



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO**

**INMUNODETECCIÓN DE P16<sup>INK4a</sup> Y CARACTERIZACIÓN  
CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICA DE LESIONES BUCALES ASOCIADAS A VPH  
EN PACIENTES CON VIH/SIDA**

**Idónea Comunicación de Resultados**

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

**P R E S E N T A**  
**María Estrella Rosales Terrazas**

**Comité tutorial:**  
**Co-directora: Gabriela Anaya Saavedra**  
**Co-directora: Velia A. Ramírez Amador**  
**Asesora: Elizabeth Ortiz Sánchez**  
**Asesora: Miriam C. Guido Jiménez**  
**Asesor: Alejandro M. García Carrancá**

**México, D.F. Julio de 2013**

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

El jurado designado por las División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad de Xochimilco aprobó la ICR que presentó

**María Estrella Rosales Terrazas**

El día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año de \_\_\_\_\_.

JURADO:

**Presidenta:** M. en S.P. Martha Beatriz González Guevara \_\_\_\_\_

**Secretaria:** Dra. Esther Irigoyen Camacho \_\_\_\_\_

**Vocal:** Dra. Marcela Lizano Soberón \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Por haberme dado la vida, maravillosas oportunidades en el momento justo y darme su luz cuando más lo necesito.

### **A mi comité tutorial**

Dra. Velia Ramírez y Dra. Gabriela Anaya, gracias por la paciencia, disponibilidad y preocupación constante en la excelencia académica.

Maestra Miriam y Dra. Elizabeth, gracias por el apoyo, disponibilidad y compartir invaluable conocimientos.

Dr. Alejandro Carrancá, gracias por la paciencia, tiempo y valiosas enseñanzas para la realización del presente trabajo.

### **A mis sinodales**

Dra. Martha, gracias por la amistad y motivación para ser mejores personas.

Dra Esther, agradezco el apoyo incondicional y disponibilidad de siempre colaborar y compartir sus valiosos conocimientos.

Dra. Marcela, gracias por la amabilidad y disponibilidad para el enriquecimiento del presente trabajo.

### **A mi familia adoptiva**

Dr. Eduardo, Angelina y Eduardo Jr, por el apoyo incondicional que me han brindado desde que llegaron a mi vida y las palabras justas en el momento necesario.

Señora Lilia, nunca olvidaré la calidez humana y ayuda incondicional, fundamental en momentos de dificultad.

### **A Shanty**

Por la alegría que contagia día a día con solo existir.

Agradezco las facilidades recibidas para la realización del presente trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, la Clínica Especializada Condesa (CEC), el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

## **DEDICATORIAS**

### **A mi esposo**

Por el amor, apoyo y comprensión incondicional, así como constante motivación por ser mejores personas cada día, por que siempre podemos mejorar.

### **A mis padres**

Madre, gracias por tu apoyo y bondad sin límites, porque en tu corazón no existen reservas.

Padre, gracias por tu esfuerzo, fortaleza y por creer en mi.

### **A Neny y Abue**

Abuelita, gracias por la luz de sus ángeles siempre presente.

Tía gracias por la disponibilidad, el gran optimismo y calidez humana.

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
Índice de cuadros.....	II
Índice de figuras.....	III
Resumen.....	IV
1. Marco teórico.....	1
1.1 Epidemiología del VIH/SIDA.....	1
1.2 Etiopatogenia del VIH/SIDA.....	2
1.3 Estadificación y características clínicas.....	4
1.4 Tratamiento del VIH/SIDA.....	6
1.5 Manifestaciones bucales asociadas al VIH/SIDA.....	8
1.5.1 Lesiones bucales asociadas al VPH en individuos con VIH.....	11
1.6 Virus del papiloma humano.....	13
1.6.1 Organización genómica del VPH.....	13
1.7 Interacción VIH/VPH.....	15
1.8 Diagnóstico molecular del VPH.....	16
1.9 P16 <sup>INK4A</sup> .....	17
1.9.1 Expresión inmunohistoquímica de p16 <sup>INK4A</sup> .....	18
1.9.2 El papel de P16 <sup>INK4A</sup> como biomarcador de VPH-AR.....	21
2. Planteamiento del problema.....	23
3. Justificación.....	24
5. Objetivos.....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos específicos.....	25
6. Método.....	26
6.1 Diseño de estudio.....	26
6.2 Sujetos participantes.....	26
6.2.1 Criterios de inclusión.....	26
6.2.2 Criterios de exclusión.....	27
6.2.3 Criterios de eliminación.....	27
6.3 Aspectos éticos.....	27
6.4 Procedimientos clínicos.....	28
6.4.1 Cuestionarios.....	28
6.4.2 Examen bucal.....	28
6.4.3 Toma de biopsia.....	29
6.5 Procedimientos de laboratorio.....	29
6.5.1 Criterios histopatológicos.....	29
6.5.2 Extracción y purificación de ADN.....	30
6.5.3 Cuantificación del ADN.....	33
6.5.4 Reacciones de PCR.....	33
6.5.5 Purificación de productos de PCR.....	35
6.5.6 Secuenciación.....	36
6.5.7 Ensayo de Inmunohistoquímica.....	37

6.5.8 Análisis de inmunodetección.....	37
6.6 Variables.....	39
6.7 Análisis estadístico.....	39
7. Resultados.....	40
7.1 Características clínicas e histopatológicas de LB-VPH.....	40
7.2 Análisis molecular de las muestras.....	42
7.3 Análisis de expresión inmunohistoquímica de p16 <sup>INK4a</sup> .....	43
8. Discusión.....	45
9. Conclusiones.....	55
10. Referencias bibliográficas.....	56
11. Cuadros.....	71
12. Figuras.....	81
13. Anexos.....	89

## Abreviaturas

ART	Tratamiento antirretroviral
CA	Condiloma acuminado
CaCU	Cáncer cérvico-uterino
CByO	Cáncer bucal y orofaríngeo
CDC	Siglas en inglés de los Centros para el Control de Enfermedades
CEC	Clínica Especializada Condesa
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HeLa	Línea celular del virus del papiloma humano tipo 18
HEM	Hiperplasia epitelial multifocal
IC	Intervalos de confianza
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
INK4a	Que se origina a partir del inhibidor de cinasa 4
LB-VIH	Lesiones bucales asociadas a VIH
LB-VPH	Lesiones bucales asociadas a VPH
Md	Mediana
μl	Microlitros
NNRTI	Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos
NRTI	Inhibidores de la transcriptasa reversa nucleósidos
OMS	Organización mundial de la salud
OSCC	Carcinomas escamocelulares bucales
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEC	Papiloma escamocelular
PI	Inhibidores de proteasa
pRB	Proteína retinoblastoma
Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub>	Cuartil uno-Cuartil tres
RM	Razón de momios
RNA	Ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SiHa	Línea celular del virus del papiloma humano tipo 16
TARAA	Terapia antirretroviral altamente activa
UAM-X	Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
UNAIDS	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
VPH-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico
VPH+	Positivo al virus del papiloma humano
VV	Verruga vulgar

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1a.	Características demográficas y clínicas en 29 individuos infectados por VIH/SIDA, con LB-VPH.....	76
Cuadro 1b.	Características clínicas de 29 individuos infectados por VIH, con LB-VPH.....	77
Cuadro 2.	Características histopatológicas por tipo de LB-VPH de 29 pacientes VIH/SIDA....	74
Cuadro 3.	Relación entre los tipos de VPH y el diagnóstico histopatológico de las LB-VPH en 29 pacientes infectados con VIH/SIDA.....	75
Cuadro 4.	Análisis molecular de las LB-VPH en pacientes infectados con VIH/SIDA.....	76
Cuadro 5.	Relación del diagnóstico histopatológico con la presencia de los tipos de VPH de 12 LB-VPH de 5 pacientes con VIH/SIDA con más de una LB-VPH.....	77
Cuadro 6.	Porcentaje de inmunodetección de p16 <sup>INK4a</sup> y gradiente de intensidad en muestras de mucosa bucal normal.....	78
Cuadro 7.	Gradiente de intensidad de p16 <sup>INK4a</sup> por estratos en 36 muestras de LB-VPH en 29 pacientes infectados con VIH.....	79
Cuadro 8.	Asociación entre el gradiente de intensidad de inmunodetecciónn de p16 <sup>INK4a</sup> y las variables consideradas en el estudio.....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Organización genómica del VPH-16.....	82
Figura 2.	Imágenes clínicas de las LB-VPH.....	83
Figura 3.	Características histopatológicas de las LB-VPH.....	84
Figura 4.	Amplificación del gen $\beta$ -globina.....	85
Figura 5.	Amplificación del gen de región L1 de VPH y gen E6 de VPH-16.....	86
Figura 6.	Cromatogramas de las secuencias de los tipos de VPH .....	87
Figura 7.	Inmunodetección de la proteína p16 <sup>INK4a</sup> .....	88

## RESUMEN

**Introducción.** La proteína p16<sup>INK4a</sup> es un regulador negativo del ciclo celular y su sobreexpresión inmunohistoquímica se ha relacionado con diversos estados celulares, entre los que destacan estados proliferativos, procesos premalignos y diversos tipos de cáncer; se ha sugerido que la expresión de p16<sup>INK4A</sup> pudiera ser un biomarcador del virus del papiloma humano de alto riesgo, cuyas secuencias virales han sido encontradas tanto en lesiones bucales asociadas al virus del papiloma humano como en mucosa normal de pacientes VIH/SIDA. En la literatura científica actual se carece de estudios que describan la expresión inmunohistoquímica de p16<sup>INK4a</sup> en lesiones bucales asociadas al virus del papiloma humano de pacientes con VIH/SIDA o las caractericen histopatológicamente.

**Objetivo.** Determinar la inmunodetección de p16<sup>INK4A</sup> y caracterizar clínica e histopatológicamente las lesiones bucales asociadas al virus del papiloma humano provenientes de pacientes con VIH/SIDA, y su asociación con los tipos de virus del papiloma humano y otras variables clínicas de importancia como la categoría de transmisión, consumo de tabaco y alcohol, linfocitos T CD4+, carga viral, uso y tiempo de tratamiento antirretroviral altamente activo.

**Método.** Estudio transversal, observacional y analítico, en el que se incluyeron 29 pacientes con VIH/SIDA y lesiones bucales asociadas al virus del papiloma humano que acudieron a las consultas de Patología y Medicina Bucal de la UAM-X en tres centros de referencia de la Ciudad de México. Se realizó el estudio histopatológico de las lesiones por tres patólogas bucales, la caracterización clínica e histopatológica, la secuenciación de los tipos de virus del papiloma humano de las muestras y el análisis de la expresión inmunohistoquímica de p16<sup>INK4a</sup>. Se efectuaron pruebas de X<sup>2</sup> o exacta de Fisher (variables

categorías) y pruebas no paramétricas mediante la prueba de U de Mann Whitney (variables continuas), con un nivel de alfa igual o menor a 0.05%. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS (v 20).

**Resultados.** En el presente estudio se incluyeron 29 individuos con VIH/SIDA y lesiones bucales asociadas al virus del papiloma humano, con una mediana de edad de 39 (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>, 32.5-44) años. Veintisiete (93.1%) eran hombres, de quienes 25 (92.6%) eran hombres que tenían sexo con hombres [HSH]. La hiperplasia epitelial multifocal fue la lesión más frecuente y más de la mitad (62%) (18/29) de los pacientes tenían más de una lesión. Se encontraron tipos virales diferentes a los clásicamente descritos para las lesiones, una alta proporción de las muestras contenían tipos virales de bajo riesgo oncogénico y el 44.4% correspondieron al tipo 32. Cuatro pacientes presentaron infección múltiple, quienes tenían inmunosupresión severa (<200 linfocitos T CD4+/mm<sup>3</sup>) y en tres cuartas partes de ellos se identificaron secuencias virales de alto riesgo. Se encontró sobreexpresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup> en todas las lesiones, sin observar asociación entre las variables demográficas y clínicas, ni con los tipos virales secuenciados.

**Conclusiones.** La alta expresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup> identificada en el presente estudio, además de la ausencia de signos de transformación maligna, y de la baja frecuencia de virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico, nos permiten confirmar la naturaleza benigna de estas condiciones, lo cual es de gran relevancia debido al hallazgo previo de secuencias virales de alto riesgo en pacientes inmunosuprimidos. En el presente trabajo la sobreexpresión de la proteína no se asoció al virus del papiloma humano de alto riesgo y posiblemente podría estar relacionada al estado hiperproliferativo de las lesiones.

## **1. MARCO TEÓRICO**

La epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a nivel nacional y mundial es un problema que rebasa el ámbito de la salud pública al converger con factores psicológicos, sociales, éticos, económicos, políticos y de derechos humanos (CENSIDA Reporte Final, 2012; UNAIDS, 2012). La mucosa bucal tiene un papel importante en el monitoreo de la progresión de la enfermedad por VIH, debido a la presencia de lesiones específicas (Shiboski y cols, 2009), como infecciones oportunistas, las cuales se presentan hasta en un 80% de los pacientes infectados (Dang y cols, 2012; Reznik, 2005) y resultan en el deterioro del estado nutricional (Dang y cols, 2012).

### **1.1 Epidemiología del VIH/SIDA**

En el mundo, si bien se estimó que para el 2011 el número de personas infectadas por el VIH fue de 34 millones, las cifras de nuevas infecciones disminuyó 20%, de 3.2 millones (2001) a 2.5 millones (2011). En 39 países, entre ellos México, la incidencia del VIH entre adultos se redujo más de un 25% entre 2001 y 2011 (UNAIDS, 2012). En contraste, en algunas regiones del mundo, como África septentrional y el Oriente medio, las tendencias son preocupantes, ya que desde 2001 el número de nuevas infecciones ha aumentado más de un 35% (UNAIDS, 2012).

En el año 2011, a nivel mundial, 1.7 millones de personas fallecieron por causas relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), lo que representa un descenso del 24% de la mortalidad relacionada con el VIH respecto al 2005 (2.3 millones de muertes) (UNAIDS, 2012).

En México, para diciembre del 2012, se reportaron 202,331 casos de VIH/SIDA; de ellos, el 80% son hombres, y el 76.3% se encuentra entre los 20 y los 44 años de edad. La principal vía de transmisión reportada es la sexual (94%), ocupando la heterosexualidad el 41% de los casos (CENSIDA Reporte Final, 2012). En ese mismo año, se detectaron en México 4,466 casos nuevos y 4,727 muertes relacionadas con la enfermedad (CENSIDA Reporte Final, 2012).

## **1.2 Etiopatogenia del VIH/SIDA**

El VIH es un retrovirus de doble cadena de RNA de la familia de los lentivirus (Mogensen y cols, 2010); existen dos tipos virales principales capaces de producir infección en el ser humano: VIH-1 y VIH-2 (Nyamweya y cols, 2013). En ausencia de tratamiento antirretroviral (ART) el VIH se replica de forma continua e intensa, e infecta los linfocitos T CD4+ desde su inoculación (Mogensen y cols, 2010).

Las tres principales formas de transmisión son la vía sexual, parenteral o vertical (de madre infectada al feto), siendo la vía sexual la mas frecuente (Moir y cols, 2011). Posterior a la transmisión el virus se disemina rápidamente y la infección por VIH se presenta en diversas etapas, identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos (Moir y cols, 2011; Mogensen y cols, 2010).

La infección aguda se define como el primer periodo de infección que comprende desde la detección del RNA del VIH hasta la formación de anticuerpos específicos, tres a cuatro semanas posteriores a la infección (McMichael y cols, 2010; Mogensen y cols, 2010). Se ha sugerido que las primeras células de las mucosas en infectarse son los linfocitos T que

expresan receptores CD4+ y CCR5+ (Mogensen y cols, 2010; Salazar-González y cols, 2009). Inicialmente el virus alcanza los ganglios linfáticos, sitio en donde el virus se replica y se disemina a tejidos linfoides secundarios, con predilección por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), sitio en el cual los linfocitos T de memoria con expresión de CD4+ y CCR5+ se encuentran en altos niveles (Moir y cols, 2011; Mogensen y cols, 2010), los cuales en esta etapa disminuyen de forma severa tanto en las mucosas como en el GALT, lo cual a futuro puede resultar en falla de la respuesta inmune y progresar a SIDA (Mogensen y cols, 2010). Aproximadamente de los 21 a los 28 días, la carga viral plasmática se eleva hasta alcanzar niveles máximos, se establecen sitios reservorios estables del virus, disminuyen los linfocitos T CD4+ periféricos y aparecen los signos y síntomas del síndrome retroviral agudo, en el cual se puede presentar fiebre, dolor de garganta, linfadenopatía y exantema (Moir y cols, 2011; Mogensen y cols, 2010). Alrededor de las 12 a 20 semanas se disminuye la carga viral hasta alcanzar un punto estable de la misma. A este respecto, se cree que los linfocitos citotóxicos T CD8+ juegan un papel importante en el control de la viremia (Moir y cols, 2011; Mogensen y cols, 2010; McMichael y cols, 2010).

Generalmente durante la etapa de infección crónica los pacientes son asintomáticos, sin embargo pueden presentar trombocitopenia y adenopatías (Mogensen y cols, 2010). Durante este periodo, persiste la replicación del VIH en todos los tejidos linfoides secundarios, lo cual resulta en la activación del sistema inmunológico, sin embargo los nuevos linfocitos T CD4+ de reemplazo poseen vida media, funciones efectoras y potencial regenerativo disminuidos (Moir y cols, 2011; Grossman y cols, 2006). Al activarse el sistema inmunológico del huésped se incrementa la expresión de marcadores como CD38, HLA-DR y Ki67, de los cuales CD38 es considerado como el marcador subrogado mas confiable de la activación del

sistema inmunológico, progresión de la enfermedad a SIDA y muerte (Mogensen y cols, 2010). Otro factor importante presente en este estadio, es la alta tasa de mutación viral, así como el incremento en la virulencia al adquirir mayor tropismo celular (Mogensen y cols, 2010; Grossman y cols, 2006). Adicionalmente, el daño a los tejidos linfoides resulta en disfunción del timo y alteración de la arquitectura de los folículos linfoides (Moir y cols, 2011; Mogensen y cols, 2010; Grossman y cols, 2006). Por otro lado, aunque en la infección por VIH predomina el daño a la respuesta inmune adaptativa, también existe daño significativo de la respuesta inmune innata (McMichael y cols, 2010) y eventualmente la disminución marcada y progresiva de linfocitos CD4+ podría conducir a SIDA (Moir y cols, 2011).

Afortunadamente, con el uso de terapia antirretroviral (ART) y la consecuente inhibición de la replicación viral, se reconstituye el sistema inmunológico, incluso en fases avanzadas de la enfermedad (Panel on ARV Guidelines, 2013), como consecuencia, se prolonga la duración del período crónico, se retrasa o impide la aparición de los síntomas de inmunodeficiencia (Panel on ARV Guidelines, 2013). Por otro lado, es importante mencionar que la duración de la fase crónica es altamente variable, independientemente del uso de ART (Grossman y cols, 2006).

### **1.3 Estadificación y características clínicas**

La definición de casos de VIH/SIDA en niños, adolescentes y adultos se basa en los criterios internacionales publicados en el año 2008, (Schneider y cols, 2008) los cuales están basados en la clasificación establecida previamente por los centros para el control de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) (CDC, 1993).

Se trata de un sistema clínico-inmunológico en el que los individuos infectados se clasifican en función de la sintomatología (asignando una letra [A,B o C] y del recuento de linfocitos CD4+, presentes y pasados (asignando un número [1,2 ó 3]) (Schneider y cols, 2008).

