquemas de TARAA a base de IP e ITINN, observaron que los esquemas que incluían ITINN tenían una mayor relación con supresión virológica (OR:1.60/1.31-1.9), que los esquemas que incluían IP.

En nuestra cohorte de estudio encontramos que el 10.3% de los pacientes presentaban LB-VPH, prevalencia mayor que el 2.5% reportado en un trabajo preliminar realizado por el mismo grupo de investigación entre 2004 y 2008,[56] y el 2.6% notificada por King y cols.[45] Frecuencias similares a las reportadas en el presente estudio han sido informadas por Bravo y cols.[66] quienes reportaron una prevalencia de 10.9%, y el 5% informado por Feller y cols.[67] y Kakabadze y cols.[6] En contraste, en otros trabajos la prevalencia ha sido tan baja como 0.6%[69] y 0.5%.[70] Llama la atención que, al comparar los resultados del presente trabajo con los informados en el periodo 2004-2005,[56] observamos un incremento en la frecuencia de LB-VPH (2.5% vs. 10.3%); lo anterior, coincide con lo reportado por diversos autores,[37, 42, 45, 71] quienes han observado un incremento de LB-VPH al paso del tiempo, de la era pre-TARAA a post-TARAA.

La mucosa labial fue el sitio más afectado por LB-VPH en este trabajo (15/42.9%), seguido por la mucosa yugal (7/20%). Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado por Delgado2005 y cols, [52] quienes han informado que la mucosa labial es el sitio más frecuentemente afectado por estas lesiones. En contraste, otros trabajos, como el realizado por Syrjänen y cols.[22] han reportado que la encía es uno de los sitios más afectados por las LB-VPH. El hecho de que la mucosa labial y la encía sean sitios con predilección para el desarrollo de estas lesiones pudiera explicarse debido a que son sitios anatómicos anteriores, y por lo tanto, con mayor susceptibilidad a contagio por contacto directo.

En relación al diagnóstico histopatológico, en nuestro estudio encontramos que en más de la mitad (61.5%) de las lesiones clínicamente diagnosticadas como LB-VPH, no se encontraron criterios histopatológicos que pudieran clasificarlas como alguna lesión específica, manteniendo así el diagnóstico de LB-VPH; en contraste, la mayoría (83.3%) de las lesiones clasificadas como papilomas tuvieron el mismo diagnóstico histopatológico, y todas las lesiones diagnosticadas clínicamente como HEM conservaron su diagnóstico. Si bien se han descrito las características histopatológicas de cada una de las LB-VPH,[58, 59] recientemente se ha sugerido que tanto el papiloma escamoso como la verruga vulgar pueden presentar semejanzas (clínicas e histopatológicas), particularmente en los casos en los cuales el tiempo de evolución sea mayor; por otro lado, la actividad replicativa del VPH también puede producir cambios estructurales afectando las características histopatológicas.[58]

A través de la secuenciación de las muestras obtenidas pudimos identificar que el 73.9% de nuestras muestras correspondieron a VPH de bajo riesgo, siendo el VPH-13 el tipo viral más

frecuente (56.5%), seguido por el VPH-32 (8.7%). En contraste, estudios previos han identificado al VPH-32 como el tipo viral que con mayor frecuencia se encuentra involucrado en LB-VPH en individuos con VIH, reportando frecuencias de 37%. [22, 72]

Por otro lado, el 26.1% de nuestras muestras resultaron positivas a VPH de alto riesgo, similar a lo reportado en estudios previos que encuentran un 26%[73] y 30%[74] de positividad a VPH de alto riesgo en pacientes con VIH; en contraste, un estudio realizado por Steinau y cols.[75] informa una frecuencia de 69.2% para VPH de alto riesgo en raspados de la mucosa bucal.

Desde que se comenzó a utilizar TARAA ha aumentado la sobrevida de los pacientes infectados por VIH y tienen una mejor calidad de vida. Si bien en el presente estudio no se encontraron características que sugieran el inicio de transformación maligna en ninguna de las muestras, al igual que lo reportado en estudios previos[22, 45, 72] debido a que no existen estudios relacionados al comportamiento de LB-VPH con tipos virales de VPH de alto riesgo, es importante dar un seguimiento estrecho a los pacientes en cuyas LB-VPH se obtuvo VPH de alto riesgo, con la finalidad de detectar de manera oportuna desórdenes potencialmente malignos de la mucosa bucal.

Resulta interesante mencionar que en el presente estudio, se encontraron tipos virales diferentes a los clásicamente descritos para LB-VPH específicas en individuos sin VIH/SIDA.[51] En el papiloma escamoso se identificó VPH-11, 13, 18 74, mientras que los tipos virales clásicamente descritos son VPH-6, y 11 y con menor frecuencia VPH-16. En HEM pudimos identificar VPH-13, 16 y 32; si bien, se sabe que los tipos virales relacionados

a esta lesión son el 13 y el 32,[51] llama la atención la identificación de un tipo viral de alto riesgo en esta lesión benigna. Por otro lado, en la lesiones en las cuales el diagnóstico histopatológico fue LB-VPH, se encontraron los tipos VPH-6, 13, 16, 31 y 32, lo cual, de acuerdo a lo informado en estudios previos, nos sugiere que estas lesiones comparten características tanto de papiloma/verruga, como de HEM. El hecho de que hayamos encontrado tipos de VPH diferentes a los descritos para las LB-VPH, pudiera estar relacionado a los cambios que produce la infección por VIH en el sistema inmunológico.

Es importante enfatizar que siete muestras (30.4%) tenían infección múltiple por VPH, las cuales se presentaron en pacientes con un sistema inmunológico debilitado. Nuestro hallazgo es notablemente mayor al 7% de infección múltiple reportada por Cañadas y cols.[73] Se ha sugerido una posible pérdida de respuesta inmunológica ante la presencia del VPH, debido al deterioro causado por la infección de VIH/SIDA, en este sentido se ha reportado que los pacientes con LB-VPH tienen conteos de CD4+ bajos.[45, 49, 66] En nuestro estudio, la mediana de linfocitos CD4+ en pacientes con LB-VPH fue de 261 células/mm^3, los pacientes presentaban un moderado estado inmunológico, lo cual pudiera estar relacionado con el desarrollo de LB-VPH.

Uno de los principales hallazgos de este estudio fue que el tiempo de administración de TARAA se asoció significativamente con la presencia de LB-VPH (p=0.052). De manera similar Feller y cols.[67] reportaron que el 23% de los pacientes con LB-VPH se encontraban recibiendo TARAA. Asimismo, Greenspan y cols.[41] encontraron que cuando los pacientes utilizaban TARAA, la prevalencia era mayor (23%), que cuando su esquema no incluía IP o

ITRNN (15%).

Igualmente, otros autores han observado un incremento en las lesiones bucales asociadas con VPH en los individuos con VIH.[37, 71] Las razones del incremento en la prevalencia de LB-VPH en pacientes con VIH no son claras, sin embargo, existen varias explicaciones sobre el incremento de LB-VPH, entre las cuales se encuentra la posible relación temporal entre la presencia de LB-VPH y el tiempo de uso de TARAA.[37, 41] Sin embargo, estudios previos,[45, 76] no han encontrado una asociación entre la presencia de LB-VPH o infección por VPH y el tiempo de uso de TARAA.