De esta manera, la categoría clínica A incluye a individuos con primoinfección, asintomáticos, con o sin linfadenopatía generalizada persistente. La categoría clínica B incluye a individuos que presenten o hayan presentado síntomas o enfermedades no pertenecientes a la categoría C, en cuya categoría se incluyen enfermedades definatorias de SIDA. Cabe mencionar que dentro de la categoría B se incluyen condiciones bucales como candidosis y leucoplasia vellosa (Shiboski y cols, 2009; Schneider y cols, 2008). (Anexo I).

Así mismo con base en el conteo de linfocitos CD4+ y el porcentaje del total de linfocitos, se establecen cuatro estadios de la infección categorizados de menor a mayor severidad (Schneider y cols, 2008), donde el 1 corresponde a niveles mayores o iguales a 500 células/mm<sup>3</sup>, el 2 a niveles de 200-499 células/mm<sup>3</sup> y el 3 a niveles menores o iguales a 200 células/mm<sup>3</sup>.

Con fines de vigilancia epidemiológica, se consideran casos de SIDA a los pacientes incluidos en las categorías C1, C2, C3, A3 y B3. Es importante mencionar que una vez que haya progresado la enfermedad y se haya clasificado al paciente en un estadio mas severo, no es posible reclasificarlo en un estadio menor (Schneider y cols, 2008).

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida se puede presentar como una grave alteración del estado general, infecciones oportunistas, determinadas neoplasias y ciertos trastornos neurológicos característicos. A este respecto, la terapia antirretroviral altamente activa

(TARAA) es capaz de modificar radicalmente la historia natural de la enfermedad (Panel on ARV Guidelines, 2013; Moir y cols, 2011).

Por otro lado, el incremento de cánceres anogenitales en individuos VIH positivos está bien documentado, con el aumento de cáncer cervical y anal, predominantemente causados por el virus del papiloma humano (VPH) 16 (Denny y cols, 2012; Silverberg y cols, 2011; Chaturvedi y cols, 2009). Adicionalmente, estudios recientes indican que las personas con VIH/SIDA tienen un riesgo mayor (de 2 a 6 veces) de desarrollar cáncer bucal y orofaríngeo en comparación a la población general, (Palefsky, 2009; Strickler, 2009; Grulich y cols, 2007) atribuible a la severidad de la inmunosupresión relacionada con el SIDA (Gillison, 2009; Grulich y cols, 2007). Algunos trabajos han informado sobre el desarrollo de carcinoma de células escamosas en la mucosa bucal, en pacientes con infección por VPH bucal, y/o genitoanal; (Palefsky, 2009; Chaiyachati y cols, 2008). Adicionalmente, se ha informado que el cáncer bucal y orofaríngeo en individuos infectados por VIH se presenta en etapas más avanzadas, y tiene tasas de supervivencia más bajas que las de los pacientes sin VIH (32% vs. 51% a 2 años) (Palefsky, 2009).

#### **1.4 Tratamiento del VIH/SIDA**

En los primeros años de la epidemia se emplearon los primeros fármacos para el tratamiento de VIH/SIDA, la monoterapia antirretroviral, la cual no resultó efectiva, reportándose una alta resistencia y mortalidad. (Thompson y cols, 2012; Fauci 2008; Levy, 2006); sin embargo, a partir de 1996, se introdujo la TARAA, la cual consiste en una combinación de tres o cuatro grupos de medicamentos, con al menos dos mecanismos de acción diferentes, la

morbi-mortalidad de los pacientes con VIH/SIDA ha disminuido dramáticamente (Panel on ARV Guidelines, 2013; Thompson y cols, 2012)

El objetivo de la TARA es la supresión máxima y prolongada de la carga viral, disminuyendo sus niveles plasmáticos hasta un nivel no detectable (<50 copias de ARN viral/ml) y mejorando el grado de inmunosupresión mediante la elevación de linfocitos CD4+ durante el mayor tiempo posible, con la finalidad de mejorar la expectativa y calidad de vida de las personas infectadas. (Panel on ARV Guidelines, 2013; Thompson y cols, 2012; Guía manejo antiviral México, 2010) Adicionalmente, se ha comprobado que reduce significativamente la mortalidad y necesidad de ingreso hospitalario de los pacientes, así como la incidencia de infecciones oportunistas, sarcoma de Kaposi y linfoma no Hodgkin (Panel on ARV Guidelines, 2013; Moir y cols, 2011).

Los medicamentos antirretrovirales se clasifican en tres principales tipos: inhibidores de la transcriptasa reversa nucleósidos (NRTI), inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos (NNRTI) e inhibidores de proteasa (PI); y los nuevos grupos de recientemente introducción como: inhibidores de fusión, inhibidores de entrada antagonistas de co-receptores CCR5 e inhibidores de la integrasa de transferencia de hebra del VIH (Diz y Scully, 2013). Actualmente, las combinaciones prescritas mas comunes son: un NNRTI + dos NRTI; uno o dos PI + dos NRTI; y tres NRTI (Diz & Scully, 2013; Thompson y cols, 2012; Nittayananta y cols, 2010a).

En la guía de tratamiento antirretroviral de la OMS en 2011 (Guía de tratamiento antirretroviral OMS, 2011), se recomienda iniciar la terapia antirretroviral en pacientes con un conteo de linfocitos CD4+  $\leq 350$  células/mm<sup>3</sup> independientemente del estadio clínico y en

pacientes con enfermedad grave o clínicamente avanzada sin importar su recuento de linfocitos CD4+ (Guía de tratamiento anirretroviral OMS, 2011). Adicionalmente, con la finalidad de disminuir el riesgo de transmisión y progresión de la enfermedad, recientemente se ha sugerido iniciarla independientemente del conteo de linfocitos CD4+ (Thompson y cols, 2012; Panel on ARV Guidelines, 2013).

### **1.5 Manifestaciones bucales asociadas al VIH/SIDA**

Desde los primeros años de la epidemia, la mucosa bucal ha jugado un papel importante tanto para la detección (Patton y cols, 2013; Shiboski y cols, 2009), como para el monitoreo de la progresión del VIH/SIDA, debido a que las lesiones bucales encontradas en estos pacientes, principalmente la candidosis bucal y la leucoplasia vellosa, han sido predictoras de conteos bajos de linfocitos T CD4+ y carga viral elevada (Shiboski y cols, 2009).

Las lesiones bucales asociadas al VIH (LB-VIH) se clasifican de acuerdo con el factor etiológico que las produce, de modo que existen cinco categorías que incluyen las infecciones micóticas, virales o bacterianas, las condiciones idiopáticas y las neoplasias (Shiboski y cols, 2009). (Anexo II).

En la mayoría de los estudios, la candidosis bucal es la mas lesión más frecuente, con frecuencias que varían entre 3.9% (da Silva y cols, 2008) y 37.8% (Tamí-Maury y cols, 2011). En contraste, en algunas regiones del mundo como Tailandia, la pigmentación melánica de las mucosas representa la lesión bucal más frecuente tanto en adultos (Nittayananta y cols, 2010a y 2010b) como en niños (Umadevi y cols, 2007).

El advenimiento de la TARAA ha disminuido la morbilidad bucal en los pacientes con VIH/SIDA, aumentando su calidad de vida e incluso impactando en su sobrevivencia; la frecuencia de LB-VIH ha disminuido tanto en adultos como en población pediátrica (Patton y cols, 2013; Nittayananta y cols, 2010a ; Miziara y Weber, 2008; Nokta, 2008). Ejemplo de ello es la disminución en la prevalencia de infecciones oportunistas documentada en los últimos años (Amornthatree y cols, 2011; Charkraborty y cols, 2010; Cameron, 2008). En México, al igual que en otros países, se ha referido una disminución progresiva en la frecuencia de la mayoría de lesiones bucales; en un estudio realizado durante doce años, en una cohorte de 1,000 pacientes, la prevalencia de LB-VIH fue menor en los pacientes con TARAA (27.2%), en comparación a los que no utilizaban tratamiento antirretroviral (52.8%), o estaban con monoterapia (57%), ( $p=0.000$ ) (Ramírez-Amador y cols, 2003).

En contraste con lo anterior, se ha mencionado un aparente aumento en la frecuencia de lesiones bucales asociadas al virus del papiloma humano (LB-VPH) en pacientes con TARAA, (Ferreira y cols, 2007; King y cols, 2002; Greenspan, 2001; Patton y cols, 2000; Schmidt-Westhausen y cols, 2000). A nivel mundial, desde el 2000 hasta el 2012 se han reportado frecuencias desde 0.5% (Lourenço y cols, 2011; Ortega y cols, 2009) al 23% (Greenspan y cols, 2001). A este respecto se especula que si hay una baja cantidad de células de memoria específicas para VPH, la inmunidad específica a VPH puede ser poco efectiva; adicionalmente la recuperación de la inmunidad específica puede ser incompleta después de la restauración de la respuesta inmune, lo cual puede explicar el efecto benéfico relativamente limitado de la TARAA en las lesiones asociadas a VPH (Palefsky, 2006).

En algunos de los reportes previos (King y cols, 2002; Greenwood y cols, 2002; Greenspan y cols, 2001; Patton y cols, 2000) se ha sugerido que la TARAA pudiera ser un factor que influye en el desarrollo de las LB-VPH. Patton y cols, (Patton y cols, 2000), en el año 2000 fueron los primeros en reportar el incremento en la prevalencia de LB-VPH en pacientes con VIH, refiriendo frecuencias del 2.2% (1995-1996) al 4.0% (1997-1999), sin embargo no encontraron diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente Greenspan y cols, en el 2001, en un estudio realizado en el periodo 1990-1999, reportaron un incremento en la prevalencia de LB-VPH, con frecuencias desde el 5% en pacientes sin tratamiento hasta el 23% en pacientes con TARAA y además encontraron asociación estadísticamente significativa entre el incremento de LB-VPH y el empleo de TARAA (RM 6.8, IC:1.49-30.8) en comparación a individuos sin tratamiento ( $p=0.01$ ). Más tarde, de manera similar Greenwood y cols, (Greenwood y cols, 2002) en un estudio realizado en 1590 pacientes en el periodo 1992-1998 encontraron un incremento en la prevalencia de LB-VPH en los pacientes con antirretrovirales desde el 1.7% (1993) hasta el 5.7% (1996) en comparación a los que no tenían tratamiento. Adicionalmente, King y cols, (King y cols, 2002), en un estudio anidado de casos y controles realizado en 2194 pacientes por tres años, durante el periodo 1997-1999 se reportó una prevalencia del 2.6% y un incremento de LB-VPH; se diagnosticaron más LB-VPH en el año de 1999 en comparación al periodo 1997-1998 (incidencia: 1.6%) ( $p=0.001$ ) y se asociaron con una disminución del RNA-VIH  $\geq 1\text{-log}_{10}$  (RM 2.3, IC: 1.08-5.11;  $p=0.03$ ). Posteriormente, en un estudio de cohorte retrospectivo (Ferreira y cols, 2007) realizado en 1,230 pacientes brasileños infectados con VIH, reportaron un incremento significativo en la prevalencia de LB-VPH , desde 0% (1988-1990) hasta el 3.0% (2001-2004).

A este respecto, Cameron y Hagensee (Cameron y Hagensee, 2008), sugieren que la inmunosupresión prolongada en estos pacientes, impide superar un umbral crítico inmunológico, lo cual favorece el desarrollo de las enfermedades asociadas con el VPH (Cameron y Hagensee, 2008). Adicionalmente, hasta la fecha se ha considerado que no existe suficiente evidencia científica que permita concluir que este tipo de terapia pudiera actuar como un factor de riesgo para el desarrollo y progresión de las lesiones referidas (Patton y cols, 2013; Anaya-Saavedra y cols, 2013).

### **1.5.1 Lesiones bucales asociadas al VPH**

En la mucosa bucal, la infección por VPH puede conducir al desarrollo de lesiones de naturaleza benignas, papulares y papilomatosas, denominadas con el término genérico de lesiones bucales asociadas al VPH (LB-VPH). Las LB-VPH pueden tener superficie lisa o un patrón digitiforme, ser sésiles o pediculadas y se han clasificado en cuatro lesiones principales: papiloma escamocelular (PEC), hiperplasia epitelial multifocal (HEM), verruga vulgar (VV), y condiloma acuminado (CA). Dichas lesiones han sido características presentes en los pacientes infectados con VIH, como resultado de diversas anomalías inmunológicas (Syrjanen, 2011; Palefsky, 2009; Cameron y Hagensee, 2008; Palefsky, 2006).

Las LB-VPH en pacientes inmunocomprometidos pueden presentar variaciones en el aspecto clínico, así como secuencias virales diferentes a los clásicamente descritos para cada tipo de LB-VPH (Syrjänen, 2003). En la mayoría de los estudios (Steinau y cols, 2012; Varnai y cols, 2009; Infante-Cossío y cols, 2008; Nunes y cols, 2008; Ma y cols, 2004; Aboulafia, 2002; Moerman y cols, 2001), estas lesiones se han asociado con tipos virales de bajo riesgo,

identificando frecuencias desde el 47.1% (Ma y cols, 2004) hasta 65.4% (Anaya-Saavedra y cols, 2013), encontrando VPH-1, 6, 7, 11, 13, 32, 40, 72, 73 y 74 (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Syrjanen, 2011; Ma y cols, 2004; Anderson y cols, 2003; Hille y cols, 2002), de los cuales algunos estudios reportan a los tipos 6, 11, 13 y 32 como los más frecuentes (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Syrjanen 2011; Cameron y Hagensee, 2008; Baccaglini y cols, 2007; Hodgson y cols, 2006). Por otro lado, la identificación de los tipos virales de alto riesgo ha mostrado frecuencias que van del 11.5% (Anaya-Saavedra y cols, 2013) al 20.5% (Ma y cols, 2004), encontrando los tipos de VPH-16, 18, 31, 33 y 51 (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Ma y cols, 2004; Paparotto-Lopes y Meeks, 2001).

Son pocos los estudios transversales o longitudinales que informan sobre la incidencia (King y cols, 2002) o prevalencia de las LB-VPH (Nabbanja y cols, 2013; Anaya-Saavedra y cols, 2013; Lourenço y cols, 2011; Ortega y cols, 2009; Giuliani y cols, 2008; Kakabadze y cols, 2008; Ferreira y cols, 2007; Hamza y cols, 2006; Pinheiro y cols, 2004; King y cols, 2002; Greenspan y cols, 2001; Patton y cols, 2000; Schmidt-Westhausen y cols, 2000). Solo cinco indican el tipo de LB-VPH particular (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Lourenço y cols, 2011; Ortega y cols, 2009; Nunes y cols, 2008; Pinheiro y cols, 2004).

En la literatura son múltiples los reportes de casos o series de casos sobre las LB-VPH en individuos con VIH/SIDA (Infante-Cossío y cols, 2008; Beaulieu y cols, 2008; Martini y cols, 2007; Aboulafia, 2002; Girão y cols, 2000; Ficarra y cols, 1991; Vilmer y cols, 1994; Viraben y cols, 1996; Marvan y cols, 1998; Moerman y cols, 2001; Feller y cols, 2010; Paparotto-Lopes y Meeks, VI 2001; Anderson y cols, 2003; Stoopler y cols, 2011), los cuales han descrito a la HEM (Vilmer y cols, 1994; Viraben y cols, 1996; Marvan y cols, 1998;

Moerman y cols, 2001; Feller y cols, 2010), al PEC (Paparotto-Lopes y Meeks 2001; Anderson y cols, 2003; Stoopler y cols, 2011) y al CA (Infante-Cossío y cols, 2008; Beaulieu y cols, 2008; Martini y cols, 2007; Aboulafia 2002; Girão y cols, 2000; Ficarra y cols, 1991) de manera aislada.

## **1.6 Virus del papiloma humano**

El Virus del Papiloma Humano (VPH), que pertenece a la familia *Papillomaviridae*, es un virus pequeño epiteliotrópico, responsable del desarrollo de lesiones epiteliales benignas y malignas en la piel y mucosas. Se han logrado secuenciar completamente más de 150 tipos (Doorbar y cols, 2012), y la mayoría se agrupa en tres géneros: alfapapilomavirus, betapapilomavirus y gamapapilomavirus. Anteriormente, el género alfapapilomavirus se encontraba predominantemente en mucosas y los géneros betapapilomavirus y gamapapilomavirus eran considerados cutáneos, sin embargo actualmente se han encontrado abundantes betapapilomavirus y gamapapilomavirus en la mucosa bucal. (Bottalico y cols, 2012; Bottalico y cols, 2011)

### **1.6.1 Organización genómica del VPH.**

Los papilomavirus tienen tamaño entre 55 y 60 nm, son simétricos e icosaédricos, no poseen envoltura, aunque si una cápside viral compuesta por una proteína mayor y una menor. Setenta y dos capsómeros rodean el ADN circular y doble hélice que comprende aproximadamente de 8 000 pares de bases (pb). (Rautava y Syrjänen, 2012; Bottalico y cols, 2011) Tomando como referencia al VPH-16, se distinguen tres regiones principales (temprana, tardía y región larga de control). En la región temprana (E) se encuentran todos los genes reguladores de la transcripción, replicación y ciclo viral; en la región tardía (L) se

encuentran los genes que codifican las proteínas mayor (L1) y menor (L2) de la cápside viral. La región larga de control (LCR) o región no codificante, de aproximadamente 1,000 pb, contiene los elementos cis-regulatorios de la transcripción viral, como el promotor (p97) y el origen de replicación (ori) (Bernard, 2005).

Como se observa en la Figura 1, la información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas de ADN, debido a que los genes tienen una sola orientación transcripcional, con sobreposición de algunos de ellos (Rautava y Syrjanen, 2012). Las proteínas de expresión temprana tienen funciones específicas (Rautava y Syrjanen, 2012):

- E1: inicia replicación viral, activa helicasa y mantiene el DNA viral en forma episomal.
- E2: participa en la transcripción y replicación viral.
- E4: facilita el empaquetamiento del genoma viral, interactúa con la helicasa del RNA y participa en la ruptura de citoqueratinas.
- E5: es una oncoproteína que permite la proliferación celular continua del huésped y retrasa su diferenciación.
- E6: oncoproteína principal que bloquea la regulación normal de la división celular normal del huésped, interactúa con diversas proteínas del huésped, conduce a la degradación de p53 y activa telomerasa.
- E7: considerada oncoproteína principal al igual que E6, se une a pRB-105, p130, p107 y también interactúa con diversas proteínas del huésped.

Estudios *in vitro* realizados en líneas celulares de cuello uterino han indicado que las propiedades oncogénicas de los tipos de VPH-AR pueden ser atribuidas principalmente a las proteínas E6 y E7, las cuales alteran la reparación del DNA y el control del ciclo celular mediante la interacción con los supresores tumorales p53 y Rb, respectivamente (Palefsky, 2006). E6 y E7 han demostrado inducir inestabilidad genética en cultivos celulares (Duensing y Munger, 2001) y desequilibrio cromosómico en el número de copias en cáncer cervical y anal (Palefsky, 2006; Skyldberg y cols, 2001; Hidalgo y cols, 2000)

Diversos estudios han demostrado que el DNA del VPH se integra al genoma de la célula huésped, con progresión de neoplasia intraepitelial cervical a cáncer cervical (von Knebel Doeberitz, 2002). Dicha integración se asocia con la pérdida de función de la proteína E2 del VPH. Bajo condiciones normales, la proteína E2 se une a los sitios de unión de E2 en la región larga de control del VPH, conduciendo a la represión de la expresión de E6 y E7 (Palefsky, 2006; Nishimura y cols, 2000). El VPH normalmente existe como un episoma circular de doble cadena y para integrarse al genoma humano, debe linealizarse, lo cual realiza mediante la ruptura del marco abierto de lectura (open reading frame: ORF) de E2. La integración puede conducir a bajos niveles de expresión de E2, con pérdida de la represión mediada por E2 de la expresión de E6 y E7, lo cual conduce a inestabilidad cromosómica incrementada (Palefsky, 2006).

### **1.7 Interacción de VPH con el virus de VIH en individuos VIH-positivos**

La historia natural de la infección por VPH en pacientes que padecen VIH es diferente de quienes no lo padecen, presumiblemente debido al compromiso de la inmunidad. Diversos estudios han demostrado que individuos VIH-seropositivos tienen mayores tasas de ser

portadores subclínicos de VPH en comparación con individuos VIH negativos (Cameron y Hagensee, 2008; D'Souza, 2007; Palefsky, 2006; Kreimer, 2004; Coutlee, 1997).

Se ha sugerido que el VIH potencializa la enfermedad asociada a VPH, debido a que la respuesta inmune a VPH podría jugar un papel crítico en el control de la infección por VPH tanto en individuos sanos como en VIH positivos (Palefsky, 2006).

Diversos mecanismos pueden explicar el incremento en la prevalencia de la enfermedad asociada a VPH en individuos VIH positivos, como la interacción directa entre los dos virus, respuesta inmune atenuada y la inestabilidad cromosómica. El VIH puede interactuar con el VPH a nivel molecular mediante la acción de la proteína *tat* del VIH-1, la cual transactiva la LCR del VPH *in vitro*, conduciendo a mayor expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH (Kim y cols, 2008; Palefsky, 2006). Sin embargo, no existe evidencia en cuanto a la infección permanente de epitelio anogenital o bucal donde reside el VPH, y no existe evidencia de co-infección en los queratinocitos infectados. Además, la co-infección no es necesaria *per se*, ya que la proteína VIH-1 *tat* puede ser secretada por las células infectadas por el VIH y tomada por los queratinocitos infectados por el VPH, adicionalmente la presencia de la proteína VIH-1 *tat* no ha sido demostrada en epitelio infectado por VPH *in vivo*. (Palefsky, 2006).

### **1.8 Diagnóstico molecular del VPH**

El método que se utilice para purificar DNA reviste gran importancia en la detección del DNA genómico del VPH y también puede afectar el índice de detección del virus, lo cual ha contribuido sustancialmente a las inconsistencias reportadas en la literatura. (D'Souza y cols, 2005) En la actualidad los métodos usados para el diagnóstico de la infección por VPH se basan principalmente en la detección del DNA viral y han sido agrupados en ensayos de alta

(PCR, 37.1%), moderada (Southern blot, 25.2%) y baja sensibilidad (hibridación *in situ* o inmunohistoquímica, 16.9%) (Remmerbach y cols, 2004; Miller y White, 1996). La técnica de PCR ha sido la técnica más utilizada para la detección de DNA-VPH, entre otras cosas, por su accesibilidad y bajo costo (Molijn y cols, 2005). En muestras de mucosa bucal la técnica de PCR anidada con oligonucleótidos GP5+/6+ es actualmente el método más sensible (65%) y reproducible (Remmerbach y cols, 2004).

## **1.9 p16<sup>INK4a</sup>**

Los genes CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>) localizados en el cromosoma 9p21, (Calmon y cols, 2007; Kresty y cols, 2002) pertenecen a una familia de reguladores negativos del ciclo celular, denominados inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Calmon y cols, 2007; García-Foncillas y cols, 2000).

La proteína p16<sup>INK4a</sup> es un regulador negativo del ciclo celular, el cual asegura control del paso de la fase G1 a la fase S. Estímulos mitogénicos y factores de crecimiento determinan la activación de ciclina D, la cual une y activa a las cinasas dependientes de ciclina 4 y 6, resultando en la fosforilación de la proteína retinoblastoma, seguida de la liberación del factor de transcripción, lo cual resulta en la proliferación celular (Dragomir y cols, 2012).

La replicación celular se controla mediante un mecanismo complejo que implica varias rutas de regulación en la célula. Una de estas rutas, la ruta de la proteína retinoblastoma (pRB), controla la progresión del ciclo de la célula, y por lo tanto, la proliferación celular. En condiciones normales, la pRB se une al factor de transcripción E2F, lo cual produce el efecto de bloquear la transcripción de los genes que estimulan la progresión del ciclo celular y su

proliferación, pero también, la codificación del gen para el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, p16<sup>INK4a</sup>. De esta manera, en condiciones normales, la unión del factor de transcripción E2F por el pRB es uno de los mecanismos de control fundamentales para prevenir la replicación y proliferación continua de las células (Witkiewicz y cols, 2011; von Knebel Doeberitz, 2002). Cuando E2F se separa de pRB, se pierde el efecto bloqueante en la transcripción del gen p16<sup>INK4a</sup>, lo que conduce a la producción de la proteína funcional p16<sup>INK4a</sup> ("INK4a", que se origina a partir del "inhibidor de la quinasa 4"), la cual inhibirá la actividad fosforilante de cdk4/6, complejo de ciclina D. Por lo tanto, cambia el balance del pRB fosforilado (inactivo; incapaz de unirse a E2F) a un pRB no fosforilado (funcional; capaz de unirse a E2F). Este complejo control de retroalimentación representa uno de los mecanismos clave sobre cómo las células establecen de manera efectiva el equilibrio correcto entre la progresión/proliferación de la célula y la detención del ciclo celular. (Witkiewicz y cols, 2011; von Knebel Doeberitz, 2002).

### **1.9.1 Expresión inmunohistoquímica de p16<sup>INK4a</sup>**

La expresión de p16<sup>INK4a</sup> en los tejidos ha sido evaluada mediante estudios genéticos (Fonseca-Silva y cols, 2012; Dong y cols, 2012; von Zeidler y cols, 2004; Tsai y cols, 2001) o con tinción inmunohistoquímica (Gröbe y cols, 2013; Hoffmann y cols, 2012; Nasser y cols, 2011; Pérez-Sayáns y cols, 2011; Poomsawat y cols, 2011, Tarakji y cols, 2010; Ang y cols, 2010; Klingenberg y cols, 2010; Nemes y cols, 2006; Klussmann y cols, 2003), siendo la última la más empleada para su estudio.

Si bien en la mucosa bucal normal se ha reportado desde la ausencia de su expresión inmunohistoquímica (Tarakji y cols, 2010; Buajeeb, 2009; Angiero y cols, 2008) hasta el

14.2% (Chen y cols, 1999), existen diversas razones por las cuales los tejidos pueden mostrar sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> (Rautava y Syrjanen, 2012; Hoffmann y cols, 2012; Witkiewicz y cols, 2011; Poomsawat y cols, 2011, Tarakji y cols, 2010; Ang y cols, 2010; Klingenberg y cols, 2010; Klusmann y cols, 2003). Ejemplo de ello son algunos estados de estrés celular, entre los cuales se incluyen daño al DNA, estrés oncogénico, envejecimiento celular, estímulos mitogénicos prolongados y en la senescencia celular. Por otro lado, de acuerdo a la función de p16<sup>INK4a</sup> como gen supresor tumoral, se ha demostrado su sobreexpresión en diversos tipos de cáncer y estados premalignos, con la finalidad de controlar la proliferación celular (Witkiewicz y cols, 2011; Klingenberg y cols, 2010; de Jonge y cols, 2009; Bartkova y cols, 2006; Ressler y cols, 2006; Collado y cols, 2005; Kim y cols, 2002; Serrano y cols, 1997).

En cuanto al patrón de expresión inmunohistoquímica, en estados hiperproliferativos se ha identificado inmunotinción nuclear, citoplasmática, así como en ambos sitios de manera simultánea (Tarakji y cols, 2010). En la mayoría de lesiones premalignas y malignas se han identificado patrones de inmunodetección citoplasmática y nuclear simultáneamente (Reuschenbach y cols, 2013; Lingen y cols, 2013; Heath y cols, 2012; Fonseca-Silva y cols, 2012; Pannone y cols, 2012; Hoffman y cols, 2012; Harris y cols, 2011; Smith y cols, 2008; Saito y cols, 1999; Chen y cols, 1999; Warnakulasuriya y cols, 1998) (Angiero y cols, 2010; Buajeeb y cols, 2009; Cunningham y cols, 2006; Gologan y cols, 2005), en contraste con algunos estudios que reportan solo inmunodetección nuclear (Angiero y cols, 2008; Shah y cols, 2007; Nemes y cols, 2006; Paradiso y cols, 2004; Huang y cols, 2002; Kim y cols, 2000).

Se cree que las alteraciones de p16<sup>INK4a</sup> son eventos importantes en la carcinogénesis de cabeza cuello, (Hoffmann y cols, 2012; Sailasree y cols, 2008; Calmon y cols, 2007; Kresty y cols, 2002) particularmente por su papel en cáncer orofaríngeo, (Reimers y cols, 2007); sin embargo, su papel en cáncer bucal ha sido poco estudiado (Hoffmann y cols, 2012; Pérez-Sayáns y cols, 2011; O'Regan, 2008; Nemes, y cols, 2006) y ha tenido resultados variables en diferentes estudios, de los cuales algunos reportan subexpresión (Hoffmann y cols, 2012; Pérez-Sayáns y cols, 2011; Muirhead y cols, 2006; Ai y cols, 2003; Pande y cols, 1998) con frecuencias bajas como el 13% (Muirhead y cols, 2006) de muestras positivas y otros sobreexpresión (Hoffmann y cols, 2012; Pérez-Sayáns y cols, 2011; Gologan y cols, 2005; Paradiso y cols, 2004) con frecuencias de hasta el 100% (Gologan y cols, 2005) de las muestras positivas.

La disminución en la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y su silenciamiento epigenético se asocia con cáncer bucal y precáncer, y su inactivación se cree es un evento temprano y gradual en las lesiones premalignas, mientras avanza el estadio del tumor y el grado de displasia, lo cual se asocia ocasionalmente con ciertos parámetros clínicos y patológicos o la expresión de otras proteínas reguladoras del ciclo celular. (Hoffmann y cols, 2012; Pérez-Sayáns y cols, 2011; Angiero y cols, 2008; Kresty y cols, 2008; Takeshima y cols, 2008; Schwarz y cols, 2008; Uzawa y cols, 2007; Vairaktaris y cols, 2007; Bradley y cols, 2006; Papadimitrakopoulou y cols, 1997)

### **1.9.2 El papel de p16<sup>INK4a</sup> como biomarcador de VPH-AR**

En cáncer cérvico uterino (CaCU) y lesiones precursoras de cuello uterino, (Houghton y cols, 2010; Fischer y cols, 2010a y 2010b; Tsoumpou y cols, 2009; Nehls y cols, 2008; Tsai y cols, 2005) la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> detectada mediante inmunohistoquímica, representa un marcador sustituto de la presencia de VPH de alto riesgo, identificándose sobreexpresión de hasta un 90% de los casos de CaCU (Nehls y cols, 2008).

La integración del DNA del VPH-AR a la célula huésped conduce a la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (Pérez-Sáyánz y cols, 2011; Singhi y cols, 2010; Wiest y cols, 2002). A este respecto, existe evidencia biológica de que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR producen immortalización y transformación de los queratinocitos de la mucosa bucal, lo que sugiere que la presencia del virus constituye un factor importante en la etiología del cáncer bucal (Rautava y Syrjanen, 2012; Oda y cols, 1996; Sexton y cols, 1993). E7 se une a pRb, evitando la función de ésta última, liberando el factor de transcripción E2F y conduciendo a degradación de pRb (Witkiewicz y cols, 2011; Münger y cols, 1989; Dyson y cols, 1989) la pérdida de ésta última genera estrés oncogénico, el cual conduce a la expresión de p16<sup>INK4a</sup> (Witkiewicz y cols, 2011; Tort y cols, 2006), debido a la pérdida de la retroalimentación negativa por parte de pRB (Klussmann y cols, 2003).

Algunos informes reportan que los pacientes con cáncer bucal y orofaríngeo (CByO) con infección por VPH, muestran distintas características en comparación a los carcinomas no asociados a la infección, observándose en los primeros: la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> (Shoushtari y cols, 2010; Fakhry y cols, 2008), disminución de la expresión de p53, menores niveles de mutación y pérdida de cromosomas; histológicamente pobremente diferenciados y

no queratinizados, y que además se asocian a otros factores de riesgo diferentes al tabaquismo y alcoholismo (Hennessey y cols, 2009). La mayoría de los estudios han observado una estrecha relación entre la presencia de VPH y la sobreexpresión de p16<sup>INK4A</sup> (Angiero y cols, 2010; Kong y cols, 2009; Cunningham y cols, 2006) por lo que se ha sugerido que podría ser usado como un marcador surrogado de la infección por VPH (Goon y cols, 2009; Gillespie y cols, 2009). En carcinomas escamocelulares bucales (OSCC) VPH+ (Pannone y cols, 2012) y en displasias VPH positivas (VPH+) de moderado y alto grado en la mucosa bucal (Angiero y cols, 2010; Cunningham y cols, 2006), se ha reportado la expresión de p16<sup>INK4a</sup> hasta en el 100% de los casos. En contraste otros estudios realizados en OSCC VPH+, han reportado frecuencias de positividad desde 12.9% (Nemes y cols, 2006) hasta 58.33% (Chen y cols, 2012) de los casos. A este respecto, algunos estudios han relacionado la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> con el VPH-AR (Angiero y cols, 2010; Cunningham y cols, 2006), mientras que otros lo refieren como poco confiable (Gröbe y cols, 2013; Chandarana y cols, 2012; Hoffman y cols, 2012; Harris y cols, 2011).

Aunado a lo anterior, se sabe que las neoplasias VPH+ con una expresión aumentada de p16<sup>INK4A</sup> tienen una mejor respuesta al tratamiento y ofrecen una mayor sobrevida. (Śnietura y cols, 2012; Reimers y cols, 2007). La estrecha relación entre la infección por VPH y esta importante vía de control celular puede ser una herramienta útil para predecir tanto la transformación maligna como la posible respuesta al tratamiento. (Weinberger y cols, 2006)

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En los últimos años se ha referido un aparente aumento en la frecuencia de LB-VPH en pacientes con VIH/SIDA; algunos trabajos indican que en los pacientes inmunosuprimidos o con VIH/SIDA, las LB-VPH pueden presentar características clínicas e histopatológicas diferentes. Adicionalmente, se ha identificado en pacientes con VIH/SIDA, VPH de alto riesgo oncogénico, tanto en mucosa bucal sana como en las LB-VPH; sin embargo, se desconoce el riesgo de malignización de éstas lesiones, que desde 1980 no han sido caracterizadas clínica o histopatológicamente.

La expresión de p16<sup>INK4A</sup> ha sido empleada como biomarcador de VPH-AR en CaCu, en displasia epitelial y carcinoma escamocelular, sin embargo la inmunodetección en mucosa bucal no ha arrojado resultados concluyentes.

Por lo anterior, en este trabajo se caracterizó clínica e histopatológicamente un grupo de LB-VPH en individuos con VIH/SIDA, los tipos virales asociados con su desarrollo, y la detección de p16<sup>INK4a</sup> a través de inmunohistoquímica.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El aparente aumento en la frecuencia de LB-VPH, así como la identificación de VPH-AR en ellas, enfatiza la necesidad de búsqueda de marcadores de malignidad que pudieran ser de utilidad en una mayor comprensión de su patogénesis.

En los pacientes con VIH/SIDA, estas lesiones pueden ser floridas, dolorosas, estigmatizantes y de difícil manejo. Considerando el aumento en incidencia de diversos tipos de cáncer en VIH/SIDA, y la sobreexpresión de p16<sup>INK4A</sup> asociada con la transformación maligna, los resultados del presente trabajo brindan información sobre la naturaleza de éstas condiciones, y permitirán conocer sus características clínicas e histopatológicas.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar la inmunodetección de p16<sup>INK4A</sup> y caracterizar clínica e histopatológicamente las LB-VPH provenientes de pacientes con VIH/SIDA, y su asociación con los tipos de VPH y otras variables clínicas de importancia como categoría de transmisión, consumo de tabaco y alcohol, linfocitos CD4+, carga viral, uso y tiempo TARAA.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Identificar los tipos de VPH presentes en las LB-VPH.
- Identificar la proporción de VPH de alto riesgo presente en las LB-VPH en individuos infectados con VIH.
- Estimar la posible asociación entre el diagnóstico histopatológico y los tipos virales.
- Estimar la asociación entre la inmunodetección de p16<sup>INK4A</sup> de las LB-VPH y características clínicas relevantes (edad, categoría de transmisión, consumo de tabaco y alcohol, linfocitos CD4+, carga viral, tiempo y tipo de TARAA, más de una LB-VPH, diagnóstico histopatológico y localización de LB-VPH).
- Estimar la posible asociación entre la inmunodetección de p16<sup>INK4A</sup> y los tipos de VPH.

## **6. MÉTODO**

### **6.1 Diseño del estudio**

El presente es un estudio transversal, observacional y analítico, en el que se incluyeron de forma consecutiva pacientes infectados con VIH/SIDA, que acudieron a la Consulta de Patología y Medicina Bucal de la UAM-X de tres centros de referencia: la Clínica Especializada Condesa (CEC), el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, de la ciudad de México, con diagnóstico confirmado de LB-VPH en el periodo comprendido de enero de 2009 a enero de 2012. Los pacientes incluidos se seleccionaron de una cohorte de individuos con VIH/SIDA que acuden a estos centros de referencia como parte de su atención integral.

### **6.2 Sujetos participantes**

Se incluyó de manera consecutiva a todos los pacientes con infección confirmada por VIH, que acudieron a la consulta de Patología y Medicina Bucal de los tres centros de referencia para VIH/SIDA mencionados, y que previo consentimiento informado por escrito, aceptaron participar en el estudio y la toma de biopsia.

#### **6.2.1 Criterios de inclusión.**

- Individuos adultos con infección confirmada por VIH, con LB-VPH.
- Individuos que autorizaran por escrito el consentimiento informado de participación en el estudio.
- Consentimiento para toma de biopsia de la lesión bucal.

### **6.2.2 Criterios de exclusión.**

- Individuos con tratamiento tópico (5-Fluoracilo, Imiquimod, Cidofovir) o sistémico (Aciclovir, Cidofovir, Interferón- $\alpha$ , Cimetidina) de lesiones por VPH que pudieran alterar los resultados.

### **6.2.3 Criterios de eliminación.**

- Individuos con lesiones bucales que al estudio histopatológico no correspondan con LB-VPH.
- Muestras inadecuadas para el estudio inmunohistoquímico y molecular.

## **6.3 Aspectos éticos**

De acuerdo con el artículo 17 del reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud, se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. El presente trabajo se clasifica en la categoría III (Investigación con riesgo mayor que el mínimo), ya que incluye procedimientos quirúrgicos, los cuales en el presente estudio consisten en la toma de biopsia con sacabocados de la o las LB-VPH presentes en mucosa bucal. Es importante mencionar que la biopsia por sacabocados es un procedimiento de riesgo mínimo y adicionalmente, se tuvieron todos los cuidados pre-quirúrgicos necesarios, entre los que destaca valoración exhaustiva de estudios de laboratorio, adecuado control de barreras, previa asepsia y antisepsia, control de hemostasia, así como indicaciones post-operatorias, con la finalidad de proteger al paciente de cualquier complicación.

## **6.4 Procedimientos clínicos**

A todos los individuos participantes se les proporcionó una carta consentimiento (Anexo III) en la que se explican las condiciones del estudio. Se solicitó a cada participante leyera la carta de consentimiento, se contestaron dudas respecto al estudio y se pidió firmara 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. La participación de los pacientes fue totalmente voluntaria. El paciente podría suspender su participación en cualquier momento, sin que se afectara su atención institucional.