Si bien el VIH no tiene afinidad por células epiteliales, y el ciclo viral del VPH está restringido a epitelios, y en individuos con VIH a mucosas,[49] la interacción entre ambos virus pudiera provocar una respuesta inmunológica atenuada, así como la presencia de inestabilidad cromosómica. Debido a que VPH infecta epitelios, hay un número bajo de linfocitos específicos sensibilizados contra VPH en circulación sanguínea, por lo tanto la respuesta inmunológica específica para VPH se vuelve vulnerable ante los efectos de la infección por VIH. Asimismo parece ser que la inmunidad específica a VPH no llega a recuperarse en su totalidad después de la reconstitución inmunológica conseguida por TARAA, lo cual pudiera explicar que no se observa disminución de las LB-VPH con el uso de TARAA.[49] Por otro lado, la inestabilidad inmunológica es causada por las proteínas virales E6 y E7, asociado a una disminución en la función de la proteína viral E2.[49]

Adicionalmente, si consideramos que en nuestro estudio los pacientes con LB-VPH mostraron una edad significativamente mayor que la del grupo sin LB-VPH, además de que un mayor de tiempo de uso de TARAA pudiera significar que los pacientes afectados tienen un mayor tiempo de infección por VIH, se podría considerar que la combinación de ambos factores influyera en que el sistema inmunológico no fuera capaz de responder adecuadamente a la infección por VPH.

Algunos autores[22, 45] han propuesto que el aumento en la frecuencia de LB-VPH pudiera asociarse o formar parte de un proceso de reconstitución inmunológica después del inicio de TARAA. La presencia de LB-VPH se ha asociado con una disminución $\geq$1 log en los 6 meses previos al diagnóstico de LB-VPH, lo cual sugiere que pudieran estar relacionadas con la reconstitución inmunológica que se presenta en los pacientes después de iniciar el esquema de tratamiento.[45] En contraste, otros autores[37, 77] no han encontrado relación entre el desarrollo de LB-VPH y la reconstitución inmunológica. Lilly y cols.[77] realizaron estudios de inmunohistoquímica en muestras de LB-VPH para detectar CD8+, sin encontrar algún tipo de reacción inmunológica relacionada a la patogénesis de las lesiones. Debido a la discrepancia sobre la posible relación entre el desarrollo de LB-VPH y el proceso de reconstitución inmunológica en pacientes infectados por VIH, es necesario realizar más estudios de seguimiento, que nos permitan determinar el mecanismo por el cual se desarrollan estas lesiones.

Por otro lado, diversos trabajos han descrito los mecanismos por los cuales interactúan el VIH y el VPH, se ha encontrado evidencia de la interacción entre el VPH y las proteínas Tat, Rev,

Vpr del VIH.[22] En algunos estudios[49, 79, 80] se ha observado que la Tat 1, secretada por células circulantes y captada por los queratinocitos, incrementa la expresión de los oncogenes virales del VPH (E6 y E7) y activa la región larga de control.[49, 78] Por otro lado, la expresión de la proteína Rev estimula la expresión de la proteína L1 del VPH; y la proteína R que es codificada por el gen Vpr, detiene el ciclo celular de células cancerígenas en G2, a través de la proteína E6 del VPH.[81]

Finalmente, los mecanismos epigenéticos, particularmente la metilación de regiones promotoras, pudieran afectar la expresión génica y favorecer la persistencia de la infección por VPH, tales como la metilación de genes promotores provocando disminución en la regulación y expresión de estos genes. Sin embargo, aún no se ha determinado si la metilación viral ocurre con mayor frecuencia en lesiones asociadas a VPH en individuos con VIH que en la población sin la infección.[49]

Una de las fortalezas de este trabajo es que se identificó la prevalencia de LB-VPH en la cohorte estudiada, por otro lado se encontró asociación entre la presencia de LB-VPH y el tiempo de uso de TARAA, asimismo se determinaron los tipos específicos involucrados en el desarrollo de las LB-VPH identificadas.

Dentro de las limitantes del presente estudio está el hecho de que en el 17.6% de las muestras no fue posible realizar la secuenciación, debido a que el ADN se degradó después de la primera amplificación. Por otro lado, en cinco muestras, el ferograma mostró infección múltiple, y no fue posible determinar los diferentes tipos virales debido a que era necesario

realizar estudios moleculares que no estaban incluidos en el diseño del estudio.

En conclusión, a través del presente trabajo pudimos determinar la prevalencia de LB-VPH en tres centros de referencia para VIH/SIDA de la Ciudad de México, así como los tipos virales específicos relacionados con las diferentes LB-VPH encontradas. Es necesaria la realización de nuevos estudios donde se incluya un mayor número de muestras, así como el seguimiento del paciente, con el fin de determinar si a pesar de que se encuentran involucrados tipos de alto riesgo, no se produce transformación maligna con el paso del tiempo.

7. Referencias

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) Report on the global AIDS epidemic: Executive summary 2010. WHO Library Cataloguing-in-PublicationDatadisponiblem en:

http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_em.pdf.

Página consultada el 12 de octubre de 2011.

2. Depaola L G, Human immunodeficiency virus disease: natural history and management. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod 2000;90:266-70

3. Casos de SIDA registrados por año de notificación y por año de diagnóstico, junio de 2011. Disponible en: http://www.censida.salud.gob.mx/interior/panorama.html. Página consultada el 25 de septiembre de 2011.

4. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. Retrovirol 2010;7:54

5. Kamp C. Understanding the HIV coreceptor switch from a dynamical perspective. BMC Evolutionary Biology 2009; 9:27

6. Salazar-Gonzalez JF y cols. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. J Exp Med 2009; 8(6):1273-89

7. Hoffman C. The epidemiology of HIV correceptor tropism.Eur J Med Res 2007;15(9):385-90

8. Zhou J, y cols. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. Nucleic Acids Res 2009; 37(9):3094-3109

9. Schneider E, Whitmore S, Glynn MK, Dominguez K, Mitsh A, McKenna MT. Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged <18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to <13 Years — United States, 2008. MMWR 2008; 57 (No. RR-10):1-12.

10. Centro Nacional para la prevención y Control del VIH/SIDA CENSIDA: Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH/SIDA. México 2010.Disponible en: http://www.salud.gob.mx/conasida

11. Thompson MA.Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. JAMA 2010;304(3):321-33.

12. Yeni G P, Hammer S M, Hirsch M S, Saag M S, Schechter M, Carpenter C.C, y cols.. Treatment for adult HIV infection. Recommendations of the international AIDS society-USA panel.JAMA2004;292:251-265.

13. Stier E. Human Papillomavirus Related Diseases in HIV-infected Individuals. Curr Opin Oncol. 2008; 20(5): 541–546.

14. Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. Head Neck 2002; 24(9):841-9

15. Chow LT, Broker TL, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia.Authors J Compil 2010;118(6-7):422-49

16. Martini S, y cols.. HPV oral infection. Case report of an HIV-positive Nigerian sex worker.Le Infezioni in Medicina 2007; 2: 115-11

17. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zurHausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004;324(1):17-27.

18. Bernard HU, Calleja-Macías IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. Int J Cancer 2006;118(5):1071-6.

19. Esteban-Rodríguez M. Un Nobel esperado: descubrimiento de los agentes causales del SIDA y cáncer cervical. An. R. Acad. Nac. Farm., 2009; 75 (1): 77-98

20. Esquenazi D; FilhoIB; Carvalho MGC; Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR.Braz J Otorhinolaringol 2010;76(1):78-84

29. Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. Semin Cancer Biol 2004;14,453 - 471.

21. Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: update review. Head and Neck Oncol 2009;1:22

22. Syrjänen S. Human Papillomavirus Infection and Its Association with HIV.Adv Dent Res. 2011;23(1):84-9.

23. Bernard J. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J ClinVirol 2005;32,1-6.

24. Prétet JL, Charlot JF, Mougin C. Virological and carcinogenic aspects of HPV. Bull AcadNatl Med. 2007;191(3):611-23

25. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. NHI-PA 2006;11:2286-2302

26. Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM.Role of HeparanSulfate in Attachment to and Infection of the Murine Female Genital Tract by Human Papillomavirus. J Virol. 2009; 83(5): 2067–2074.