### **6.4.1 Cuestionarios**

Posteriormente, a cada individuo se le aplicó un cuestionario (Anexo IV) que incluyó variables consideradas de importancia para el estudio (edad, ocupación, escolaridad, lugar de residencia, tabaco, alcohol, categoría de transmisión, empleo de antirretrovirales). Los datos relativos a la fecha de diagnóstico, tipo y tiempo de uso de TARAA, niveles de linfocitos CD4+, carga viral y estadio CDC, fueron recolectados del expediente clínico del paciente.

### **6.4.2 Examen bucal**

Se realizó la exploración bucal por zonas topográficas en los pacientes bajo un orden sistemático (Ramírez-Amador y cols, 1986) (Anexo V). Se realizó el diagnóstico clínico presuntivo correspondiente (papiloma escamocelular, verruga vulgar, hiperplasia epitelial multifocal o condiloma acuminado) de acuerdo a criterios clínicos pre-establecidos. (Anexo VIa).

Se registraron las características clínicas de la o las LB-VPH (color, textura, apariencia, extensión, tamaño y localización), Así mismo, se realizó la toma de fotografías intrabucales necesarias, con previa autorización del paciente.

#### **6.4.3 Toma de biopsia**

Previa asepsia y antisepsia, y bajo anestesia local, se tomó una biopsia excisional de las lesiones por medio de sacabocados desechables, de acuerdo al tamaño de la misma (4, 5, 6 u 8 mm), la cual se dividió en dos partes, una sección se utilizó para el estudio histopatológico y de inmunohistoquímica (fijando con formalina al 10%), la segunda se introdujo en un tubo cónico con 5 ml de PrecervCyt (Cytoc Corp/Boxborough Ma,USA), para el análisis de los tipos virales.

#### **6.5 Procedimientos de laboratorio**

Las biopsias fijadas se procesaron en el laboratorio de Histopatología UAM-X, se obtuvieron cortes al micrótopo de 4  $\mu$ m, se colocaron en portaobjetos y fueron teñidas con hematoxilina y eosina. 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) y en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología y Medicina bucal del posgrado de la UAM Xochimilco.

##### **6.5.1 Criterios histopatológicos.**

Se llevó a cabo el estudio histopatológico mediante observación al microscopio óptico en el servicio de Diagnóstico Histopatológico del Posgrado de Patología y Medicina Bucal UAM-X. Los diagnósticos fueron revisados a ciego por una especialista en Patología y Medicina

bucal (ERT) por segunda ocasión y confirmados de acuerdo con criterios histopatológicos pre-establecidos descritos en el Anexo VIb.

### **6.5.2 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/WI, USA), de acuerdo a la estandarización de la técnica para células de la mucosa bucal. (Tsoumpou I y cols, 2009)

Para la extracción de ADN de tejido fresco se colocaron las muestras en un tubo eppendorff de 1.5 ml, se centrifugaron durante 5 minutos a 16,000 rpm, se decantó el PrecervCyt, y se dejaron destapados los tubos durante 12 horas para su secado. Se añadieron 300 µl de solución lítica nuclear, resuspendiendo varias veces el contenido del tubo, el cual fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml; se colocó la pastilla obtenida y se le añadieron 17.5 µl de proteinasa-k (20 mg/ml) incubándose a 65°C en por 3 hrs. Se llevó a temperatura ambiente y se agregaron 1.5 µl de RNAsa, incubando a 37° C durante 30 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl de solución precipitadora de proteínas, se agitó en el vórtex 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 agregó 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, se centrifugó por 5 minutos. Se aspiró el etanol usando una pipeta de secuencia y se invirtieron los tubos destapados sobre una servilleta limpia hasta que se secaron por completo. Se

añadieron 30  $\mu$ l 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  $\mu$ l.

Para la extracción de ADN de tejido en parafina, se utilizó el kit QIAmp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Duesseldorf/Alemania) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se realizaron cortes con el micrótopo de 4 a 5 secciones de 3  $\mu$  de grosor, dependiendo de la cantidad de tejido del bloque y se descartó la primera sección por estar expuesta al aire. Se limpió la navaja del microtopo con alcohol entre bloque y bloque. Inmediatamente se colocaron las secciones a utilizar en un tubo eppendorf y se agregó 1 ml de xileno, se agitó en vórtex durante 10 segundos, se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante con pipeta sin tocar la pastilla. Con la finalidad de remover el exceso de parafina, se agregó nuevamente 1 ml de xileno, se agitó durante 10 segundos en vórtex, se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante con la pipeta, teniendo cuidado de no tocar la pastilla. Se agregó 1 ml de etanol de 96-100% grado molecular y se agitó en vórtex por 30 segundos (para extraer los residuos de xileno). Se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad y temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante, sin tocar la pastilla y los residuos de etanol se retiraron con una punta de pipeta fina. Se incubó a 37°C con el tubo destapado por 10 minutos o hasta que el etanol se hubiera evaporado. Se resuspendió la pastilla en 180  $\mu$ l de buffer de lisis de tisular ATL, se agregaron 25  $\mu$ l de proteinasa K y se mezcló en vórtex. Se incubó a 56 °C en el termoblock por 1 hora o hasta que el tejido se lisó completamente. En los casos en los que no se lisaron en 4 horas, se agregó 20  $\mu$ l de proteinasa K y se dejó toda la noche. Una vez lisado el tejido, se incubó a 90°C durante 1 hora. La incubación a 90°C en buffer de lisis tisular ATL

reverte parcialmente la modificación de formaldehído de los ácidos nucleicos. En las situaciones en las cuales solo se tenía un bloque de calentamiento, se dejó la muestra a temperatura ambiente después de la incubación a 56°C, hasta que el bloque alcanzara la temperatura de 90°C. Se centrifugó brevemente el tubo eppendorf para remover las gotas del interior de la tapa. Una vez que la muestra estaba a temperatura ambiente, se agregaron 2 µl de RNasa A (100 mg/ml) y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de buffer de lisis AL (para la purificación de ADN) a la muestra, y se mezcló vigorosamente en el vórtex. Se agregaron 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcló de nuevo vigorosamente en el vórtex. Es esencial que el buffer de lisis AL y el etanol de la muestra se mezclen inmediatamente y vigorosamente por vórtex o pipete con la finalidad de lograr una solución homogénea. Se centrifugó brevemente el tubo eppendorf para remover las gotas dentro de la tapa. Se transfirió cuidadosamente la totalidad del lisado a una columna con tubo colector, sin mojar el arillo, se tapó la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo y se descartó el tubo colector con el contenido del fluido. En los casos en los que el lisado no pasó completamente a través de la membrana después de la centrifugación, se centrifugó nuevamente a una mayor velocidad hasta que la columna se encontrara vacía. Se agregaron 500 µl de buffer AW1 sin mojar el arillo. Se tapó la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo y descartó el tubo colector con el contenido del fluido. Se agregaron 500 µl de buffer AW2 sin mojar el arillo. Se tapó la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo y se descartó el tubo colector con el contenido del fluido. Se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos para secar la membrana completamente y se transfirió la columna a un tubo

ependorf limpio, se cortó la tapa de la columna y se descartó el tubo colector con el contenido del fluido. Se agregaron 25 µl de buffer ATE en el centro de la membrana, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se agregaron otros 25 µl de buffer ATE en el centro de la membrana, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Finalmente, el ADN obtenido se almacenó a -20°C para su análisis posterior.

### **6.5.3 Cuantificación de ADN**

La cuantificación del ADN obtenido se llevó a cabo mediante el espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000 ® (Thermo Scientific/Waltham, MA/USA) y la exportación de datos se realizó con el software incluido con el mismo (NanoDrop 2000/2000c).

### **6.5.4 Reacciones de PCR**

Se llevó a cabo de manera automatizada mediante un termociclador Mastercycler® gradient, (Eppendorf/Westbury, NY/USA). En cada una de las reacciones de PCR, se incluyeron de manera sistemática dos tipos de controles; uno positivo (ADN de líneas celulares HeLa [VPH-18] en la amplificación de la región L1 y SiHa [VPH-16] para E6 de VPH-16); y otro negativo (mezcla de reacción con agua).

Las muestras fueron sometidas a amplificación aleatoriamente, y de forma ciega al diagnóstico clínico e histopatológico. Se procuraron también precauciones universales para los procedimientos de PCR, como el hecho de que la preparación de las mezclas, la amplificación y la electroforesis sean realizadas en cuartos diferentes. Las condiciones utilizadas en cada una de las reacciones de PCR se describen en el Anexo VII. (Manos y cols, 1989) (Resnick y cols, 1990)

### **Amplificación del gen $\beta$ -globina**

Con la finalidad de comprobar que el material obtenido durante la extracción sea adecuado para utilizarse en PCR, a todas las muestras se les amplificó un fragmento del gen  $\beta$ -globina, el cual es un gen altamente conservado en las células humanas. Para ello, 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'

### **Amplificación de la región L1 de Papilomavirus**

Posteriormente, se amplificaron las muestras con los oligonucleótidos universales MY09/MY11, localizados dentro de la región L1 del genoma del VPH e incluye los nucleótidos 6722 al 7170 del VPH-16, y las regiones correspondientes a otros tipos virales. Estos oligonucleótidos son capaces de detectar más de 25 tipos virales; dando un fragmento aproximado de 450 pb:

\*MY09 5'- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC -3'

\*MY11 5'- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GC -3'

\* Código de oligonucleótidos degenerados: M=A+C. R=A+G, W=A+T, Y=C+T

Considerando que la utilización de distintos juegos de oligonucleótidos universales que reconocen la región L1 del VPH mejora la detección viral, (Anaya-Saavedra y cols, 2008) (Remmerbach y cols, 2004) (Carrillo y cols, 2004) todas las muestras fueron sometidas a amplificación con los oligonucleótidos universales GP5+/GP6+, 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'

### **Amplificación del gen E6 de VPH-16 y VPH-18**

Con la finalidad de identificar tipos virales específicos de alto riesgo, se efectuó la amplificación de E6 para VPH 16 y VPH 18. La amplificación del gen de la región E6 del VPH 16 y VPH-18 se realizó con los oligonucleótidos específicos F204/R419 para VPH-16, (215 pares de bases) y para VPH-18 se utilizaron los oligonucleótidos específicos HZ30/E65 (480 pares de bases).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l, el cual incluye 4  $\mu$ l de ADN extraído como templado (100 ng), 10  $\mu$ l de Master Mix (Promega, USA) a 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4  $\mu$ l de cada oligonucleótido y 5.2  $\mu$ l de agua.

Las condiciones utilizadas para los cinco juegos de oligonucleótidos se llevaron a cabo de manera similar, donde la única variación fue la temperatura de fusión de los oligonucleótidos (T<sub>m</sub>), la cual fue 55°C para  $\beta$ -globina, MY09/11 y E6 de VPH-16; 48°C para GP5+/6+ y 59°C para E6 de VPH-18. Como primer paso se llevó a pre-calentamiento por 10 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a T<sub>m</sub>, 45 seg a 72°C, extensión final de 7 min a 72°C y por último mantenimiento a 4°C.

### **6.5.5 Purificación de productos de PCR**

Los productos de PCR positivos a la VPH, se purificaron con el kit DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-5 (Zymo Research Corp/USA), antes de someterlo a secuenciación.

El búffer de lavado fue reconstituido con etanol absoluto de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Cada producto de PCR fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml, al cual se le

agregó 5 volúmenes de Binding Buffer por cada volumen de producto de PCR y se mezclaron en vórtex.

Se transfirió cuidadosamente la totalidad de la mezcla a una columna con el respectivo tubo colector de 800  $\mu$ l, se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 segundos y se desechó el fluido de tubo colector.

Con la finalidad de lavar el DNA, se agregaron 200  $\mu$ l de solución de lavado de DNA a la columna, se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 segundos, se desechó el fluido del tubo colector y se repitió por segunda ocasión éste paso de lavado.

Se agregaron 12  $\mu$ l de solución DNA Elution Buffer (Tris-HCl 10 Mm, pH 8.5, EDTA 0.1 mM) directamente a la matriz de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante un minuto. Por último se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 segundos para eluir el DNA y obtener de ésta manera, DNA ultra puro.

#### **6.5.6 Secuenciación**

Las muestras se enviaron a un servicio externo (Macrogen Inc., Seúl/Corea), para secuenciación automática, a través del sistema BigDye (Applied Biosystems) mediante electroforesis capilar con ABI3730XL (Macrogen Inc, Seúl/Corea). Las secuencias se analizaron con el software 4Peaks (Mekentosj, Países Bajos/Amsterdam) y se compararon con la base de datos de GenBank (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, MD) utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 6.5.7 Ensayo de inmunohistoquímica

Se realizaron cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron colocados en laminillas con polilisina. Para la inmunotinción se empleó el sistema automatizado Ventana Benchmark GX (Roche ®), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo monoclonal de ratón anti-p-16 (SAB3300036 Sigma, monoclonal anti-P16 antibody, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), con una dilución 1:250. Y se utilizó el siguiente programa:

- 1) Desparafinado: EZ prep: 30 min a 76° C.
- 2) Acondicionamiento celular: acondicionador No.1, suave 8 min; CC1, suave 30 min.
- 3) Titulación de p16<sup>INK4a</sup>: incubación del anticuerpo a 37° C, 32 min.
- 4) Ultralavado.
- 4) Contratinción con hematoxilina: 4 min.
- 5) Postcontratinción: Bluing Reagent1: 4 min

Finalmente se lavaron las muestras con jabón y agua corriente en dos cambios; se permitió secar al aire libre y se montaron las laminillas con resina y cubreobjetos.

Como control negativo del procedimiento se utilizó un carcinoma escamocelular de cavidad bucal negativo a p16<sup>INK4a</sup> y como control positivo CaCU positivo a VPH-AR.

### 6.5.8 Análisis de inmunodetección

El análisis fue realizado bajo acuerdo de tres examinadoras estandarizadas (ERT, VRA, GAS). Con el fin de obtener un parámetro de comparación en cuanto a la intensidad de la inmunodetección de la proteína, se analizó *a priori* la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en 17 muestras de mucosa bucal, de las cuales ocho eran de mucosa sana, ocho de hiperplasias fibrosas con epitelio íntegro, y un carcinoma microinvasor positivo a VPH-AR. Las muestras fueron

obtenidas del archivo de bloques de parafina del Departamento de Patología y Medicina bucal de la UAM Xochimilco; de las 17 muestras, fueron elegidas tres de mucosa bucal sana como las mas representativas de normalidad, y en base a las localizaciones en las que se presentan las LB-VPH con mayor frecuencia (mucosa yugal, lingual y labial).

Se elaboró una ficha de recolección de datos con el fin de recopilar la información sobre la expresión inmunohistoquímica de la proteína (Anexo VIII). Se tomaron 8 microfotografías de áreas representativas de cada lesión y los tejidos normales, cuatro a 20x (dos centrales y dos laterales) para la evaluación del porcentaje de inmunodetección e intensidad y cuatro a alta resolución (dos centrales y dos laterales) con la finalidad de confirmar el gradiente de intensidad y sobre cada microfotografía se colocó una gradilla de 6x6.

Los criterios de evaluación de las muestras en el presente estudio fueron basados en estudios previos realizados en mucosa bucal (Hoffmann y cols, 2012; Chandarana y cols, 2012; Fonseca-Silva y cols, 2012; Pérez-Sayáns y cols, 2011; Harris y cols, 2011; Poomsawat y cols, 2011; Queiroz y cols, 2010; Angiero y cols, 2010; Buajeeb y cols, 2009; Smith y cols, 2008; Nemes JA y cols, 2006; Cunningham y cols, 2006; Bradley y cols, 2006; Chen y cols, 1999; Saito y cols, 1999; Pande y cols, 1998; Warnakulasuriya y cols, 1998). Los criterios a evaluar fueron el porcentaje de expresión y la intensidad de la misma, los cuales fueron evaluados globalmente, y por estratos epiteliales (superficial, medio y basal). El porcentaje de expresión se estableció dividiendo el número de núcleos epiteliales con inmunodetección entre el número total de núcleos epiteliales visibles.

La intensidad de la tinción se obtuvo de manera semicuantitativa en una escala de tres niveles:

Grado 1: débil [+]

Grado 2: moderada [++]

Grado 3: alta [+++]

## **6.6 Variables**

Las variables a considerar fueron:

Variable dependiente: expresión e intensidad de p16<sup>INK4a</sup>.

Variables independientes: sexo, edad, ocupación, escolaridad, consumo de tabaco, consumo de alcohol, conteo de linfocitos CD4+, niveles de carga viral de VIH, categoría de transmisión; uso, tiempo de uso y tipo de TARAA, presencia de VPH, tipos de VPH, presencia de LB-VPH múltiples, diagnóstico histopatológico de LB-VPH, localización de LB-VPH.

## **6.7. Análisis estadístico**

Los datos de la ficha de recolección fueron codificados y capturados en el programa computacional SPSS (v.20) para su análisis de los datos.

Los datos descriptivos fueron descritos a través de medidas de tendencia central y su dispersión. Se obtuvo la frecuencia de las diferentes características demográficas y clínicas de importancia de los pacientes, características histopatológicas y tipos de las LB-VPH, así como de los tipos virales encontrados. Se analizó la asociación entre la intensidad de p16<sup>INK4a</sup> y las variables del estudio a través de una prueba de  $X^2$  o bien una prueba exacta de Fisher cuando fue necesario, y pruebas no paramétricas para el análisis de las variables continuas a través de la prueba de U de Mann Whitney; el nivel de alfa se estableció menor o igual a 0.05.

## 7. Resultados

En el presente estudio, se incluyeron 29 individuos con VIH/SIDA y LB-VPH, con una mediana de edad de 39 años (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>, 32.5-44) años. Veintisiete (93.1%) eran hombres, de quienes 25 (92.6%) eran hombres que tenían sexo con hombres (HSH). Más de la mitad de los pacientes no consumían tabaco (15/51.7%) o alcohol (16/55.2%) (Cuadro 1a).

Tres cuartas partes de los pacientes se encontraban en etapas avanzadas de la enfermedad (22/75.9%) y 26 (89.7%) usaban TARAA, con una mediana de uso de 16.5 (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>: 4.2-50.5) meses. El esquema más empleado incluía la combinación de NRTI y NNRTI (13/44.8%). La mediana de linfocitos CD4+ fue de 243 células/mm<sup>3</sup> (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>, 169-455.5); la tercera parte de los pacientes (10/34.5%) tenían menos de 200 células/mm<sup>3</sup>, y 19 de los 29 pacientes incluidos (65.5%) tenían niveles de VIH-ARN plasmáticos indetectables al momento de su inclusión en el estudio (Cuadro 1b).

### 7.1 Características clínicas e histopatológicas de LB-VPH.

De los 29 pacientes incluidos, se analizaron 36 LB-VPH, ya que cerca de dos terceras partes de los pacientes (18/62.1%) presentaron más de una LB-VPH. La mediana de uso de TARAA en ellos fue significativamente mayor (44 [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>: 8-87] meses) que en los que presentaron lesiones solitarias (7 [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>: 2-16] meses) (p=0.015); asimismo, una menor proporción de pacientes con más de una LB-VPH estaban en la categoría clínica de SIDA, en contraste con los que las presentaron en forma aislada (61 vs. 100%, p=0.026) (Figura 2).

El diagnóstico definitivo se obtuvo a través del examen histopatológico de las lesiones, siendo la lesión más frecuente la hiperplasia epitelial multifocal (17/47.2%), seguida del

papiloma escamocelular (13/36.1%), la verruga vulgar (5/13.9%) y el condiloma acuminado (1/2.8%). La mucosa labial (23/63.9%), fue el sitio más frecuentemente afectado, seguido de la mucosa yugal (6/16.7%), y la lengua (5/13.9%). El piso de la boca y el paladar duro fueron sitios poco afectados (1/2.8%, cada uno).

La concordancia entre el diagnóstico clínico y el histopatológico fue de 66% ( $\kappa=0.66$ ); la lesión en la cual se observó una diferencia mayor entre el diagnóstico clínico e histopatológico, fue la HEM. De las 17 HEM confirmadas microscópicamente, solo 12 fueron identificadas clínicamente (70.6%), cuatro tenían diagnóstico clínico de PEC, y una de VV. En contraste, se diagnosticaron clínicamente 16 PEC (13 histopatológicamente confirmados), 6 VV (5 confirmadas) y 2 CA (1 confirmado).

Las características histopatológicas evaluadas, se presentaron de manera muy evidente (\*\*\*) o estaban ausentes. Como se observa en el Cuadro 2, la mayoría de las LB-VPH presentaron hiperqueratosis (31/86.1%), hiperplasia basilar (29/80.6%), figuras mitosoides (28/77.8%) y en todos los casos se observaron coilocitos. En la hiperplasia epitelial multifocal (HEM), la presencia de figuras mitosoides (14/82.4%) y la hiperplasia basilar (14/82.4%) fueron características frecuentes (Figura 3a). En contraste, el epitelio plano hiperqueratinizado (100%), la hiperplasia basilar (92.3%) y el epitelio acantótico con proyecciones superficiales y marcada queratosis (11/84.6%), fueron las características que más se presentaron en el papiloma escamocelular (PEC) (Figura 3c). En las verrugas vulgares (VV), el epitelio plano hiperqueratinizado, acantótico con proyecciones superficiales y marcada queratosis, con criptas llenas de queratina y procesos elongados dirigidos hacia el centro fueron características constantes (Figura 3d y e).

## 7.2 Análisis molecular de las muestras.

La mediana de concentración de ADN obtenida en las muestras después de su extracción fue de 562.5 (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>: 178.2-1275.9) ng/μl. Todas las muestras fueron positivas a la amplificación del gen β-blobina, con lo cual se comprobó la calidad de ADN (Figura 4).

Todas las muestras amplificaron la región L1 de VPH mediante los oligonucleótidos GP5+/6+ (150 pb) (Figura 5a) y ocho de las 36 muestras (22.2%) con los oligonucleótidos universales MY09/11 (450 pb) (Figura 5b). Adicionalmente, una muestra (2.7%) resultó positiva a la amplificación del gen E6 del VPH-16 (F204/R419) (Figura 5c). No se obtuvo positividad en ninguna al utilizar los oligonucleótidos específicos HZ30/E65 para el gen E6 de VPH-18.

Treinta y una (86.1%) de las 36 muestras analizadas contenían VPH de bajo riesgo y 3 (8.3%) presentaron coinfección con tipos virales de alto y bajo riesgo (VPH-16, 32 y 42). Se identificaron dos secuencias correspondientes al papilomavirus LVX100 y al VPH-74, de los cuales no se tiene información sobre su potencial oncogénico. El tipo viral más frecuente fue el VPH-32 (44.4%), seguido por los tipos 13 (19.4%) y 6 (11.1%) (Cuadros 3 y 4) (Figura 6). No se identificó asociación estadísticamente significativa entre el riesgo oncogénico viral y el diagnóstico histopatológico ( $p=0.301$ ), ni entre el tipo viral y diagnóstico histopatológico ( $p=0.345$ ).

Como se observa en el Cuadro 3, se analizaron los tipos virales encontrados de acuerdo al tipo de LB-VPH. En la HEM, el tipo viral más frecuente fue el 32 (8/47%). Las cuatro (11.1%) muestras en las que se identificó infección múltiple correspondieron a HEM (VPH-16 y 32; VPH-13 y 74; VPH-16 y 32; y VPH-16 y 42). Respecto a los PEC, el tipo viral más

frecuente fue el 13 (5/38.4%), las cinco VV y el condiloma acuminado (CA) contenían secuencias de VPH-32.

Es importante mencionar que de los 18 pacientes que presentaron más de una LB-VPH, sólo a 5 pacientes se les realizó la biopsia de más de una lesión, resultando un total de 12 lesiones. Tres pacientes tuvieron diferentes diagnósticos histopatológicos (tres VV y una HEM; una HEM y una VV; una HEM y un PEC, respectivamente) con VPH-32 en todas las lesiones; un cuarto paciente tuvo dos lesiones con diagnósticos histopatológicos diferentes (HEM y PEC) y VPH-13 en ambas y el quinto paciente tuvo dos lesiones con el mismo diagnóstico histopatológico en ambas (HEM) con tipos virales diferentes en cada una, VPH-6 en una y VPH-32 en la otra (Cuadro 5).

Los cuatro pacientes en los que se identificó infección múltiple tenían conteos de linfocitos CD4+/mm<sup>3</sup> menores de 200 cel/mm<sup>3</sup>. De estas cuatro muestras, tres contenían secuencias de alto riesgo oncogénico y solo una presentaba VPH de bajo riesgo (p<0.001).

### **7.3 Análisis de expresión inmunohistoquímica de p16<sup>INK4a</sup>**

Como se observa en el Cuadro 6, la expresión global de p16<sup>INK4a</sup> en mucosa bucal normal varió de 67.6% a 84.9%. Al analizar por estratos, el porcentaje de inmunodetección disminuyó paulatinamente desde el estrato basal (90.5-100%) hasta los estratos superficiales (33.3-48.4%). Asimismo, la intensidad de los núcleos teñidos fue leve en los estratos medio y superficial de los tres tipos de mucosa bucal, y únicamente moderada en el estrato basal de la mucosa lingual y labial. (Figuras 7a y b).

En contraste con lo anterior, la proteína p16<sup>INK4a</sup> se encontró sobreexpresada en todas las LB-VPH, con una mediana de expresión nuclear global de 98.5% (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>: 97.5-99.0) (Cuadro 4), misma que se mantuvo en frecuencias elevadas al realizar el análisis por estratos. En el estrato basal se obtuvo 100% de inmunodetección, en el estrato medio una mediana de 99.5% (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>: 98.9-99.8), y en los estratos superficiales 91.3% (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>: 86.7-94.8).

En cuanto a la intensidad global de p16<sup>INK4a</sup> en las LB-VPH, la más frecuente fue la intensidad moderada, la cual se presentó en el 75% de los casos y el resto tuvieron intensidad alta (Cuadro 4) (Figuras 7c y d). Al analizar en las diferentes LB-VPH, la intensidad de p16<sup>INK4a</sup> por estratos (Cuadro 7), se observó que la intensidad moderada predominó en todos los estratos de las HEM y papilomas, en contraste con las verrugas y el condiloma acuminado, en los que predominó la intensidad alta en todos los estratos (60%). No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de inmunodetección con la intensidad de la proteína (p=0.168), consumo de tabaco (p=0.504), consumo de alcohol (p=0.661), categoría de transmisión (p=0.227), riesgo oncogénico del tipo viral (p=0.100), linfocitos T CD4+ (p=0.287), carga viral (p=0.343), estadio CDC (p=0.537), uso de TARAA (p=0.705), localización de LB-VPH (p=0.691) o la presencia de más de una LB-VPH (p=0.710). Finalmente como se observa en el Cuadro 8, tampoco se identificó asociación entre la intensidad de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y las características clínicas analizadas.

## 8. Discusión

En el presente estudio se encontró sobreexpresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup> en las lesiones bucales asociadas al VPH de pacientes con VIH/SIDA, independientemente del potencial oncogénico del tipo viral identificado y sin relación con las variables de interés en el estudio. Adicionalmente, una alta proporción de las muestras contenían VPH de bajo riesgo oncogénico, el 44.4% correspondieron a VPH-32. Clínicamente, se observó que más de la mitad (62%) (18/29) de los pacientes tenían más de una LB-VPH, siendo la hiperplasia epitelial multifocal la lesión más frecuente. Los cuatro pacientes que presentaron infección múltiple, tenían una inmunosupresión severa ( $<200$  CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) y en tres cuartas partes de ellos se identificaron secuencias de VPH-AR .

La mayoría de los pacientes incluidos (90%) fueron hombres jóvenes (32-44 años), lo cual es similar a la información sobre la epidemia del VIH/SIDA reportada en México (CENSIDA Reporte Final, 2012) y en el mundo (UNAIDS, 2012). En México, hasta noviembre del 2012, el 80.2% de las personas que vivían con VIH/SIDA eran hombres, y el 76.3% se encontraba entre los 20 y 44 años de edad (CENSIDA, Reporte Final 2012).

Más del 90% de los pacientes incluidos en el estudio eran HSH; si bien en México, se calcula que cerca del 54% de los hombres con VIH/SIDA pertenecen a esta categoría de transmisión (CENSIDA Reporte Final, 2012), la frecuencia de HSH en pacientes con VIH/SIDA y LB-VPH informada en estudios previos, es alta encontrándose de 71.1% (King y cols, 2002) a 94.5% (Anaya-Saavedra y cols, 2013). Se ha sugerido que la conducta sexual pudiera ser un factor de riesgo para la adquisición de la infección por VPH en la mucosa bucal de pacientes con VIH (Kreimer y cols, 2004).

El 34.5% de los pacientes incluidos fumaban, y se encontraban entre los 26 y los 54 años de edad), proporción mayor al 16% reportado en la Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos de México para este grupo de edad (GATS, 2009). Un estudio reciente realizado en población mexicana con VIH/SIDA (Anaya-Saavedra y cols, 2013), mostró una frecuencia de consumo de tabaco similar (36.4%); aunque estudios realizados en años previos (Ramírez-Amador y cols, 2006; Ramírez-Amador y cols, 1998) mostraban cifras mayores (48% al 61.4%).

La mayoría de los individuos (89.7%) del presente estudio, se encontraban utilizando TARAA. De acuerdo con estadísticas de UNAIDS, en el 2011, a nivel mundial, el acceso a antirretrovirales ha aumentado veinte veces desde el 2003 (UNAIDS, 2012). En México, al menos el 80% de los pacientes infectados con VIH/SIDA reciben tratamiento antirretroviral (UNAIDS, 2012) y CENSIDA estimó el 85% (CENSIDA, 2012). Y particularmente en la Clínica Especializada Condesa de la Ciudad de México, se atiende al mayor número de pacientes con VIH/SIDA en el país (uno de cada siete pacientes con VIH/SIDA del país recibe tratamiento gratuito en la CEC) (CEC, 2011). De acuerdo a datos de la CEC, al 31 de octubre de 2011, un total de 7,124 personas recibieron TARAA, de los cuales 1,069 (15%) eran pacientes provenientes de los institutos de salud (CEC, 2011).

El 65% de los pacientes incluidos tenían CV indetectable y conteos de linfocitos CD4+ mayores de 200 mm<sup>3</sup>, lo cual es esperable debido a la alta proporción que utilizaban TARAA (Thompson y cols, 2012); sin embargo, la mayor parte de ellos se encontraban en etapas avanzadas de la infección por VIH. Cabe resaltar que de los 10 pacientes con TARAA y CV detectable, ocho (80%) tenían menos de cinco meses de tratamiento. De acuerdo con las

Guías internacionales y nacionales de tratamiento antirretroviral, el tiempo requerido para lograr niveles indetectables es de entre seis (Thompson y cols, 2012) y 12 meses (CENSIDA, 2012).

En nuestro estudio, las LB-VPH más frecuentes fueron la HEM (47.2%) y el PEC (36.1%), similar a lo reportado previamente durante el periodo 2004-2011 (Anaya-Saavedra y cols, 2013), cuando se identificó al PEC (40%) y la HEM (27.3%) como las LB-VPH más frecuentes. Otros reportes o series de casos, han descrito a la HEM (Vilmer y cols, 1994; Viraben y cols, 1996; Marvan y cols, 1998; Moerman y cols, 2001; Feller y cols, 2010) y al PEC (Paparotto-Lopes y Meeks, 2001; Anderson y cols, 2003; Stoopler y cols, 2011) en individuos con VIH/SIDA como lesiones aisladas. El CA ha sido descrito como la única LB-VPH identificada (Lourenço y cols, 2011) o como la LB-VPH más frecuente (Syrjänen, 2011; Ortega y cols, 2009; Nunes y cols, 2008). Asimismo, existen varios reportes de caso sobre CA en pacientes con VIH/SIDA (Infante-Cossío y cols, 2008; Beaulieu y cols, 2008; Martini y cols, 2007; Aboulafia, 2002; Girão y cols, 2000; Ficarra y cols, 1991).

Es importante mencionar que la mayoría de los estudios utilizan el término genérico de lesiones papilomatosas (*oral warts*) para describir a las LB-VPH (Nabbanja y cols, 2013; Giuliani y cols, 2008; Kakabadze y cols, 2008; Ferreira y cols, 200; Hamza y cols, 2006; King y cols, 2002; Ma y cols, 2004; Greenspan y cols, 2001; Patton y cols, 2000; Schmidt-Westhausen y cols, 2000), son escasos los estudios que indican el tipo de LB-VPH (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Lourenço y cols, 2011; Ortega y cols, 2009; Nunes y cols, 2008; Pinheiro y cols, 2004).

En cuanto a la localización de las LB-VPH, la mucosa labial fue el sitio más afectado (63.9%), de manera similar a lo reportado previamente (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Stoopler y Balasubramaniam, 2011; Sirera y cols, 2006; Regezi y cols, 2002; Schwartz y cols, 2001; Greenspan y cols, 1988; Itin y Lautenschlager, 1997). Lo anterior contrasta con lo encontrado por Syrjänen (Syrjänen, 2011) y un reporte de caso (DeRossi y Laudenschlager, 2004), que describe a la encía como el sitio con mayor predilección.

La presentación de más de una LB-VPH fue un hallazgo frecuente (62.1%), particularmente en pacientes con largos periodos de uso de TARAA. De manera similar, un estudio reciente (Anaya-Saavedra y cols, 2013) indica que los pacientes con VIH/SIDA con más de 12 meses de uso de TARAA, tienen un riesgo tres veces mayor de desarrollar LB-VPH. Se ha sugerido que el incremento en la frecuencia de LB-VPH de pacientes infectados con VIH, en la era post-TARAA, pudiera asociarse más al aumento en la sobrevivencia de los pacientes, quienes han tenido un estado inmunológico alterado por periodos más largos de tiempo, que a la administración prolongada de TARAA (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Cameron y cols, 2005). Los primeros estudios que identificaron el aumento en la frecuencia de LB-VPH, sugirieron que la administración de TARAA podría estar relacionada con el desarrollo de LB-VPH (Greenwood y cols, 2002; King y cols, 2002; Patton y cols, 2000); sin embargo, hasta la fecha, no existe una evidencia concluyente que corrobore esta asociación (Patton y cols, 2013).

Diferentes autores refieren que en los pacientes inmunosuprimidos o con VIH/SIDA, las LB-VPH pueden exhibir diferentes características clínicas (Barnes y cols, WHO 2005; Syrjänen, 2003) o histopatológicas en comparación con individuos inmunocompetentes (Regezzi y

cols, 2002; Fornatora y cols, 1996; Regezi y cols, 1994). Se ha sugerido que las semejanzas entre el PEC y la VV pueden dificultar su diagnóstico, tanto clínica (Syrjanen, 2003) como histopatológicamente, particularmente cuando el tiempo de evolución es largo, o la actividad replicativa viral está disminuido. (Barnes y cols, WHO 2005). Adicionalmente, Syrjänen (2003) indica que para distinguir la VV del PEC es necesario que se identifiquen características histopatológicas de la VV cutánea, y como un orientador diagnóstico se ha propuesto la identificación de tipos virales cutáneos en la VV como VPH-2 y 4 (Syrjanen, 2003).

En el presente estudio el 66% de los diagnósticos clínicos presuntivos coincidieron con los diagnósticos histopatológicos, la HEM fue una lesión subdiagnosticada, ya que en cinco de los 17 casos la apariencia clínica era sugestiva de PEC o de VV; en contraste, la concordancia entre los diagnósticos clínicos e histopatológicos de PEC y VV fue mayor.

El 86.1% de las muestras analizadas contenían VPH-BR, frecuencias más altas que el 79.5% (Anaya-Saavedra y cols, 2013) y 73.1% (Ma y cols, 2004) reportado por los dos estudios previos que analizaron los tipos virales en las LB-VPH. El tipo viral más frecuente identificado en las muestras analizadas fue el 32, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Syrjänen, 2011; Cameron y Hagensee, 2008; Völter y cols, 1996), y difiere con otros estudios que mencionan a los VPH-11 y 13 como los más frecuentes (Anaya-Saavedra y cols, 2013; Ma y cols, 2004). El 8.3% de las muestras analizadas presentaron VPH-AR, siendo el tipo más frecuente el VPH-16, el cual se presentó en HEM.

En el presente estudio se encontraron tipos virales diferentes a los clásicamente descritos para las LB-VPH en individuos sin VIH/SIDA (Syrjanen, 2003). Ejemplo de ello es la identificación de los tipos 7, 13 y 32 en los PEC, lesión en la cual se ha descrito la participación de VPH-6 y 11 (Syrjanen, 2003; Kumaraswamy y Vidhya, 2011). Otro hallazgo interesante fue la identificación de VPH-32 en todas las VV y el CA, lesiones en las que se han descrito los tipos 2,4,6 y 11 (Syrjanen, 2003; Kumaraswamy y Vidhya, 2011) A este respecto, la literatura menciona que el VPH-32 es un tipo viral presente de manera casi exclusiva en la mucosa bucal, y asociada al desarrollo de HEM. (Syrjanen, 2003; Kumaraswamy y Vidhya, 2011). Se ha reportado la presencia de VPH distintos a los clásicamente descritos en las LB-VPH de pacientes con VIH (Volter y cols, 1996; De Villiers, 1989; Greenspan y cols, 1988), como consecuencia de la inmunosupresión, y probablemente no relacionados con el desarrollo de las LB-VPH; este hallazgo pudiera estar relacionado a la reactivación de infecciones latentes, persistentes o altas cargas de VPH (Kreimer y cols, 2004).

Adicionalmente, la inmunosupresión se ha asociado con la presencia de infección múltiple por VPH en los pacientes con VIH/SIDA (Syrjanen, 2011; Richter y cols, 2008; Moscicki y cols, 2004), en nuestros hallazgos, los pacientes con infección múltiple tenían conteos de linfocitos CD4+ menores de 200 cel/mm<sup>3</sup>, la mayor parte (75%) correspondían a VPH-AR.

Una gran cantidad de estudios han analizado la presencia de infección por VPH en la mucosa bucal de individuos con VIH/SIDA, en ausencia de lesiones bucales (Steinau y cols, 2012; Beachler y cols, 2012; Amornthatree y cols, 2011; Parisi y cols, 2011; Fakhy y cols, 2010; Marais y cols, 2008; Adamopoulou y cols, 2008; Richter y cols, 2008; D'Souza y cols, 2007;

Fakhry y cols, 2006; Cameron y cols, 2005; Kreimer y cols, 2004; Coutlee y cols, 1997). Se han reportado frecuencias de VPH-16 que varían entre 3% (Marais y cols, 2008) y 80% (Amornthatree y cols, 2011); es importante destacar que únicamente los VPH-BR han sido relacionados al desarrollo de LB-VPH a pesar de la presencia de VPH-AR (Cameron y cols, 2005). De manera similar, en el presente estudio todas las LB-VPH con VPH-AR presentaron coinfección con VPH de bajo riesgo.