27. Szentirmay Z, et al. Human papillomavirus in head and neck cancer: molecular biology and clinicopathological correlations. Cancer Metastasis Rev 2005;24(1):19-34.

28. You J. Papillomavirus interaction with celular chromatin. BiochimBiopsysActa. 2009; 26. (Epub ahead of print)

29. Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. SeminCancerBiol 2004;14,453 - 471.

30. Horvath CAV, Renoux VM, Delvennes PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. Virol J 2010;7-11

31. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Shiller JT, day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. PNAS 2009;106(48):20458-63.

32. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia.MicrobiolMolBiol Rev. 2004;68(2):362-72.

33. Horvathc, Boulet G, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. J Virol 2010;7:7-11

34. Hodgson TA, Greenspan D, Greenspan JS. Oral lesions of HIV disease and HAART in industrialized countries.Adv Dent Res 2006;19:57-62.

35. Shiboski. The Oral HIV/AIDS Research Alliance: updated case definitions of oral disease endpoints. J Oral Pathol Med 2009; 38: 481–488.

36. Richter KL, van Rensburg EJ, van Heerden WF, Boy SC. Human papilloma virus types in the oral and cervical mucosa of HIV-positive South African women prior to antiretroviral therapy. J Oral Pathol Med 2008;37(9):555-9.

37. Nokta M. Oral manifestation associated with HIV infection. Urrent HIV/AIDS Reports 2008;5:5-1

38. Ramírez-Amador V, Nittayananta W, Magalhães M, Flint SR, Peters BS, Tappuni AR. Clinical Markers of Immunodeficiency and Mechanism of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome and Highly Active Antiretroviral Therapy on HIV: Workshop 3A. Adv Dent Res 2011 Apr;23(1):165-71.

39. Palefsky J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV.CurrOpin HIV AIDS. 2009; 4(1): 52–56.

40. Giuliani M y cols.. Oral lesions in HIV and HCV co-infected individuals in HAART era. J Oral Pathol Med 2008;37:468-74.

41. Greenspan D, Canchola A, MacPhail L, Cheikh B, Greenspan JS. Effect of highly active antiretroviral therapy on frecuency of oral warts. The Lancet 2001;5:1411-2

42. Cameron JE, Mercante D, O'Brien M, Gaffga AM, Leuigh JE, Fidel PL Jr, Hagensee Me. The impact of highly active antiretroviral therapy and immunodeficiency on human papillomavirus infection of the oral cavity of human immunodeficiency virus-seropositive adults. Sex Transm Dis 2005;32:703-709.

43. Greenspan JS, Greenspan D.The epidemiology of the oral lesions of HIV infection in the developed world. Oral Dis 2002;8:34-39.

44. Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, y cols.. Incidence of oral lesions in HIV-1-infected women: reduction with HAART. J Dent Res 2004;83:145-150

45. King MD, Reznik DA, O'Daniels CM, Larsen NM, Ostrholt D, Blumberg HM. Human Papillomavirus-associated oral warts among human immunodeficiency virus-seropositive

patients in the era of highly active antiretroviral therapy: an emergency infection. Clin Infect Dis 2002;34:641-648.

46. Hille JJ, Webster-Cyriaque J, Palefski JM, Raab-Traub N. Mechanisms of expression of HHV8, EBV and HPV in selected HIV-associated oral lesions. Oral Dis 2002;8:161-168.

47. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, y cols.. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) positive and high risk HIV-negative women. J Natl Cancer Inst 1999;91:226-236.

48. Fakhry C, D'Souza G, Sugar E, Weber K, Goshu E, Minkoff H, Wright R, Seaberg E, Gillison M. Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. J ClinMicrobiol 2006;44:4479-4485.

49. Palefsky J. Biology of HPV in HIV infection. Adv Dent Res 2006;19:99-10

50. Prashant PJ, Prashant VS, Rajiv SD. Squamous Papilloma: Case Report and Review of Literature. Int J Oral Sci 2010;2(4):222-5.

51. Syrjänen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. Med Microbiol Immunol 2003;192:123-8.

52. Delgado Y, Torrelo A, Colmenero I y Zambrano A. Hiperplasia epitelial focal. Actas Dermosifiliogr 2005;96(10):697-9.

53. Falaki F, Amir C M, Pakfetrat A, Delavarian Z, Mozaffari P M, Pazooki N. Detection of human papilloma virus DNA in seven cases of focal epithelial hyperplasia in Iran. J Oral Pathol Med 2009; 38: 773–776

54. Rimkevičius A, Pūrienė A, Gaigalas M.Condyloma acuminatum: some aspects. Act Med Lit 2011;18(2):43-6.

55. Galvao CT, Bussoloti FI. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. Rev Bras Otorrinolaringol 2006;72(2):272-82.

56. Anaya-Saavedra y cols. 6ª WorlWorksh Oral Healt Dis AIDS 2009

57. Ramírez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Sierra-Madero J, Anaya-Saavedra G, González-Ramírez I, Ponce-de-León S. The changing clinical spectrum of human immunodeficiency virus (HIV)-related oral lesions in 1,000 consecutive patients.Atwelve-year study in a referral center in Mexico. Medicine 2003;82:39-50.

58. Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO Classification of Tumours, Volume 9, IARC WHO Classification of Tumours, No 9. ISBN-13 9789283224174, 2005; 430 p.5

59. Abbey LM, Page DG, Sawyer DR. The clinical and histopathologic features of a series of 464 oral squamous cell papillomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980;49(5):419-28.

60. Schon EA, Cleary ML, Haynes JR, Lingrel JB. Structure and evolution of goat gamma-, beta C- and beta A-globin genes: three developmentally regulated genes contain inserted elements. Cell. 1981;27(2):359-69.

61. Manos MM., Ting Y., Wrigth DK., Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM. Use or polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. Cancer cells 1989;7:209-214

62. Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ and Snidjers PJ. The use of general primers GP5 and GP5 elongated at their 3´ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J. Gen. Virol. 1995;76:1057-1062

63. Monge S, et al. Educational level and HIV disease progression before and after the introduction of HAART: a cohort study in 989 HIV seroconverters in Spain. Sex Transm Infect 2011; Oct 3. In press.

64. Comisión Nacional contra las Adicciones: Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos de México 2009 (GATS). Disponible en: http://www.conadic.gob.mx/

Página consultada el 10 de diciembre de 2011.

65. Chou R, Huffman LH, Korthuis PT. Initial higly-active antiretroviral therapy with a protease inhibitor versus a non- nucleoside reverse transcriptase inhibitor: discrepancies between direct and indirect meta-analyses. Lancet 2006;368(9546):1503-15.

66. Bravo MI, Correnti M, Escalona L, Perrone M, Brito A, Tovar V, Rivera H. Prevalencia de lesiones bucales en pacientes VIH +, relación con contaje de células CD4+ y carga viral en una población Venezolana. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:33-9.

67. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Marnewick JC, Meyerov R, Lemmer J. HPV-associated oral warts. SADJ 2011;66(2)82-5.

68. Kakabadze T, Rukhadze N, Mshvidobadze K, Lomtadze M, Kandelaki G. Oral lesions in HIV-positive patients in Georgia. GregMed News, 2008(165):60-5.

69. Loureço AG, Motta AC, Figueiredo LT, Machado AA, Komesu MC. Oral lesions associated with HIV infection before and durin antiretroviral therapy era in Ribeirao Preto, Brazil. J Oral Science 2011;53(3):379-85.

70. Ortega KL, Vale DA, Magalhaes. Impact of PI and NNRTI HAART-based therapy on oral lesions of Brazilian HIV-infected patients.J Oral Pathol Med 2009;38:489-94.

71. Casariego Z, Fonio S, Micinquevich S. Lesiones estomatológicas en pacientes VIH-1 reactivos: comparación de proporción en dos poblaciones independientes. Av Odontoestomatol 2006;22(4):217-22.

72. Cameron JE, Hagensee ME. Oral HPV complications in HIV- infected patients. Curr HIV/AIDS Rep 5:126-31.

73. Cañadas MP, et al. Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a hig-risk population. J Clin Microbiol 2004;42:1330-2.

74. Sirera G, et al. High prevalence of human papillomavirus infection in the anus, penis and mouth in HIV-positive men. AIDS 2006;20(8):1201-4.

75. Steinau M, et al. Oral sampling and human papillomavirus genotyping in HIV-infected patients. J Oral Pathol Med 2011;9:1-4.

76. Amornthatree K, Sriplung H, Mitarnun W, Nittayananta W. Impacts of HIV infection and long-term use of antiretroviral therapy on the prevalence of oral human papillomavirus type 16. Oral Pathol Med 2011;10:1-6.

77. Lilly EA, et al. Lack of evidence for local immune activity in oral hairy leukoplakia and oral wart lesions. Oral Mocrobiol Immunol 2005;20(3):154-62.

78. Kim RH, Yochim JM, Kang MK, Shin K, Christensen R, Park N. HIV-1 Tat enhances replicative potential of human oral keratinocytes harboring HPV-16 genome. Int J Oncol 2008;33:777-82.

79. Vernon SD, Hart CE; Reeves WC y cols.. The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus 16 transcription. Virus Res 1993;27:133-1

80. Fanales-Belasio, y cols.. Asymptomatic Stage of Infection Appears Prevalent in the Adaptive Immune Response That to Induce a Predominant Th1-TypeHIV-1 Tat Addresses Dendritic Cells. J. Immunol. 2009;182;2888-2897

81. Toy EP, Rodriguez-Rodriguez L, McCance D, Ludlow J, Planelles V. Obstet Gynecol 2000;95:141-6.

C U A D R O S

Cuadro 1. Criterios histológicos utilizados para el diagnóstico histopatológico de las LB- VPH (Barnes 2005, Abbey1980).

	LB-VPH			
Criterios histológicos	Papiloma escamoso	Verruga vulgar	Condiloma acuminado	HEF
Proyecciones digitiformes	***	***	-	-
Tallo de tejido conectivo fibrovascular	**	**	***	-
Apariencia de criptas llenas de queratina	-	-	***	-
Epitelio acantótico con proyecciones superficiales papilares marcadamente queratóticas	-	-	**	***
Hiperplasia basilar	*	-	-	-
Epitelio escamoso estratificado hiperqueratótico	*	***	*	-
Epitelio con patrón de maduración normal	**	*	**	-
Estrato granular prominente con abundantes gránulos de queratohialina	**	***	-	-
Procesos papilares elongados, dirigidos hacia el centro, con "apariencia de copa"	-	**	-	***
Figuras mitosoides	-	-	-	***
Coilocitos	*	***	***	***
Inclusiones virales intranucleares eosinofílicas en el estrato granular	*	***	-	-

Cuadro 2. Condiciones utilizadas para cada juego de oligonucleótidos (gen β-globina, Gen L1).

Amplificación del gen β-globina (GH20/PCO4)		Amplificación del gen L1 (MY09/MY11)	
Buffer 10x	3.0 µl	Buffer 10x	3.0 µl
$MgCl_2$ (3mM)	3.6 µl	$MgCl_2$ (3.5 mM)	4.8 µl
β-globina (PCO4)	0.6 µl	MY09	0.6 µl
β-globina (GH_2O)	0.6 µl	MY11	0.6 µl
dNTP	3.0 µl	dNTP	3.0 µl
Taq	0.2 µl	Taq	0.2 µl
H_2O	14.0 µl	H_2O	12.8 µl

Cuadro 3. Condiciones utilizadas para oligonucleótido GP5+/GP6+

Amplificación del gen L1 (GP5+/GP6+)	
Buffer 10x	3.0 µl
$MgCl_2$ (3mM)	3.6 µl
GP5	0.6 µl
GP6	0.6 µl
DNTP	3.0 µl
Taq	0.2 µl
H_2O	14.0 µl

Cuadro 4. Características demográficas de individuos infectados por VIH con LB-VPH y sin LB-VPH

	Con LB-VPH (n=34)		Sin LB-VPH (n=295)		Total (n=329)		P
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Género							
Femenino	1	(2.9)	34	(11.5)	35	(10.6)	0.124[a]
Masculino	33	(97.1)	261	(88.5)	294	(89.4)	
Edad (años) (Md, Q_1-Q_3)	40 (32 - 44)		34 (28-41)		35 (29 - 41)		0.003[b]
Estado civil							
Casado	1	(2.9)	60	(20.3)	61	(18.5)	0.010[a]
No casado	33	(97.1)	235	(79.7)	268	(81.5)	
Lugar de nacimiento							
Distrito Federal	21	(61.8)	201	(68.1)	222	(67.5)	0.000[a]
Provincia	13	(38.2)	94	(31.9)	107	(32.5)	
Escolaridad							
Analfabeta	0	(0.0)	1	(0.3)	1	(0.3)	
Primaria	6	(17.6)	32	(10.8)	38	(11.6)	
Secundaria	11	(32.4)	73	(24.7)	84	(25.5)	0.618[a]
Preparatoria	11	(32.4)	111	(37.6)	122	(37.1)	
Licenciatura	6	(17.6)	72	(24.4)	78	(23.7)	
Posgrado	0	(0.0)	6	(2.0)	6	(1.8)	
Ocupación							
Desempleado	14	(41.2)	114	(38.6)	128	(38.9)	
Profesionista	3	(8.8)	32	(10.8)	35	(10.6)	
Técnico de nivel medio	3	(8.8)	23	(7.8)	26	(7.9)	0.978[a]
Empleado de oficina	3	(8.8)	30	(10.2)	33	(10.0)	
Trabajadores vendedores	10	(29.4)	84	(28.5)	94	(28.6)	
Agricultores, operarios y artesanos	1	(2.9)	12	(4.1)	13	(4.0)	

Md= Mediana, Q_1-Q_3= Intervalo intercuartilar, [a]X^2, [b]U-Mann-Whitney

Cuadro 5. Características clínicas de individuos infectados por VIH, con LB-VPH y sin LB-VPH

	Con LB-VPH (n=34)		Sin LB-VPH (n=295)		Total (n=329)		P
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	
Consumo de tabaco							
Sí	16	(47.1)	137	(46.4)	153	(46.5)	0.945[a]
No	18	(52.9)	158	(53.6)	176	(53.4)	
Categoría de transmisión							
HSH	32	(94.1)	244	(82.7)	276	(83.9)	0.229 [a]
Heterosexual	2	(5.9)	50	(16.9)	52	(15.8)	
Vía sanguínea	0	(0.0)	1	(0.3)	1	(0.3)	
Estadio CDC							
SIDA	21	(61.8)	118	(40.0)	139	(42.2)	0.015[a]
Asintomático	13	(38.2)	177	(60.0)	190	(57.8)	
TARAA							
Sí	29	(85.3)	218	(73.9)	247	(75.1)	0.146[a]
No	5	(14.7)	77	(26.1)	82	(24.9)	
Tipos de TARAA							
2 ITRAN + 1 IP	11	(32.4)	81	(27.5)	92	(28.0)	
2 ITRAN + 1 ITRNN	15	(44.1)	133	(45.0)	148	(45.0)	0.032[a]
3 ITRAN	3	(8.8)	4	(1.4)	7	(2.1)	
Días de TARAA (Md, Q_1-Q_3)	464 (179 - 950)		261 (73 - 749)		289 (83 - 762)		0.052[b]
CD4+ (Md, Q_1-Q_3)	261 (195 - 484)		305 (136 - 475)		300 (150 - 476)		0.587[b]
CD4+ (células/mm^3)n= 254							
≤ 200	9	(26.5)	80	(27.1)	89	(27.1)	
201 - 499	17	(50.0)	95	(32.2)	112	(34.0)	0.531[a]
≥ 500	8	(23.5)	45	(15.3)	53	(16.1)	
Carga viral (copias/ml)							
< 399	26	76.5	131	44.4	157	47.7	0.119[a]
≤ 400	8	23.5	78	26.4	86	26.1	

Md= Mediana, Q_1-Q_3= Intervalo intercuartilar , [a]X^2, [b]U-Mann-Whitney

Cuadro 6. Relación entre los diagnósticos clínicos presuntivos y el diagnóstico histopatológico en las 30 muestras en las que se obtuvo biopsia.