En cuanto a la inmunodetección de p16<sup>INK4a</sup> en las LB-VPH analizadas en el presente estudio, se observó una sobreexpresión generalizada de la proteína p16<sup>INK4a</sup>, la cual no se encontró asociada con las variables demográficas y clínicas, ni con los tipos virales. Ninguna de las LB-VPH mostró signos de displasia epitelial, por lo que la sobreexpresión de esta proteína, tampoco puede asociarse con transformación maligna, como se ha reportado en estudios previos realizados en displasia epitelial y cáncer bucal en individuos sin VIH (Wittkiewicz y cols, 2011; Klingenberg y cols, 2010; de Jonge y cols, 2009; Bartkova y cols, 2006; Ressler y cols, 2006; Collado y cols, 2005; Kim y cols, 2002; Serrano y cols, 1997)

En la literatura científica se carece de estudios que describan la expresión de esta proteína en las LB-VPH en pacientes con VIH/SIDA u otras formas de inmunosupresión. Un estudio previo realizado en 30 papilomas escamocelulares obtenidos de pacientes inmunocompetentes, encontró una inmunodetección menor al 25% (Queiroz y cols, 2010), similar a lo informado en mucosa bucal sin alteraciones, en la que se ha reportado ausencia total de su expresión, (Tarakji y cols, 2010) o bajos índices de proliferación (Wittkiewicz y cols, 2011; Poomsawat y cols, 2011; Queiroz y cols, 2010; Buajeeb y cols, 2009)

Si bien, en el presente estudio no se encontró asociación entre la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> y el consumo de tabaco, un estudio previo (Tarakji y cols, 2010) realizado en muestras de mucosa bucal normal y con queratosis friccional de individuos fumadores, reportó frecuencias del 20 y 45% para la inmunodetección nuclear y citoplásmica de p16<sup>INK4a</sup>, respectivamente, sugiriendo que el incremento de p16<sup>INK4a</sup> pudiera formar parte del proceso de regulación del ciclo celular, como respuesta a su estimulación por la nicotina.

Un aspecto importante a considerar es que las muestras analizadas presentaron la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> únicamente en el núcleo, en contraste con los estudios que reportan mayor frecuencia de inmunotinción citoplásmica en mucosa bucal normal y queratosis friccional de fumadores (Tarakji y cols, 2010), displasia epitelial bucal (Angiero y cols, 2010; Buajeeb y cols, 2009; Cunningham y cols, 2006; Gologan y cols, 2005) y carcinoma escamocelular bucal (Reuschenbach y cols, 2013; Lingen y cols, 2013; Heath y cols, 2012; Fonseca-Silva y cols, 2012; Pannone y cols, 2012; Hoffman y cols, 2012; Dragomir y cols, 2012; Harris y cols, 2011; Smith y cols 2008; Saito y cols, 1999; Chen y cols, 1999; Warnakulasuriya y cols, 1998). Nuestros hallazgos respecto a la expresión nuclear de p16<sup>INK4a</sup> están apoyados por estudios previos (Poomsawat y cols 2011, Tarakji y cols, 2010) que han identificado sobreexpresión nuclear de p16<sup>INK4a</sup> en estados hiperproliferativos, en un intento de control de la proliferación celular.

A diferencia de la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> identificada en las LB-VPH, las muestras de mucosa bucal normal utilizadas como control en el presente estudio, mostraron una expresión de p16<sup>INK4a</sup> leve, que disminuyó hasta 33% en los estratos superficiales. Aunque un estudio

previo (Abrahao y cols, 2011) identificó que la expresión de p16<sup>INK4a</sup> en mucosa bucal hiperplásica es tan alta (40%) como la identificada en carcinoma invasor (43.3%), la mayoría de los trabajos (Abrahao y cols, 2011; Buajeeb y cols, 2009; Saito y cols, 1999) no han encontrado diferencias en la expresión de p16<sup>INK4a</sup> entre la mucosa bucal normal, y la afectada con displasia; o reportan ausencia de expresión de p16<sup>INK4a</sup> en mucosa normal y displasia leve (Angiero y cols, 2008), aumentando hasta 85.7% en la displasia epitelial moderada y severa, y disminuyendo a 54.5% en el carcinoma invasor de la mucosa bucal (Angiero y cols, 2008).

A pesar de que numerosos estudios han empleado la inmunodetección de p16<sup>INK4a</sup> como un marcador surrogado de infección por VPH-AR en cáncer cérvico uterino (Amortegui y cols, 1995) y se ha propuesto su uso en carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello (Marur y cols, 2010; Fischer y cols, 2010a y 2010b; Lassen y cols, 2009; Nichols y cols, 2009; Rich y cols, 2009; Chung y cols, 2009; Kumar y cols, 2008), los resultados son controversiales. En el presente trabajo la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> se observó en todas las LB-VPH, asociadas o no a tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, por lo que el papel de los VPH-AR en estas lesiones parece ser limitado; es probable que en el contexto de la inmunosupresión, el hallazgo de secuencias virales de alto riesgo no esté relacionado con el desarrollo de las LB-VPH, sino a la identificación de infección latente en esta población (Beachler y cols, 2012; Amornthatree y cols, 2011; Cameron y cols, 2005).

Dentro de las limitaciones del presente estudio se encuentra el relativamente bajo número de pacientes incluidos, ya que las LB-VPH representan entidades de frecuencia reducida; sin embargo, cabe resaltar que el estudio comprende un periodo de 3 años, y fue realizado en tres

centros de referencia para VIH/SIDA de la ciudad de México. Adicionalmente, otra limitante es la subjetividad en el análisis de la inmunodetección de p16<sup>INK4a</sup>, ya que no existe un método estandarizado para su estudio; la mayor parte de los estudios previos han descrito la frecuencia global de inmunotinción de p16<sup>INK4a</sup> (Pannone y cols, 2012; Chen y cols, 2012; Fonseca-Silva y cols, 2012; Angiero y cols, 2010; Buajeeb y cols, 2009; Nemes y cols, 2006; Cunningham y cols, 2006; Saito y cols, 1999) o analizan con diferentes escalas semicuantitativas o cualitativas (Reuschenbach y cols, 2013; Lingen y cols, 2013; Hoffmann y cols, 2012; Heath y cols, 2012; Chandarana y cols, 2012; Harris y cols, 2011; Queiroz y cols, 2010; Greer y cols, 2008; Smith y cols, 2008; González-Moles y cols, 2007; Muirhead y cols, 2006; Tokman y cols, 2004; Kim y cols, 2000; Chen y cols, 1999; Pande y cols, 1998; Warnakulasuriya y cols, 1998) lo que dificulta su comparación con nuestros resultados.

Es importante mencionar que los pacientes fueron incluidos de manera consecutiva, y pertenecen a una cohorte activa, construida en las Clínicas de Patología y Medicina bucal de tres centros de referencia para el VIH/SIDA de la Ciudad de México. Lo anterior cobra relevancia para el desarrollo de futuros estudios longitudinales, que incluyan a estos mismos pacientes, de los cuales ya se tiene información. Otras de las fortalezas del presente estudio radican en el empleo de ensayos de alta sensibilidad para la detección de DNA-VPH y en la estandarización en el análisis de inmunodetección, el cual fue realizado bajo acuerdo entre las tres examinadoras.

El presente estudio es el primer trabajo que brinda información sobre la alta inmunodetección de un gen supresor tumoral, lo cual es fundamental en el contexto del aumento en la incidencia de cáncer en los pacientes con VIH/SIDA. Adicionalmente, el estudio proporciona

información sobre el espectro clínico, histopatológico y molecular de las LB-VPH en pacientes con VIH/SIDA, área en la cual son pocos los estudios publicados.

## **9. Conclusiones**

La alta expresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup> identificada en el presente estudio, además de la ausencia de signos de transformación maligna, y de la baja frecuencia de VPH de alto riesgo oncogénico, nos permiten confirmar la naturaleza benigna de estas condiciones, lo cual es de gran relevancia debido al hallazgo previo de secuencias de VPH-AR en pacientes inmunosuprimidos, y aquí se ha propuesto la posibilidad de malignización. Adicionalmente la sobreexpresión de la proteína en el presente estudio no se asoció a VPH de alto riesgo y posiblemente podría estar relacionada al estado hiperproliferativo de las lesiones.

Finalmente, la patogénesis del VPH en la infección por VIH/SIDA aún representa una gran área de estudio y los resultados del presente estudio obligan al inicio de estudios longitudinales, en los cuales se analicen otros aspectos importantes dentro de las vías moleculares involucradas con el comportamiento del VPH.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**: 419-428.
- Aboulafia DM**. Condyloma acuminatum presenting as a dorsal tongue lesion in a patient with AIDS. *AIDS Read* 2002; **12**: 165–167.
- Abrahao AC**, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res* 2011; **25**: 34-41.
- Adamopoulou M**, Vairaktaris E, Panis V, Nkenke E, Neukam FW, Yapijakis C. HPV detection rate in saliva may depend on the immune system efficiency. *In Vivo* 2008; **22**: 599–602.
- Ai L**, Stephenson KK, Ling W *et al*. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol* 2003; **16**: 944-950.
- 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 papilloma virus type 16. *J Oral Pathol Med* 2011; **41**: 309–314.
- Amortegui AJ**, Meyer MP, Elborne VL, Amin RM. p53, retinoblastoma gene product, and cyclin protein expression in human papillomavirus virus DNA-positive cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Mod Pathol* 1995; **8**: 907-912.
- Anaya-Saavedra G**, Flores-Moreno B, García-Carrancá A, Irigoyen-Camacho E, Guido-Jiménez M, Ramírez-Amador V. HPV oral lesions in HIV-infected patients: the impact of long-term HAART. *J Oral Pathol Med* 2013; **42**: 443-449.
- Anaya-Saavedra G**, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar C, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, García-Carrancá A. High association of Human Papillomavirus infection with oral cancer: a case control study in Mexico City. *Arch Med Res* 2008; **39**: 189-197.
- Anderson KM**, Allen CM, Nuovo GJ. Human papillomavirus, type 40-associated papilloma, and concurrent Kaposi's sarcoma involving the anterior hard palate of an HIV-positive man. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; **95**: 80-84.
- Ang KK**, Harris J, Wheeler R *et al*. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New Engl J Med* 2010; **363** :24–35.
- Angiero F**, Berenzi A, Benetti A *et al*. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res* 2008; **28**: 2535-2539.
- Angiero F**, Gatta LB, Seramondi R, *et al*. Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer. *Anticancer Res* 2010; **30**: 3435-3440.
- Baccaglioni L**, Atkinson JC, Patton LL, Glick M, Ficarra G, Peterson DE. Management of oral lesions in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; **103** Suppl: S50.e1-23.
- Bădulescu F**, Crișan A, Bădulescu A, Schenker M. Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of the head and neck cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2010; **51**: 437-440.

**Barnes L**, Eveson JW, 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.

**Bartkova J**, Rezaei N, Lontos M et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; **444**: 633-637.

**Beachler DC**, Weber KM, Margolick JB, Strickler HD, Cranston RD, Burk RD, Wiley DJ, Minkoff H, Reddy S, Stammer EE, Gillison ML, D'Souza G. Risk factors for oral HPV infection among a high prevalence population of HIV-positive and at-risk HIV-negative adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; **21**: 122-133.

**Beaulieu D**, Burnouf M, Plantier F et al. Extensive oral condylomas treated by in situ cidofovir injection in an HIV patient. *Ann Dermatol Venereol* 2008; **135**: 307-311.

**Bernard J**. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; **32**: 1-6.

**Bottalico D**, Chen Z, Dunne A. et al. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis.* 2011; **204**: 787-792.

**Bottalico D**, Chen Z, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M, Burk RD. Characterization of human papillomavirus type 120: a novel betapapillomavirus with tropism for multiple anatomical niches. *J Gen Virol.* 2012; **93** :1774-1779.

**Bradley KT**, Budnick SD and Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol* 2006; **19**: 1310-1316.

**Buajeeb W**, Poomsawat S, Punyasingh J, Sanguansin S. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med.* 2009; **38**: 104-108.

**Cadogan M**, Dalgleish AG. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**: 675-684.

**Calmon MF**, Colombo J, Carvalho F et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; **173**: 31-37.

**Cameron JE**, Hagensee ME. Oral HPV complications in HIV-infected patients. *Curr HIV/AIDS Rep* 2008; **5**: 126-131.

**Cameron JE**, Mercante D, O'Brien M, et al. 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.

**Carrillo A**, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G, Lizano M. Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions. *Salud Pública Mex* 2004; **46**: 7-15.

**CDC** 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992; **41**: 1-19.

**CEC**, 2011. Programa de VIH/SIDA de la Ciudad de México. Clínica Especializada Condesa. El VIH/SIDA en la Ciudad de México. Disponible en: [http://condesadf.mx/images/PDF/sida\\_df\\_2011.pdf](http://condesadf.mx/images/PDF/sida_df_2011.pdf). Consultado el: 14 de mayo de 2013.

**CENSIDA**, Vigilancia epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México. Registro Nacional de Casos de SIDA. Noviembre del 2012 (CENSIDA). Disponible en: [http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/VIHSIDA\\_MEX2012.pdf](http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/VIHSIDA_MEX2012.pdf). Página consultada el 21 de marzo de 2013.

**Chaiyachati K**, Cinti SK, Kauffman CA, Riddell J. HIV-infected patients with anal carcinoma who subsequently developed oral squamous cell carcinoma: report of 2 cases. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)* 2008;306-310.

**Chandarana SP**, Lee JS, Chanowski EJ et al. Prevalence and predictive role of p16 and epidermal growth factor receptor in surgically treated oropharyngeal and oral cavity cancer. *Head Neck* 2012. doi: 10.1002/hed.23087.

**Chang JY**, Lin MC, Chiang CP. High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Am J Clin Pathol*. 2003; **120**: 909-916.

**Charkraborty N**, Bhattacharyya S, De C, et al. Incidence of multiple Herpesvirus infection in HIV seropositive patients, a big concern for Eastern Indian scenario. *Virology* 2010; **7**: 147.

**Chaturvedi AK**, Madeleine MM, Biggar RJ, Engels EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst*. 2009; **101**: 1120-1130.

**Chen Q**, Luo G, Li B, Samaranayake LP. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 1999; **28**: 158-164.

**Chen ZW**, Weinreb I, Kamel-Reid S, Perez-Ordoñez B. Equivocal p16 immunostaining in squamous cell carcinoma of the head and neck: staining patterns are suggestive of HPV status. *Head Neck Pathol* 2012; **6**: 422-429.

**Chung CH**, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 6758–6762.

**Collado M**, Gil J, Efeyan A et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; **436**: 642.

**Coogan MM**, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ* 2005; **83**: 700-706.

**Coutlee F**, Trottier A-M, Ghatas G, et al. Risk factors for oral human papillomavirus in adults infected and not infected with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis* 1997; **24**: 23-31.

**Cunningham LL Jr**, Pagano GM, Li M, et al. Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; **102**: 77-81.

**D'Souza G**, Sugar E, Ruby W, Gravitt P, Gillison M. Analysis of the effect of DNA purification on detection of human papillomavirus in oral rinse samples by PCR. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**: 5526-5535.

**D'Souza G**, Fakhry C, Sugar EA et al. Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2007; **121**: 143–150.

**da Silva CA**, Dourado I, Dahia SR, Harzheim E, Rutherford GW. Oral manifestations of HIV infection in patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) in Bahia, Brazil. *J Public Health Dent* 2008; **68**: 178–181.

**Dang AT**, Cotton S, Sankaran-Walters S et al. Evidence of an increased pathogenic footprint in the lingual microbiome of untreated HIV infected patients. *BMC Microbiol*. 2012; **12**: 153.

**de Jonge HJ**, Woolthuis CM, de Bont ES, Huls G. Paradoxical downregulation of p16 mRNA with advancing age in acute myeloid leukemia. *Aging (Albany NY)* 2009; **1**: 949-953.

**De Villiers EM.** Prevalence of HPV 7 papillomas in the oral mucosa and facial skin of patients with human immunodeficiency virus. *Arch Dermatol* 1989; **125**: 1590.

**Denny LA, Franceschi S, de Sanjosé S, Heard I, Moscicki AB, Palefsky J.** Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. *Vaccine*. 2012; **30** Suppl 5:F168-174.

**DeRossi SS, Laudenbach J.** The management of oral human papillomavirus with topical cidofovir: a case report. *Cutis* 2004; **73**: 191-193.

**Diz Dios P, Scully C.** Antiretroviral therapy: effects on orofacial health and health care. *Oral Dis* 2013. doi: 10.1111/odi.12093.

**Dong Y, Wang J, Dong F, Wang X, Zhang Y.** The correlations between alteration of p16 gene and clinicopathological factors and prognosis in squamous cell carcinomas of the buccal mucosa. *J Oral Pathol Med* 2012; **41**: 463-469

**Doorbar J, Quint W, Banks L et al.** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; **30** Suppl 5:F55-70.

**Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu CI, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR.** P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2012; **53**: 89–93.

**Duensing S, Munger K.** Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1471**: M81-M88.

**Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E.** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; **243**: 934-937.

**GATS,** Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos México 2009. Disponible en: [http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/pie/GATS\\_2009.pdf](http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/pie/GATS_2009.pdf)  
Página consultada el 27 de diciembre de 2012.

**Fakhry C, D'Souza G, Sugar E, et al.** Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and negative women. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 4479-4485.

**Fakhry C, Sugar E, D'Souza G, Gillison M.** Two-week versus six-month sampling interval in a short-term natural history study of oral HPV infection in an HIV-positive cohort. *PLoS ONE* 2010; **5**: e11918.

**Fakhry C, Westra WH, Li S, et al.** Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008; **100**: 261-269

**Fauci AS.** 25 years of HIV. *Nature* 2008; **453**: 289-290.

**Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Malema V, Meyerov R, Lemmer J.** Focal epithelial hyperplasia (Heck disease) related to highly active antiretroviral therapy in an HIV-seropositive child. A report of a case, and a review of the literature. *SADJ* 2010; **65**: 172-175.

**Ferreira S, Noce C, Júnior AS et al.** Prevalence of oral manifestations of HIV infection in Rio De Janeiro, Brazil from 1988 to 2004. *AIDS Patient Care STDS* 2007; **21**: 724–731.

**Ficarra G, Miliani A, Adler-Storthz K, et al.** Recurrent oral condylomata acuminata and hairy leukoplakia: an early sign of myelodysplastic syndrome in an HIV-seronegative patient. *J Oral Pathol Med*. 1991; **20**: 398-402.

**Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, et al.** p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol* 2010a; **21**: 1961-1966.

- Fischer CA**, Zlobec I, Green E, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality?. *Int J Cancer*. 2010b; **126**: 1256-1262.
- Fonseca-Silva T**, Farias LC, Cardoso CM, et al. Analysis of p16(CDKN2A) methylation and HPV-16 infection in oral mucosal dysplasia. *Pathobiology* 2012; **79**: 94-100
- Fornatora M**, Cale Jones A, Kerpel S, Freedman P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; **82**: 47-56.
- García-Foncillas J**, Bandrés E, Catalán V, García Amigot F, Zabalegui N. Basic concepts in the molecular biology of cáncer, Genetic susceptibility. *ANALES Sis San Navarra* 2000; **24**: 31-52.
- Gillespie MB**, Rubinchik S, Hoel B, Sutkowski N. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer: what you need to know in 2009. *Curr Treat Options Oncol* 2009;**10**:296-307.
- Gillison ML**, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000; **92**: 709-720.
- Gillison ML**. Oropharyngeal cancer: a potential consequence of concomitant HPV and HIV infection. *Curr Opin Oncol* 2009; **21**: 439-444.
- Giraldó P**, Gonçalves AK, Pereira SA, Barros-Mazon S, Gondo ML, Witkin SS. Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; **126**: 104-106.
- Girão L**, Franca I, Macedo H, Ornelas C, Nunes M, Araújo C, Mansinho K. Treatment of oral condylomata acuminata in a HIV-1 patient with bleomycin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000; **1**: 321-322.
- Giuliani M**, Lajolo C, Sartorio A et al. Oral lesions in HIV and HCV co-infected individuals in HAART era. *J Oral Pathol Med* 2008; **37**: 468–474.
- Gologan O**, Barnes EL and Hunt JL. Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *Am J Surg Pathol* 2005; **29**: 792-796.
- González-Moles MA**, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Esteban F, Delgado-Rodriguez M, Bascones-Martinez A. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p16INK4a and CD44s in tongue cancer. *Oncol Rep* 2007; **18**: 389-396.
- Goon PKC**, Stanley MA, Ebmeyer J, et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head & Neck Oncology* 2009; **1**: 36.
- Greenspan D**, Canchola AJ, MacPhail LA, et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on frequency of oral warts. *Lancet* 2001; **357**: 1411-1412.
- Greenspan D**, de Villiers EM, Greenspan JS, de Souza YG, zur Hausen H. Unusual HPV types in oral warts in association with HIV infection. *J Oral Pathol* 1988; **17**: 482-488.
- Greenspan D**, Komaroff E, Redford M, et al. Oral mucosal lesions and HIV viral load in the Women's Interagency HIV Study (WIHS). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; **25**: 44-50.
- Greenwood I**, Zakrzewska JM, Robinson PG. Changes in the prevalence of HIV-associated mucosal disease at a dedicated clinic over 7 years. *Oral Dis* 2002; **8**: 90–94.

**Greer Jr RO**, Meyers A, Said SM, Shroyer KR. Is p16(INK4a) protein expression in oral ST lesions a reliable precancerous marker?, *Int J. Oral Maxillofac. Surg* 2008; **37**: 840–846.

**Gröbe A**, Hanken H, Kluwe L et al. Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2013. doi: 10.1111/jop.12086.

**Grossman Z**, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 2006; **12**: 289-295.

**Grulich AE**, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007; **370**: 59-67.

**Ha PK**, Pai SI, Westra WH, et al. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res*. 2002; **8**: 1203-1209.

**Hamza OJ**, Matee MI, Simon EN et al. Oral manifestations of HIV infection in children and adults receiving highly active anti-retroviral therapy [HAART] in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Oral Health* 2006; **6**: 12.

**Harris SL**, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck* 2011; **33**: 1622-1627.

**Harris TG**, Burk RB, Palefsky JM. et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV serostatus, CD4 cell counts, and human papillomavirus test results. *JAMA* 2005; **293**: 1471–1476.

**Heath S**, Willis V, Allan K et al. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2012; **24**: e18-23.

**Hennessey PT**, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res* 2009; **88**: 300-306.

**Hidalgo A**, Schewe C, Petersen S, et al. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumour cell lines. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 542-548.

**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.

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

**Hoffmann M**, Tribius S, Quabius ES, et al. HPV DNA, E6(\*) I-mRNA expression and p16(INK4A) immunohistochemistry in head and neck cancer - How valid is p16(INK4A) as surrogate marker? *Cancer Lett*. 2012; **323**: 88-96.

**Houghton O**, Jamison J, Wilson R, Carson J, McCluggage WG. p16 immunoreactivity in unusual types of cervical adenocarcinoma does not reflect human papillomavirus infection. *Histopathology* 2010; **57**: 342-350.

**Huang MJ**, Yeh KT, Shih HC, et al. The correlation between CpG methylation and protein expression of P16 in oral squamous cell carcinomas. *Int. J Mol Med* 2002; **10**: 551–554.

**Infante-Cossío P**, Gonzalo DH, Hernandez-Gutierrez J, Borrero-Martin JJ. Oral inverted ductal papilloma associated with condyloma acuminata and HPV in an HIV+ patient. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; **37**: 1159–1161.

- Itin PH**, Lautenschlager S. Viral lesions of the mouth in HIV-infected patients. *Dermatology* 1997; **194**: 1-7.
- Kakabadze T**, Rukhadze N, Mshvidobadze K, Lomtadze M, Kandelaki G Oral lesions in HIV-positive patients in Georgia. *Georgian Med News* 2008; **12**: 60–65.
- Kim HS**, Chung WB, Hong SH et al. Inactivation of p16INK4a in primary tumors and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma, *Mol. Cells* 2000; **10**: 557–565.
- Kim RH**, Yochim JM, Kang MK, Shin KH, Christensen R, Park NH. HIV-1 Tat enhances replicative potential of human oral keratinocytes harboring HPV-16 genome. *Int J Oncol* 2008; **33**: 777–782.
- Kim SH**, Kaminker P, Campisi J. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* 2002; **21**: 503–511.
- King MD**, Reznik DA, O’Daniels CM, et al. Human papillomavirus-associated oral warts among human immunodeficiency virus-seropositive patients in the era of highly active antiretroviral therapy: an emerging infection. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 641-648.
- Klingenberg B**, Hafkamp HC, Haesevoets A et al. p16<sup>INK4A</sup> overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV, *Histopathology* 2010; **56**: 957–967.
- Klussmann JP**, Gultekin E, Weissenborn SJ et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003; **162**: 747–753.
- Kong CS**, Narasimhan B, Cao H, et al. The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; **74**: 553-561.
- Kreimer AR**, Alberg AJ, Daniel R, et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *JID* 2004; **189**: 686-698.
- Kresty LA**, Mallery SR, Knobloch TJ et al. Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; **17**: 3179-3187.
- Kresty LA**, Mallery SR, Knobloch TJ, et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res.* 2002; **62**: 5295-5300.
- Kumar B**, Cordell KG, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 3128–3137.
- Kumaraswamy KL**, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: an update. *J Cancer Res Ther* 2011; **7**: 120-127.
- Lassen P**, Eriksen JG, Hamilton–Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 1992–1998.
- Leigh J**. Oral warts rise dramatically with use of new agents in HIV. *HIV Clin* 2000; **12**: 7.
- Levy JA**. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Adv Dent Res* 2006; **19**: 10-16.
- Lingen MW**, Xiao W, Schmitt A et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2013; **49**: 1-8.
- Longworth MS**, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68362–68372.

- Laurenço AG**, Motta AC, Figueiredo LT, Machado AA, Komesu MC. Oral lesions associated with HIV infection before and during the antiretroviral therapy era in Ribeirão Preto, Brazil. *J Oral Sci* 2011; **53**: 379–385.
- Ma SC**, Hu J, Zhao J, Speight P. Typing human papilloma virus (HPV) infection in the warts of oral mucosa from HIV-positive patients. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2004; **22**: 423-425.
- Macrogen Inc.** Disponible en: <http://www.macrogen.com/spa/service/service.html>  
Página consultada el 25 de abril de 2013.
- Manos MM**, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; **7**: 209-214.
- Marais DJ**, Passmore JA, Denny L, Sampson C, Allan BR, Williamson AL. Cervical and oral human papillomavirus types in HIV-1 positive and negative women with cervical disease in South Africa. *J Med Virol* 2008; **80**: 953–959.
- Martini S**, Colella G, Masiello A, et al. HPV oral infection. Case report of an HIV-positive Nigerian sex worker. *Infez Med* 2007; **15**: 115–118.
- Marur S**, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated Head and Neck Cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010; **11**: 781-789.
- Marvan E**, Firth N. Focal epithelial hyperplasia in an HIV positive man. An illustrated case and review of the literature. *Aust Dent J* 1998; **43**: 305–310.
- McMichael AJ**, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF: The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 11-23.
- Miller CS**, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; **91**: 622-635.
- Miller CS**, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; **82**: 57-68.
- Miziara ID**, Weber R. Oral lesions as predictors of highly active antiretroviral therapy failure in Brazilian HIV-infected children. *J Oral Pathol Med* 2008; **37**:99–106.
- Moerman M**, Danielides VG, Nousia CS, Van Wanseele F, Forsyth R, Vermeersch H. Recurrent focal epithelial hyperplasia due to HPV13 in an HIV-positive patient. *Dermatology* 2001; **203**: 339–341.
- Mogensen TH**, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 2010; **7**: 54.
- Moir S**, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 2011; **6**: 223-248.
- Molijn A**, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005;43-51.
- Moscicki AB**, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis* 2004; **190**: 37-45.
- Moscicki AB**, Schiffman M, Burchell A. et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine.* 2012; **30** Suppl 5:F24-33.

- Muirhead DM**, Hoffman HT, Robinson RA. Correlation of clinicopathological features with immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins p16 and retinoblastoma: distinct association with keratinisation and differentiation in oral cavity squamous cell carcinoma, *J. Clin. Pathol* 2006; **59**: 711–715.
- Münger K**, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989; **8**: 4099-4105.
- Nabbanja J**, Gitta S, Peterson S, Rwenyonyi CM. Orofacial manifestations in HIV positive children attending Mildmay Clinic in Uganda. *Odontology* 2013; **101**: 116–120.
- Nasser W**, Flechtenmacher C, Holzinger D, Hofele C, Bosch FX. Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. *J Oral Pathol Med* 2011; **40**: 629-635.
- Nehls K**, Vinokurova S, Schmidt D, et al. p16 methylation does not affect protein expression in cervical carcinogenesis. *Eur J of Cancer* 2008; **44**: 2496-2505.
- Nemes JA**, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; **102**: 344-352.
- Nichols AC**, Faquin WC, Westra WH, et al. HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; **140**: 228–234.
- Nishimura A**, Ono T, Ishimoto A, et al. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* 2000; **74**: 3752-3760.
- Nittayananta W**, Chanowanna N, Winn T. Mode of HIV transmission associated with risk of oral lesions in HIV-infected subjects in Thailand. *J Oral Pathol Med* 2010b; **39**: 195-200.
- Nittayananta W**, Talungchit S, Jaruratanasirikul S, et al. Effects of long-term use of HAART on oral health status of HIV-infected subjects. *J Oral Pathol Med* 2010a; **39**: 397-406.
- Nokta M**. Oral manifestations associated with HIV infection. *Curr HIV/AIDS* 2008; **Rep** **5**: 5–12.
- Nunes M de G**, Azevedo-e-Silva M, Gonçalves CP, Trope BM, Oliveira LDOH, Ramos-e-Silva M. Human papillomavirus detection and typification in cutaneous and mucosal lesions of HIV-seropositive patients. *Int J STD AIDS* 2008; **19**: 611–616.
- Nyamweya S**, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev Med Virol* 2013; **23**: 221-240.
- O'Regan EM**, Toner ME, Finn SP et al. p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol* 2008; **39**: 452-458.
- Oda D**, Bigler L, Lee P, Blanton R. HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis. *Exp Cell Res.* 1996; **226**: 164-169.
- OMS**, Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH en adultos y adolescentes. Organización Mundial de la Salud, 2011. Edición 2010. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789243599762\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789243599762_spa.pdf)  
Página consultada el 20 de mayo de 2013.

- Ortega KL**, Vale DA, Magalhães MH. Impact of PI and NNRTI HAART-based therapy on oral lesions of Brazilian HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 2009; **38**: 489–494.
- Palefsky J**. Biology of HPV in HIV infection. *Adv Dent Res* 2006; **19**: 99-105.
- Palefsky J**. Human Papillomavirus and Anal Neoplasia. *Current HIV/AIDS Reports* 2008; **5**: 78–85.
- Palefsky J**. Human papillomavirus-related disease in people with HIV. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; **4**: 52-56.
- Palefsky JM**, Holly EA, Efirde JT, Da Costa M, Jay N, Berry JM, et al. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. *AIDS* 2005; **19**: 1407–1414.
- Palefsky JM**, Minkoff H, Kalish LA, et al. 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.
- Pande P**, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* 1998; **34**: 396-403.
- Panel on Antiretroviral Guidelines** for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents 2013. Department of Health and Human Services. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
- Página consultada el 20 de mayo de 2013.
- Pannone G**, Rodolico V, Santoro A et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infectious Agents and Cancer* 2012; **7**: 4.
- Papadimitrakopoulou V**, Izzo J, Lippman SM et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997 ;**14**:1799-1803.
- Papartto Lopes SM**, Meeks VI. Analysis of HPV 16 and 18 by in situ hybridization in oral papilloma of HIV+ patients. *Gen Dent*. 2001; **49**: 386-389; quiz 390-391.
- Paradiso A**, Ranieri G, Stea B et al. Altered p16INK4a and FHIT expression in carcinogenesis and progression of human oral cancer. *Int J Oncol* 2004; **24**: 249-255.
- Parisi SG**, Cruciani M, Scaggiante R et al. Anal and oral human papillomavirus (HPV) infection in HIV-infected subjects in northern Italy: a longitudinal cohort study among men who have sex with men. *BMC Infect Dis* 2011; **11**: 150.
- Patton L**, Ramirez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Nittayananta W, Carrozzo M, Ranganathan K. Urban legends series: oral manifestations of HIV infection. *Oral Dis* 2013. doi:10.1111/odi.12103.
- Patton LL**, McKaig R, Strauss R, Rogers D, Eron JJ Jr. Changing prevalence of oral manifestations of human immuno-deficiency virus in the era of protease inhibitor therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; **89**: 299-304.
- Pérez-Sayáns M**, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. p16(INK4a)/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough?. *Cancer Lett* 2011; **306**: 134-141.
- Pinheiro A**, Marcenes W, Zakrzewska JM, Robinson PG. Dental and oral lesions in HIV infected patients: a study in Brazil. *Int Dent J* 2004; **54**: 131–137.

- Poomsawat S**, Buajeeb W, Khovidhunkit SO, Punyasingh J. Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy. *J Oral Pathol Med*. 2011; **40**: 294-299.
- Praetorius F**. HPV-associated diseases of oral mucosa. *Clin Dermatol* 1997; **15**: 399-413.
- Queiroz AB**, Focchi G, Dobo C, Gomes TS, Ribeiro DA, Oshima CT. Expression of p27, p21(WAF/Cip1), and p16(INK4a) in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2010; **30**: 2799–2803.
- Ramírez A. Velia**, Mosqueda T, Adalberto, Hernández LL, Héctor. Estudio epidemiológico de las lesiones de la mucosa oral. Cuadernos CBS. Mexico. D.F.1986.
- Ramírez-Amador V**, Anaya-Saavedra G, Calva JJ et al. HIV-related oral lesions, demographic factors, clinical staging and anti-retroviral use. *Arch Med Res* 2006; **37**: 646-654.
- 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. A twelve-year study in a referral center in Mexico. *Medicine* 2003; **82**: 39-50.
- Ramírez-Amador V**, Esquivel-Pedraza L, Sierra-Madero J, Ponce-de-Leon S, Ponce-de-Leon S. Oral manifestations of HIV infection by gender and transmission category in Mexico City. *J Oral Pathol Med* 1998; **27**: 135-140.
- Ramírez-Amador V**, Esquivel-Pedraza L, Sierra-Madero J, et al. Oral clinical markers and viral load in a prospective cohort of Mexican HIV-infected patients. *AIDS* 2001; **15**: 1910-1911.
- Ramírez-Amador VA**, Esquivel-Pedraza L, Ponce de León S, Ponce de León S. Prognostic value of oral candidosis and hairy leukoplakia in 111 Mexican HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 1996; **25**: 206-211.
- Rautava J**, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2012; **6** Suppl 1:S3-15.
- Regezi JA**, Dekker NP, Ramos DM, Li X, Macabeo-Ong M, Jordan RC. Proliferation and invasion factors in HIV-associated dysplastic and nondysplastic oral warts and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and RT-PCR evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; **94**: 724-731.
- Regezi JA**, Greenspan D, Greenspan JS, Wong E, MacPhail LA. HPV-associated epithelial atypia in oral warts in HIV<sup>+</sup> patients. *J Cutan Pathol* 1994; **21**: 217-223.
- Reimers N**, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 2007; **120**: 1731-1738.
- Remmerbach TW**, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kündel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 2004; **30**: 302-308.
- Resnick RM**, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, ter Schegget J, Manos MM. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by ADN amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 1477-1484.
- Ressler S**, Bartkova J, Niederegger H, et al. p16<sup>INK4A</sup> is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006; **5**: 379-389.

**Reuschenbach M**, Kansy K, Garbe K et al. Lack of evidence of human papillomavirus-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in southern Germany. *Oral Oncol* 2013. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.03.451.

**Reznik DA**. Oral manifestations of HIV disease. *Top HIV Med* 2005; **13**: 143–148.

**Rich JT**, Milov S, Lewis JS Jr, Thorstad WL, Adkins DR, Haughey BH. Transoral laser microsurgery (TLM) +/- adjuvant therapy for advanced stage oropharyngeal cancer: outcomes and prognostic factors. *Laryngoscope* 2009; **119**: 1709–1719.

**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**: 555-559.

**Sailasree R**, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; **17**: 414-420.

**Saito T**, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1999; **28**: 226-232.

**Salazar-Gonzalez JF**, Salazar MG, Keele BF et al. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 2009; **206**:1273-1289.

**Schmidt-Westhausen AM**, Pripke F, Bergmann FJ, Reichart PA. Decline in the rate of oral opportunistic infections following introduction of highly active antiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med* 2000; **29**: 336–341.

**Schneider E**, Whitmore S, Glynn KM, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 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 Recomm Rep* 2008; **57**(RR-10): 1-12.

**Schwartz SR**, Yueh B, Mc Dougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; **125**: 1-9.

**Schwarz S**, Bier J, Driemel O et al. Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridization are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis. *Cytometry A* 2008; **73**: 305-311.

**Serrano M**, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>Ink4a</sup>. *Cell* 1997; **88**: 593-602.

**Sexton CJ**, Proby CM, Banks L, et al. Characterization of factors involved in human papillomavirus type 16-mediated immortalization of oral keratinocytes. *J Gen Virol*. 1993; **74**: 755-761.

**Shah NG**, Trivedi TI, Tankshal RAI, et al. Molecular alterations in oral carcinogenesis: significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. *Int. J. Biol. Markers* 2007; **22** 132–143.

**Shiboski CH**, Patton LL, Webster-Cyriaque JY et al. Oral HIV/AIDS Research Alliance, Subcommittee of the AIDS Clinical Trial Group. The Oral HIV/AIDS Research Alliance: updated case definitions of oral disease endpoints. *J Oral Pathol Med* 2009; **38**: 481-488.

- Shoushtari AN**, Rahimi NP, Schlesinger DJ, Read PW. Survey on human papillomavirus/p16 screening use in oropharyngeal carcinoma patients in the United States. *Cancer* 2010; **116**: 514-519.
- Silverberg MJ**, Chao C, Leyden WA, Xu L, Horberg MA, Klein D. HIV infection, immunodeficiency, viral replication and the risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; **20**: 2551–2559.
- Singhi AD**, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience, *Cancer* 2010; **116**: 2166–2173.
- Sirera G**, Videla S, Herranz P, Corzo-Delgado JE; AIDS Study Group (Grupo de Estudio del Sida [GeSIDA]). Human papilloma virus and HIV/AIDS. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24 Suppl 2:40-46.
- Skyldberg B**, Fujioka K, Hellstrom AC, Sylven L, Moberger B, Auer G. Human papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions. *Mod Pathol* 2001; **14**: 279-284.
- Smith EM**, Wang D, Kim Y et al. P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2008; **44**: 133-142.
- Śnietura M**, Jaworska M, Pięłowski W, et al. High-risk HPV DNA status and p16 (INK4a) expression as prognostic markers in patients with squamous cell cancer of oral cavity and oropharynx. *Pol J Pathol* 2010; **61**: 133-139.
- Steinau M**, Reddy D, Sumbry A, et al. Oral sampling and human papillomavirus genotyping in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 2012; **41**: 288-291.
- Stoopler ET**, Balasubramaniam R. Images in clinical medicine. Human papillomavirus lesions of the oral cavity. *N Engl J Med* 2011; **365**: e37.
- Strickler HD**. Does HIV/AIDS have a biological impact on the risk of human papillomavirus-related cancers? *J Natl Cancer Inst* 2009; **101**: 1103-1105.
- STROBE Group**. STROBE Statement. Checklist of essential items, version 3. Disponible en: [http://www.strobe.statement.org/PDF/STROBE-Checklist-Version\\_3.pdf](http://www.strobe.statement.org/PDF/STROBE-Checklist-Version_3.pdf). Página consultada el 24 de septiembre de 2009.
- Syrjänen K**, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983; **12**: 418.
- Syrjanen K**, Syrjanen S. Papillomavirus infections in human disease. 2000. Wiley, New York, pp 1–615.
- Syrjänen S**. Human papillomavirus infection and its association with HIV. *Adv Dent Res* 2011; **23**: 84-89.
- Syrjänen S**. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol* 2003; **192**: 123-128.
- Syrjänen S**. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol* 2010; **21** Suppl 7:vii243-245.
- Takeshima M**, Saitoh M, Kusano K et al. High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med*. 2008; **37**: 475-479.
- Tamí-Maury IM**, Willig JH, Jolly PE et al.. Prevalence, incidence, and recurrence of oral lesions among HIV-infected patients on HAART in Alabama: a two-year longitudinal study. *South Med J* 2011; **104**: 561–566.