Diagnóstico clínico presuntivo	**Diagnóstico histopatológico**					
	Papiloma		LB-VPH		HEM	
	N	(%)	n	(%)	n	(%)
LB-VPH (13)	4	(30.8)	8	(61.5)	1	(7.7)
Papiloma (12)	10	(83.3)	1	(8.3)	1	(8.3)
HEM (3)	---	---	---	---	3	(100)
Verruga vulgar (2)	---	---	1	(50.0)	1	(50.0)

Cuadro 7**.** Análisis molecular de las 23 muestras en las que se realizó la reacción de secuenciación

	n = 23	
	n	(%)
Tipos de VPH encontrados		
VPH 13*	13	(56.5)
VPH 6	2	(8.7)
VPH 11	2	(8.7)
VPH 16	1	(4.3)
VPH 31	2	(8.7)
VPH 32	2	(8.7)
VPH 74	1	(4.3)

*Una muestra tenía VPH 16, y otra muestra tenía VPH 18.

Cuadro 8. Relación entre tipos de VPH y diagnóstico histopatológico

	Papiloma[a] n= 14		**L asociada a VPH[b] n= 10**		**HEM n= 6**	
	N	**(%)**	**n**	**(%)**	**n**	**(%)**
VPH 13	7	50.0	3	30.0	1	16.7
VPH 6	-	-	2	20.0	-	-
VPH 11	2	14.3	-	-	-	-
VPH 16	-	-	1	10.0	1	16.7
VPH 18	1	3.3	-	-	-	-
VPH 31	-	-	2	20.0	-	-
VPH 32	-	-	1	10.0	1	16.7
VPH 74	1	7.1	-	-	-	-

[a]En una muestra se encontraron los tipos virales 13 y 18, [b]En una muestra se encontraron los tipos virales 13 y 16.

F I G U R A S

Figura 2. Características clínicas de lesión asociada a VPH. Pápula en paladar duro a nivel de incisivos superiores izquierdos, de color igual a la mucosa adyacente.

Figura 3. Características clínicas de lesión asociada a VPH. Nódulo en mucosa de labio superior de color blanquecino, con base pediculada y superficie lisa.

Figura 4. Características clínicas de papiloma escamoso. Múltiples lesiones exofíticas con base sésil y superficie multilobulada, en mucosa bucal.

Figura 5. Características clínicas de papiloma escamoso. Múltiples lesiones exofíticas con base pediculada y proyecciones digitiformes, en paladar duro.

Figura 6. Características clínicas de hiperplasia epitelial multifocal. Múltiples pápulas coalescentes en mucosa labial inferior.

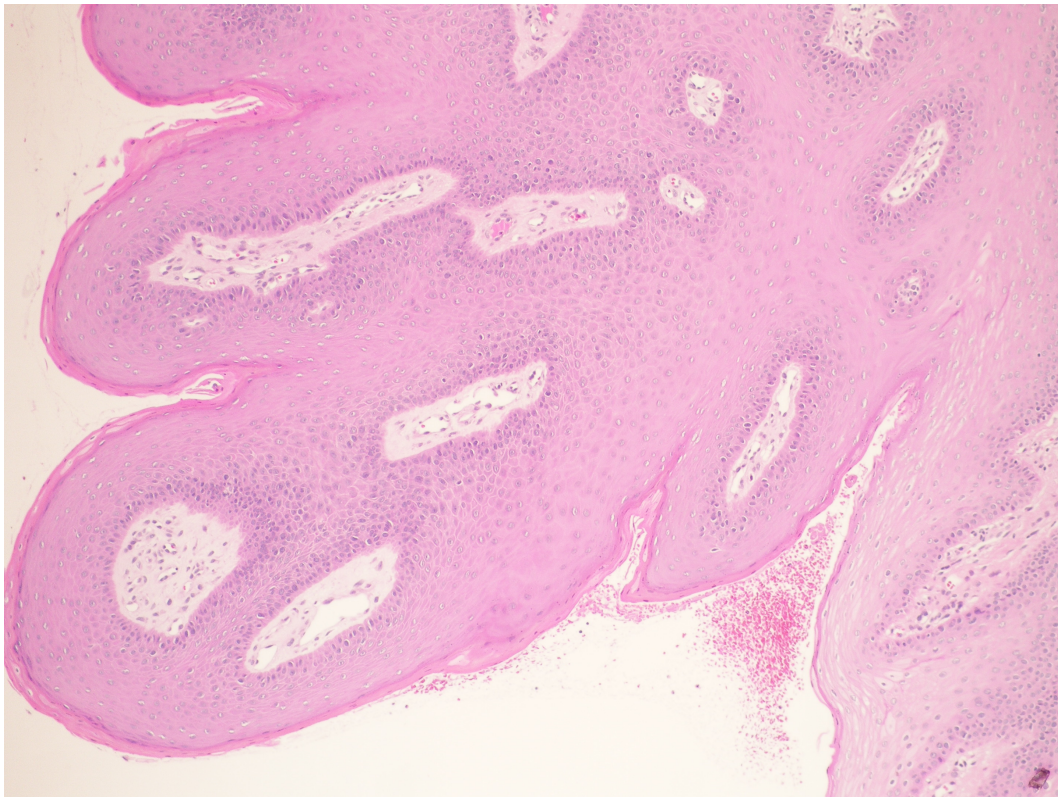


Figura 7. Características histopatológicas de papiloma escamoso. lesión conformada por epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado dispuesto en proyecciones digitiformes, con hiperplasia basilar, patrón normal de maduración y escasos coilocitos, bajo el epitelio se encuentra tejido fibroconectivo vascularizado (H&E 10x).

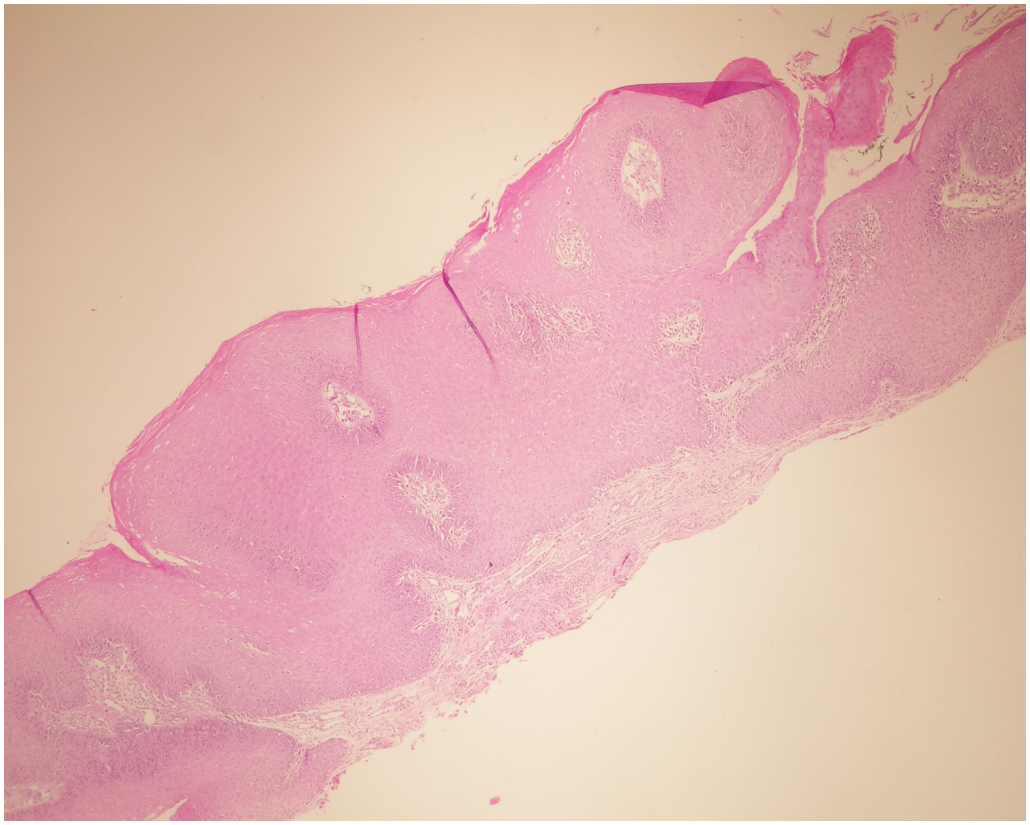


Figura 8. Características histopatológicas de hiperplasia epitelial multifocal. El epitelio presenta acantosis con procesos epiteliales elongados que confluyen entre sí (H&E 10x).

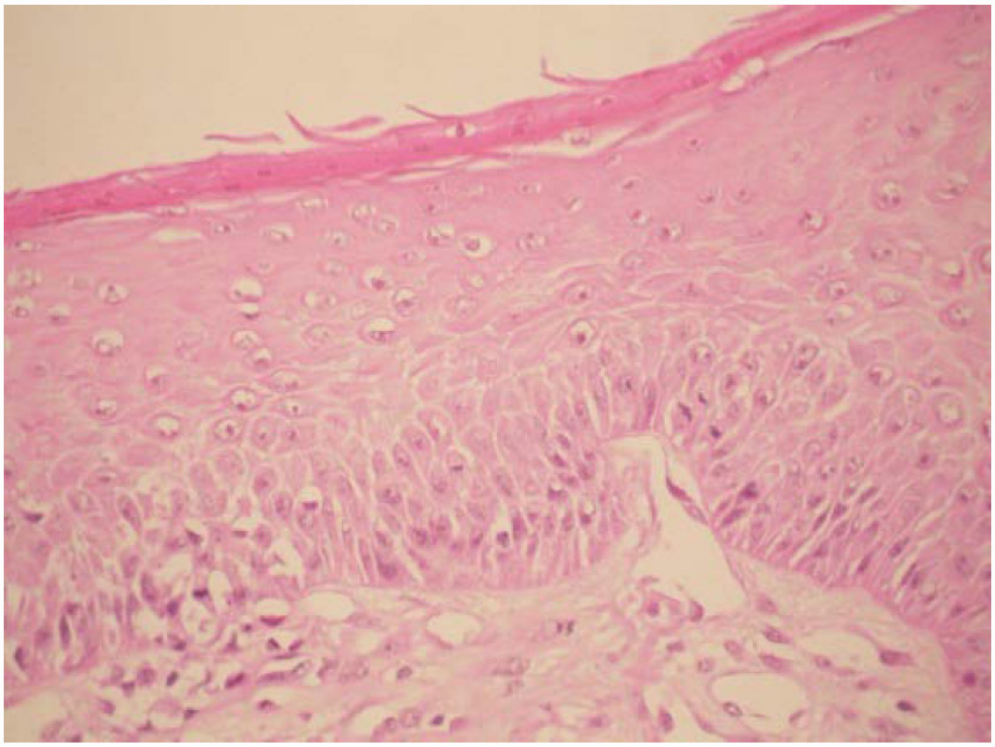


Figura 9. Características histopatológicas de hiperplasia epitelial multifocal. El epitelio presenta acantosis y numerosos coilocitos (H&E 40x).

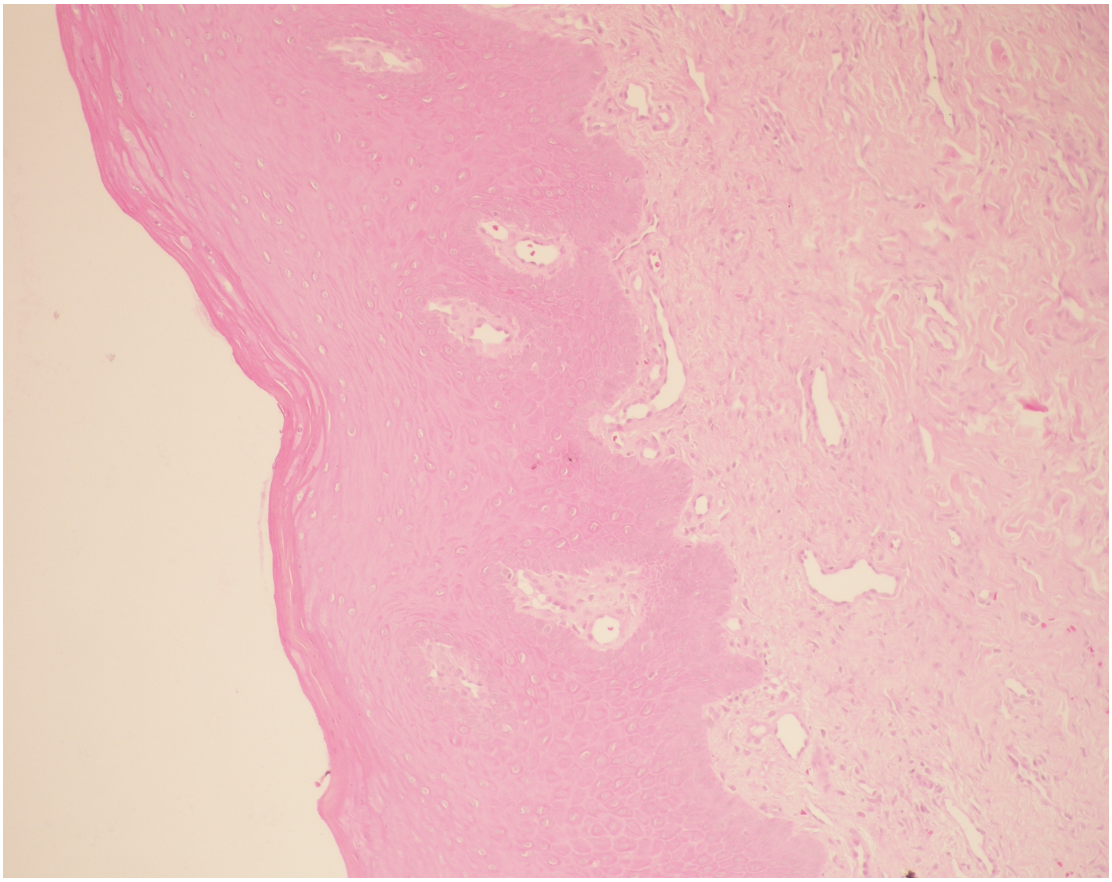


Figura 10. Características histopatológicas de lesión asociada a VPH. El epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado presenta acantosis y confluencia de procesos epiteliales, sin embargo no se observan coilocitos ni figuras mitosoides (H&E 10x).

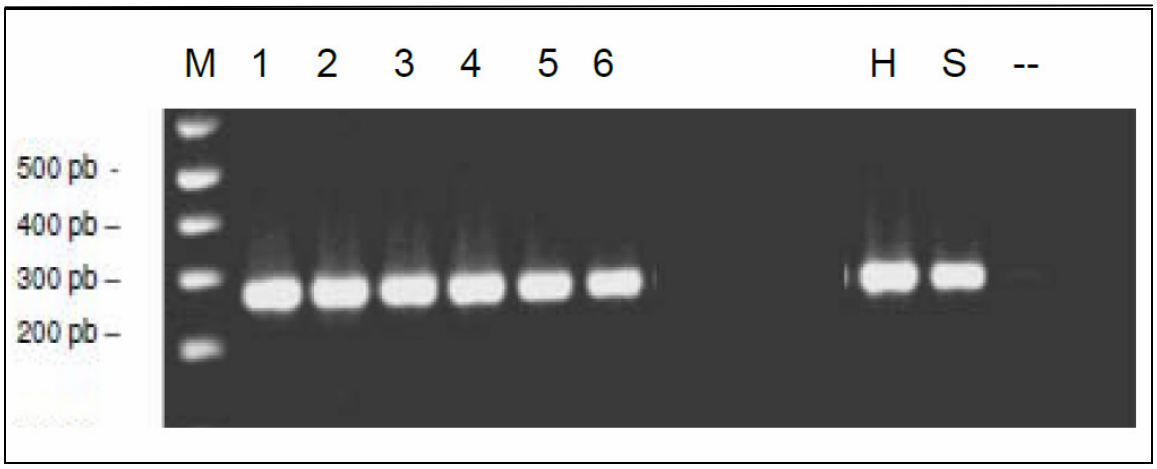


Fig. 11 Figura representativa de amplificación del gen β-globina, 260-280 pb. M: marcador de peso molecular. Como controles positivos se utilizó ADN de la línea celular HeLa (H) y SiHa (S). Como control negativo se utilizó la mezcla de PCR sin ADN (--). La calidad del ADN obtenido es adecuado como puede observarse por la amplificación del gen en las seis muestras analizadas en el gel (1-6).

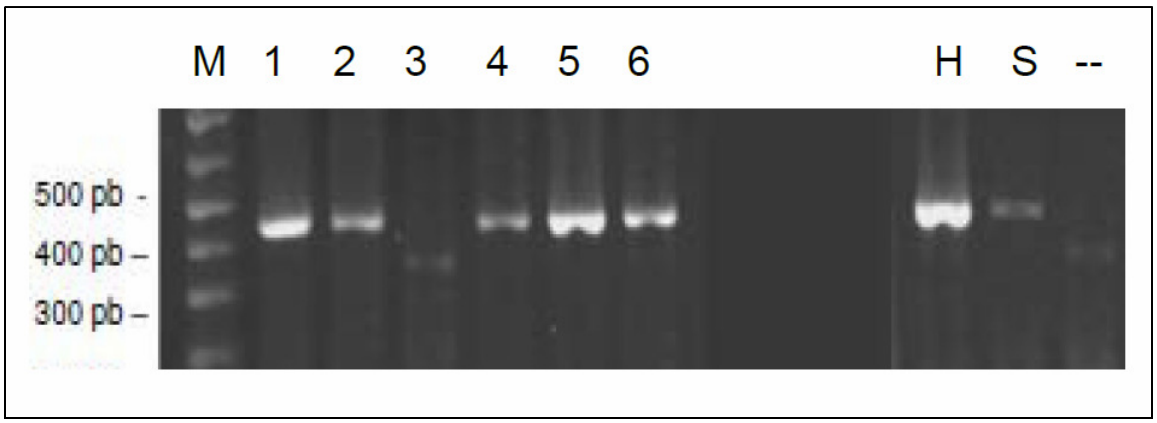


Fig. 12 Figura representativa de la amplificación de región L1 de papilomavirus. Marcador de peso molecular (M), como controles positivos se utilizó ADN de la línea celular HeLa (H) y SiHa (S). como control negativo se utilizó la mezcla de PCR sin ADN (--). Como se puede observar las muestras 1, 2, 4, 5 y 6 amplificaron el fragmento de 450 pb, mientras que la muestra 3 no lo amplificó.

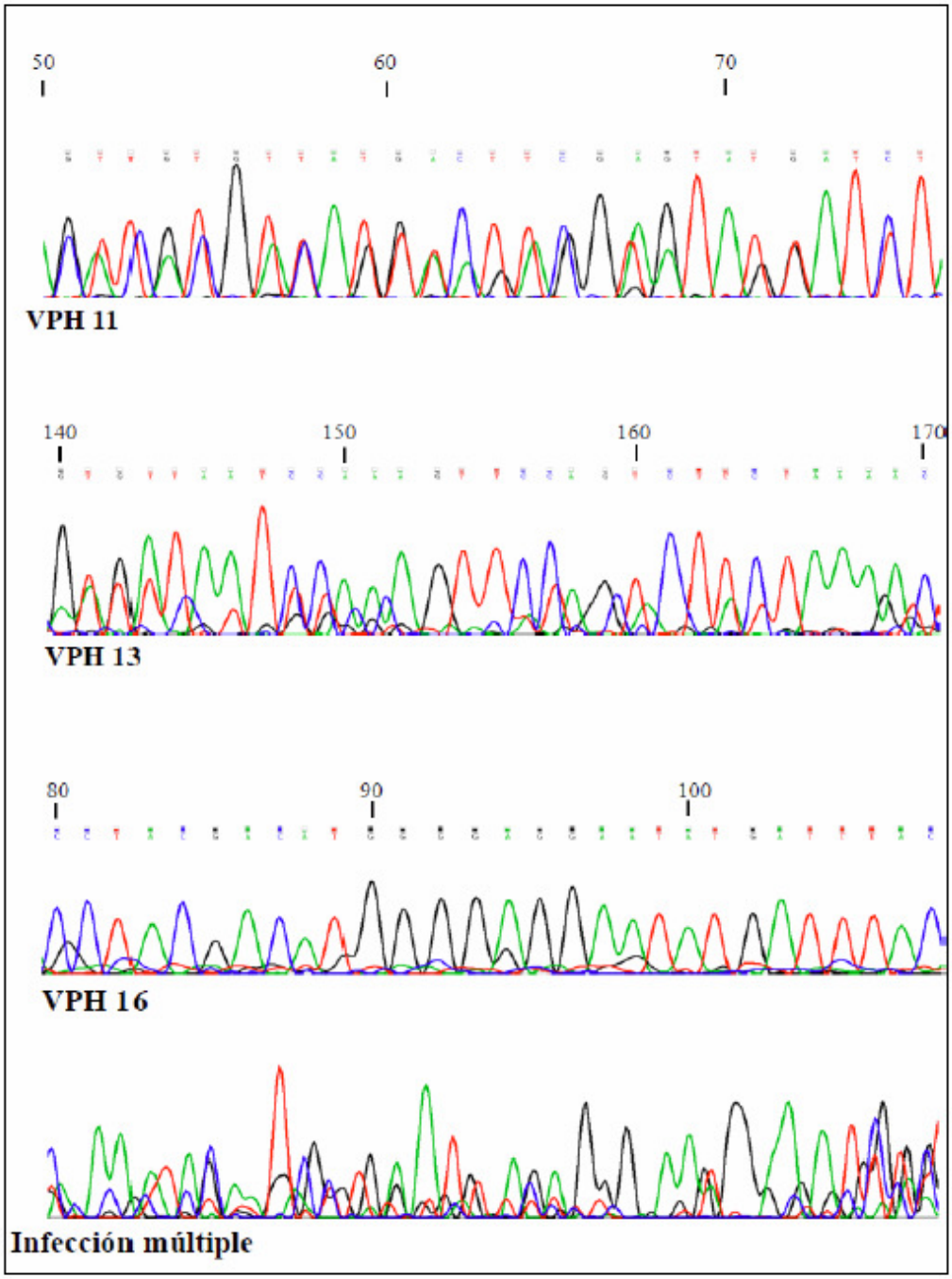


Figura 13. Ejemplos de las secuencias obtenidas. Se observan los cromatogramas correspondientes a los tipos virales 11, 13 y 16. Adicionalmente se puede observar un ejemplo representativo del resultado obtenido al tratar de secuenciar una lesión que contenía diferentes tipos virales.

A N E X O S

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Consentimiento de participación en el estudio:
Tipificación de virus del papiloma humano (VPH) en lesiones bucales relacionadas a VPH en individuos infectados con VIH

Yo _____ declaro que:

He sido informado(a) que la Clínica Especializada Condesa (CEC), en colaboración con la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), están realizando un estudio para determinar la frecuencia de lesiones bucales asociadas al Virus del Papiloma Humano (VPH) en pacientes con VIH/SIDA, y los tipos virales involucrados. La determinación de los tipos virales encontrados en lesiones bucales asociadas podría tener consecuencias en el manejo adecuado de las mismas.

Es de mi conocimiento que se me ha detectado una lesión bucal posiblemente asociada al VPH, y que en el Servicio de Patología Bucal de la Consulta externa de la CEC, especialistas en Medicina y Patología Bucal tomarán una biopsia de la lesión identificada para su diagnóstico definitivo. Una de las secciones de dicha muestra será utilizada para extraer ADN e identificar el tipo viral del que se trata. La información obtenida me será dada a través de un reporte por escrito.

Adicionalmente, se me hará un interrogatorio que incluirá preguntas en relación a uso de antirretrovirales y antecedentes de tabaquismo y se tomará del expediente clínico datos relevantes para el estudio (conteo de linfocitos CD4+ y la carga viral).

Se me ha informado que la realización de la biopsia puede provocar discreto dolor local, ocasionalmente sangrado persistente y excepcionalmente infección local o alergia al anestésico.

Se me ha proporcionado amplia información sobre los procedimientos que a lo largo del estudio servirán de control y los posibles riesgos, molestias y beneficios del estudio. También se me ha informado que mi participación en este estudio no implica la administración gratuita de medicamentos que me serán indicados de acuerdo al criterio de los médicos.

Se ha hecho de mi conocimiento que no existirá ningún cargo extra por las pruebas utilizadas (toma de biopsia, extracción de ADN, amplificación de ADN, etc.) ni por las consultas efectuadas para propósito del estudio. El resto de las consultas o los procedimientos relacionados con mi padecimiento de base y no relacionados con este estudio correrán por mi cuenta de acuerdo a la clasificación socioeconómica que me ha asignado el Instituto.

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, 04960 México, D. F. Tel.:5483 7000

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Cualquier pregunta o duda que tenga sobre mi enfermedad y tratamiento, **puede ser contestada por la Dra. Gabriela Anaya Saavedra cualquier duda acerca del estudio (teléfono: 5483-7206).**

Se me ha garantizado que toda la información que se obtenga con este estudio será confidencial y se consignará en el expediente correspondiente. No seré identificado en ninguna publicación o presentación que provenga de este estudio.

ACEPTO LIBREMENTE TOMAR PARTE EN ESTE ESTUDIO. SÉ QUE PUEDO NEGARME A PARTICIPAR O SUSPENDER MI PARTICIPACIÓN EN EL MOMENTO QUE LO DECIDA. EN CASO DE QUE LO HAGA, LA ATENCIÓN QUE COMO PACIENTE RECIBO DE LA INSTITUCIÓN NO SE VERÁ AFECTADA.

He leído la información anterior y comprendido los propósitos del protocolo, así como los beneficios y riesgos potenciales de mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad de preguntar mis dudas y todas han sido aclaradas. Me he quedado con una copia de esta forma de consentimiento.

FECHA: _____

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE: _____

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO: _____

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, 04960 México, D. F. Tel.:5483 7000

Anexo 2. Ficha de recolección de datos

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Consentimiento de participación en el estudio:

Tipificación de virus del papiloma humano (VPH) en lesiones bucales relacionadas a VPH en individuos infectados con VIH

Nombre: _____ Fecha: _____

Procedencia: _____ Expediente:_____ NSE: _____

Escolaridad: _____ Ocupación: _____ Edo. Civil: _____

Fecha de diagnóstico:_____ Estadio CDC:_____ Categoría transm:_____

Síntomas iniciales: _____

Sintomatología actual: _____

ARV: _____

Fecha de inicio: _____Tiempo con ARV: _____

ARV anteriores: _____

Fecha de inicio y término ARV anteriores: _____

_____

Motivo de suspensión: _____

Leucocitos: _____ Linfocitos: _____ Plaquetas: _____ Fecha: _____

CD4+: _____ CV: _____

fecha fecha

CD8: _____ CD4 nadir: _____

fecha fecha

Lesión

Lesión básica: _____ Color: _____ Forma: _____

Tamaño: _____ Localización: _____

_____

Tiempo de evolución: _____Tx previo: _____

Sintomatología asociada: _____

UNIDAD XOCHIMILCO

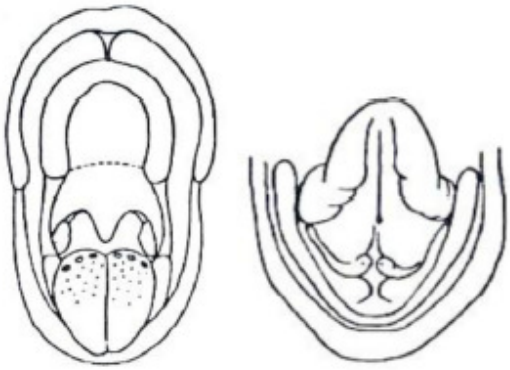
Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, 04960 México, D. F. Tel.:5483 7000

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Consentimiento de participación en el estudio:

Tipificación de virus del papiloma humano (VPH) en lesiones bucales relacionadas a VPH en individuos infectados con VIH



No. De biopsia: _____ Resultado histopatológico: _____

Cepillado: _____ biopsia para amplificación: _____

Resultado: _____

_____

_____

_____

UNIDAD XOCHIMILCO

Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, 04960 México, D. F. Tel.:5483 7000

Anexo 3. Análisis molecular con tipificación viral de muestras de LB-VPH en pacientes infectados con VIH

Muestra	Cuantificación ng/µl	β-globina	MY 09/11	GP 5/6+	Tipo viral (BLAST)
1	934.3	+	+	---	6
2	450.1	+	+	---	31
3	22.9	+	+	---	13, 18
4	374.4	+	+	---	13
5	23.6	+	+	---	6
6	115.9	+	+	---	13
7	18.6	+	+	---	13
8	359.2	+	+	---	32
9	160.5	+	+	---	13, 16
10	427.2	+	+	---	74
11	271.1	+	+	---	13
12	707.4	+	+	---	13
13	43.4	+	+	---	32
14	201.3	+	---	+	13
15	1633.7	+	+	---	11
16	171.7	+	---	+	13
17	75.4	+	---	+	11
18	1067.6	+	+	---	31
19	1.6	+	---	+	13
20	307.3	+	---	+	13
21	2.1	+	+	---	13
22	689.2	+	+	---	16
23	60.9	+	+	---	13
24	486.2	+	+	---	---
25	416.0	+	+	---	---
26	2.8	+	+	---	---
27	54.6	+	---	+	---
28	7.1	+	---	+	---
29	620.5	+	+	---	---
30	531.0	+	+	---	---
31	173.0	+	+	---	---
32	31.2	+	+	---	---
33	4.7	+	---	+	---
34	99.0	+	---	+	---