- Tarakji B**, Kujan O, Nassani MZ. An immunohistochemical study of the distribution of p16 protein in oral mucosa in smokers, non-smokers and in frictional keratosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;**15**: e681-684.
- Thompson MA**, Aberg JA, Hoy JF et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the international AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2012; **308**: 387-402.
- Tokman B**, Gultekin SE, Sezer C, Alpar R. The expression of p53, p16 proteins and prevalence of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. Correlation with mode of invasion grading system, *Saudi Med J* 2004; **25**: 1922–1930.
- Tort F**, Bartkova J, Sehested M, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. Retinoblastoma pathway defects show differential ability to activate the constitutive DNA damage response in human tumorigenesis. *Cancer Res* 2006; **66**: 10258-10263.
- Tsai CH**, Yang CC, Chou LS, Chou MY. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2001; **30**: 527-531.
- Tsai HJ**, Peng YW, Lin LY, Chou MC, Lee H, Chiou HL. An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions. *Cancer Detect Prev*. 2005; **29**: 537-543.
- Tsoumpou I**, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2009; **35**: 210-220.
- Umadevi KM**, Ranganathan K, Pavithra S et al. Oral lesions among persons with HIV disease with and without highly active antiretroviral therapy in southern India. *J Oral Pathol Med* 2007; **36**: 136–141.
- UNAIDS**, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS Report on the global AIDS epidemic: Executive summary 2008. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Disponible en: [http://data.unaids.org/pub/Report/2012/JC1700\\_Epi\\_Update\\_2009\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2012/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf) . Página consultada el 5 de noviembre de 2010.
- Uzawa N**, Sonoda I, Myo K, Takahashi K, Miyamoto R, Amagasa T. Fluorescence in situ hybridization for detecting genomic alterations of cyclin D1 and p16 in oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2007; **110**: 2230-2239.
- Vairaktaris E**, Yapijakis C, Psyrri A et al. Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res* 2007; **27**: 979-984.
- Varnai AD**, Bollmann M, Bankfalvi A, et al. The prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in oral epithelial hyperplasia: proposal of a concept. *J Oral Pathol Med* 2009; **38**: 181-187.
- Veldhuizen NJ**, Braunstein SL, Vyankandondera J, Ingabire C, Ntirushwa J, Kestelyn E. The epidemiology of human papillomavirus infection in HIV-positive and HIV-negative high-risk women in Kigali, Rwanda. *BMC Infect Dis* 2011; **11**: 333.
- Vernon SD**, Hart CE, Reeves WC, Icenogle JP. The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus 16 transcription. *Virus Res* 1993; **27**: 133-145.
- Vilmer C**, Cavelier-Balloy B, Pinquier L, Blanc F, Dubertret L. Focal epithelial hyperplasia and multifocal human papillomavirus infection in an HIV-seropositive man. *J Am Acad Dermatol* 1994; **30**: 497-498.
- Viraben R**, Aquilina C, Brousset P, Bazex J. Focal epithelial hyperplasia (Heck disease) associated with AIDS. *Dermatology* 1996; **193**: 261-262.

- Völter C**, He Y, Delius H, et al. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J cancer* 1996; **66**: 453-456.
- von Knebel Doeberitz M**. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; **38**: 2229-2242.
- von Zeidler SV**, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med* 2004; **14**: 807-811.
- Wargon O**. Cimetidine for mucosal warts in an HIV positive adult. *Australas J Dermatol* 1996; **37**: 149-150.
- Warnakulasuriya KA**, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; **27**: 376-381.
- Warrilow D**, Stenzel D, Harrich D. Isolated HIV-1 core is active for reverse transcription. *Retrovirology* 2007; **4**: 77.
- Weinberger PM**, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 736-747.
- Whitaker JM**, Palefsky JM, Da Costa M, King CM, Johnston JS, Barbosa P. Human papilloma virus type 69 identified in a clinically aggressive plantar verruca from an HIV-positive patient. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2009; **99**: 8-12.
- Wiest T**, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; **21**: 1510–1517.
- Witkiewicz AK**, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle*. 2011; **10**: 2497-2503.
- Woodworth CD**, McMullin E, Iglesias M, Plowman GD. Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2840-2844.
- zur Hausen H**. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 2009; **384**: 260-265.

# **CUADROS**

**Cuadro 1a.** Características demográficas y clínicas en 29 individuos infectados por VIH/SIDA, con LB-VPH.

	<b>n ( % )</b>
<b>Género</b>	
Femenino	2 ( 6.9)
Masculino	27 (93.1)
Mediana de edad (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) años	39 (32.5 - 44)
<b>Escolaridad</b>	
< 6 años	1 ( 3.4)
6-9 años	13 (44.8)
> 9 años	15 (51.8)
<b>Ocupación</b>	
Desempleado	13 (44.8)
Empleado	10 (34.5)
Profesionista	5 (17.2)
Estudiante	1 ( 3.4)
<b>Consumo de tabaco</b>	
No	15 (51.7)
Si	10 (34.5)
Ex-fumador	4 (13.8)
<b>Consumo de alcohol</b>	
No	16 (55.2)
Si	11 (37.9)
Ex-bebedor	2 ( 6.9)
<b>Categoría de transmisión</b>	
HSH	25 (86.2)
Heterosexual	4 (13.8)
Mujeres	2 ( 6.9)
Hombres	2 ( 6.9)

Q<sub>1</sub>=cuartil uno; Q<sub>3</sub>=cuartil tres; HSH=hombres que tienen sexo con hombres.

**Cuadro 1b.** Características clínicas de 29 individuos infectados por VIH, con LB-VPH.

	n	( % )
Estadio CDC		
SIDA	22	(75.9)
Asintomático	7	(24.1)
TARAA		
Si	26	(89.7)
No	3	(10.3)
Esquema de TARAA		
NRTI + NNRTI	13	(44.8)
NRTI + IP	10	(34.5)
Otros*	3	(10.3)
Mediana de tiempo de uso de TARAA (meses)	16.5 ( Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> : 4.2 – 50.5)	
CD4+ células/mm <sup>3</sup>		
≤200	10	(34.5)
201-499	14	(48.3)
≥500	5	(17.2)
Mediana de linfocitos CD4+ (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) cel/mm <sup>3</sup>	243 (169 – 455.5)	
Carga viral indetectable		
Si	19	(65.5)
Mediana de carga viral (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) copias/ml	39 (39 – 1000)	
Mediana de carga viral (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) log <sub>10</sub>	3.80 (2.76 – 4.58)	

TARAA=terapia antirretroviral altamente activa; NRTI=inhibidores de transcriptasa reversa nucleósidos; NNRTI=inhibidores de transcriptasa reversa no nucleósidos; IP=inhibidores de proteasa. CV=carga viral.

\*Otros: un paciente estaba con NNRTI+IP; otro con NRTI+NNRTI+IP; y un tercero con 4 NRTI's.

**Cuadro 2.** Características histopatológicas por tipo de LB-VPH de 36 lesiones en 29 pacientes VIH/SIDA.

	<b>HEM</b>	<b>Papiloma</b>	<b>Verruga</b>	<b>Condiloma</b>
	<b>(n=17)</b>	<b>escamocelular</b>	<b>vulgar</b>	<b>acuminado</b>
	<b>n ( % )</b>	<b>n ( % )</b>	<b>n ( % )</b>	<b>n ( % )</b>
Coilocitos	17 (100)	13 (100)	5 (100)	1 (100)
Epitelio plano hiperqueratinizado	12 (70.6)	13 (100)	5 (100)	1 (100)
Hiperplasia basilar	14 (82.4)	12 (92.3)	2 (40.0)	1 (100)
Figuras mitosoides	14 (82.4)	10 (71.4)	4 (80.0)	0 (0.0)
Procesos papilares elongados hacia el centro (“cúpula”)	12 (70.6)	8 (61.5)	5 (100)	0 (0.0)
Maduración normal	10 (58.8)	9 (69.2)	4 (75.5)	0 (0.0)
Inclusiones intranucleares eosinófilas en estrato granular.	10 (58.8)	8 (61.5)	1 (20.0)	1 (100)
Acantosis con proyecciones superficiales y marcada queratosis	3 (17.6)	11 (84.6)	5 (100)	0 (0.0)
Proyecciones digitiformes	0 (0.0)	10 (71.4)	1 (20.0)	0 (0.0)
Tallo de tejido conectivo fibrovascular	0 (0.0)	10 (71.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
Criptas llenas de queratina	2 (11.8)	5 (38.4)	5 (100)	0 (0.0)
Estrato granular prominente	0 (0.0)	1 (7.6)	3 (60.0)	0 (0.0)

HEM=Hiperplasia epitelial multifocal.

**Cuadro 3.** Relación entre los tipos de VPH y el diagnóstico histopatológico de las 36 muestras de LB-VPH en 29 pacientes infectados con VIH.

Tipo de VPH	HEM*	PEC	VV	CA	Total
	(n=17)	(n=13)	(n=5)	(n=1)	(n=36)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Bajo riesgo</b>					
32	8 (47.0)	2 (15.4)	5 (100)	1 (100)	16 (44.4)
13	2 (11.8)	5 (38.4)	---	---	7 (19.4)
6	2 (11.8)	2 (15.4)	---	---	4 (11.1)
7	---	2 (15.4)	---	---	2 ( 5.5)
11	---	2 (15.4)	---	---	2 ( 5.5)
<b>Alto y bajo riesgo</b>					
16 y 32	1 ( 5.9)	---	---	---	1 ( 2.7)
16 y 32	1 ( 5.9)	---	---	---	1 ( 2.7)
16 y 42	1 ( 5.9)	---	---	---	1 ( 2.7)
<b>Riesgo indeterminado</b>					
74 <sup>a</sup>	1 ( 5.9)	---	---	---	1 ( 2.7)
LVX100	1 ( 5.9)	---	---	---	1 ( 2.7)

HEM=Hiperplasia epitelial multifocal; PEC=Papiloma escamocelular; VV=Verruga vulgar; CA=Condiloma acuminado. \* Cuatro HEM tuvieron infección múltiple. <sup>a</sup>La muestra contenía también VPH-13.

**Cuadro 4.** Análisis molecular de muestras LB-VPH en pacientes infectados con VIH.

ID	Diagnóstico	Tipo de VPH	Inmunodetección de p16 <sup>INK4a</sup>	
			Porcentaje de células positivas*	Intensidad global
1	HEM	74 <sup>a</sup>	99.5	Alta
2	HEM	32	99.1	Alta
3	HEM	32	98.7	Alta
4	HEM	32	91.1	Moderada
5	HEM	32	99.9	Moderada
6	HEM	32	99.3	Moderada
7	HEM	32	98.7	Moderada
8	HEM	32 <sup>b</sup>	98.8	Moderada
9	HEM	32	98.4	Moderada
10	HEM	32	99.8	Moderada
11	HEM	16 <sup>c</sup>	99.1	Moderada
12	HEM	16 <sup>d</sup>	99.7	Moderada
13	HEM	13	98.5	Moderada
14	HEM	13	98.4	Moderada
15	HEM	LVX100	98.9	Moderada
16	HEM	6	98.5	Moderada
17	HEM	6	98.4	Moderada
18	PEC	32	95.7	Alta
19	PEC	32	98.7	Moderada
20	PEC	13	98.7	Moderada
21	PEC	13	97.7	Moderada
22	PEC	13	98.0	Moderada
23	PEC	13	100	Moderada
24	PEC	13	98.6	Moderada
25	PEC	11	97.3	Moderada
26	PEC	11	98.5	Moderada
27	PEC	7	97.4	Moderada
28	PEC	7	99.3	Moderada
29	PEC	6	98.1	Alta
30	PEC	6	99.3	Moderada
31	VV	32	96.6	Alta
32	VV	32	88.4	Alta
33	VV	32	96.6	Alta
34	VV	32	94.2	Moderada
35	VV	32	84.4	Moderada
36	CA	32	97.8	Alta

HEM=Hiperplasia epitelial multifocal; PEC=Papiloma escamocelular; VV=Verruga vulgar; CA=Condiloma acuminado. Tipos virales encontrados en las muestras con infección múltiple: <sup>a</sup>VPH-13; <sup>b</sup>VPH-16; <sup>c</sup>VPH-32; <sup>d</sup>VPH-42. \*El porcentaje y gradiente de intensidad se calculó considerando cuatro campos a 20x y la intensidad fue confirmada considerando cuatro campos a alta resolución.

**Cuadro 5.** Relación del diagnóstico histopatológico con la presencia de los tipos de VPH de las 12 LB-VPH de 5 pacientes con VIH/SIDA, en quienes se presentó y se analizó más de una LB-VPH.

Paciente n=5	Lesión n=12	Diagnóstico histopatológico	Tipo de VPH
1	Lesión 1	HEM	6
	Lesión 2	HEM	32
2	Lesión 3	VV	32
	Lesión 4	VV	32
	Lesión 5	VV	32
	Lesión 6	HEM	32
3	Lesión 7	VV	32
	Lesión 8	HEM	32
4	Lesión 9	PEC	13
	Lesión 10	HEM	13
5	Lesión 11	PEC	32
	Lesión 12	HEM	32

HEM=Hiperplasia epitelial multifocal; PEC=Papiloma escamocelular; VV=Verruga vulgar; CA=Condiloma acuminado.

**Cuadro 6.** Porcentaje de inmunodetección de p16<sup>INK4a</sup> y gradiente de intensidad en muestras de mucosa bucal normal por estratos.

	<b>Porcentaje de inmunoexpresion (% núcleos positivos)</b>	<b>Intensidad</b>
<b>Mucosa yugal</b>		
Estrato basal	(90.5)	Leve
Estrato medio	(82.4)	Leve
Estrato superficial	(33.3)	Leve
Total	(79.3)	
<b>Mucosa lingual</b>		
Estrato basal	(99.2)	Moderada
Estrato medio	(83.2)	Leve
Estrato superficial	(42.2)	Leve
Total	(67.6)	
<b>Mucosa labial</b>		
Estrato basal	(100)	Moderada
Estrato medio	(98.1)	Leve
Estrato superficial	(48.4)	Leve
Total	(84.9)	

**Cuadro 7.** Gradiente de intensidad de p16<sup>INK4a</sup> por estratos en 36 muestras de LB-VPH de 29 pacientes infectados con VIH.

			Intensidad de inmunodetección de p16		P
			Moderada	Alta	
			n (%)	n (%)	
Lesiones bucales asociadas al VPH	HEM n=17	Estrato basal	14 (82.4)	3 (17.6)	0.451
		Estrato medio	15 (88.2)	2 (11.8)	
		Estrato superficial	13 (76.5)	4 (23.5)	
	PEC n=13	Estrato basal	9 (69.2)	4 (30.8)	0.061
		Estrato medio	12 (92.3)	1 ( 7.7)	
		Estrato superficial	12 (92.3)	1 ( 7.7)	
	VV n=5	Estrato basal	2 (40.0)	3 (60.0)	0.574
		Estrato medio	2 (40.0)	3 (60.0)	
		Estrato superficial	2 (40.0)	3 (60.0)	
	CA n=1	Estrato basal	0 ( 0.0)	1 ( 100)	0.454
		Estrato medio	1 ( 100)	0 ( 0.0)	
		Estrato superficial	0 ( 0.0)	1 ( 100)	
	<b>Total</b> <b>n=36</b>	Estrato basal	25 (69.4)	11 (30.5)	0.060
Estrato medio		30 (83.3)	6 (16.6)		
Estrato superficial		27 (75.0)	9 (25.0)		

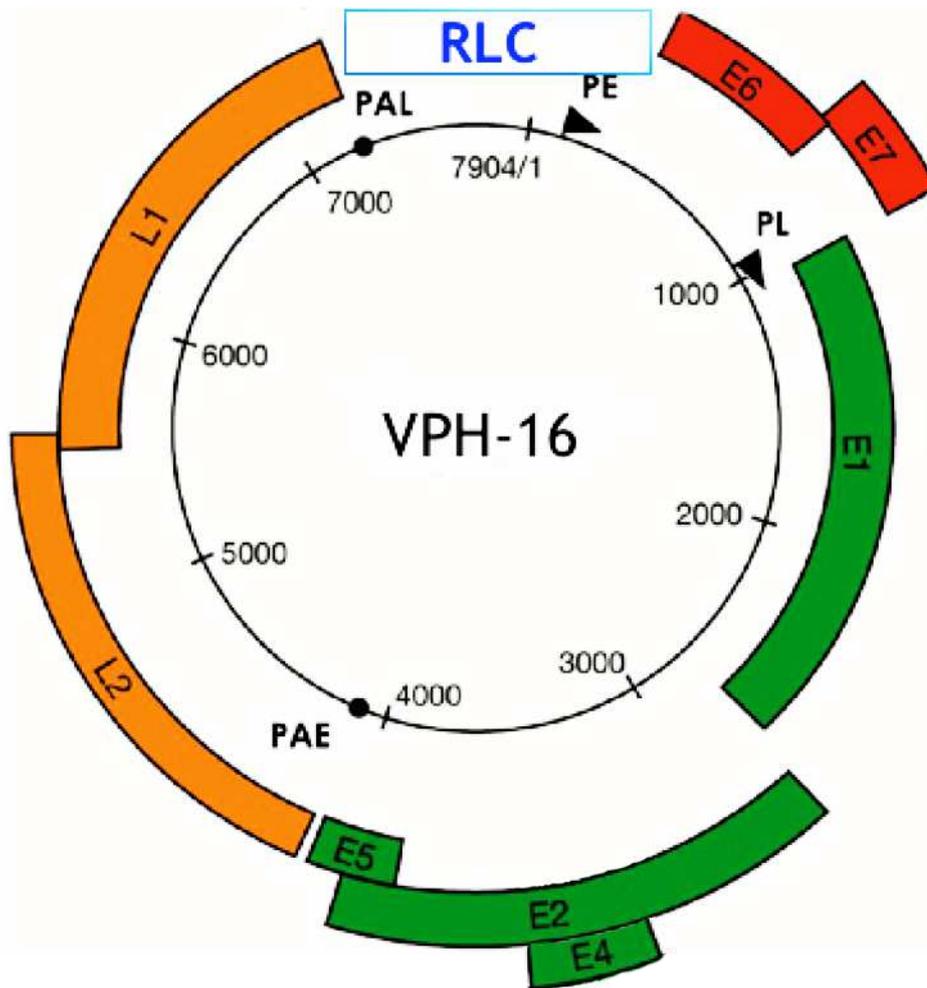
HEM=Hiperplasia epitelial multifocal; PEC=Papiloma escamocelular; VV=Verruga vulgar;  
CA=Condiloma acuminado.

**Cuadro 8.** Asociación entre el gradiente de intensidad de inmunodetección de p16<sup>INK4a</sup> y las variables consideradas en el estudio.

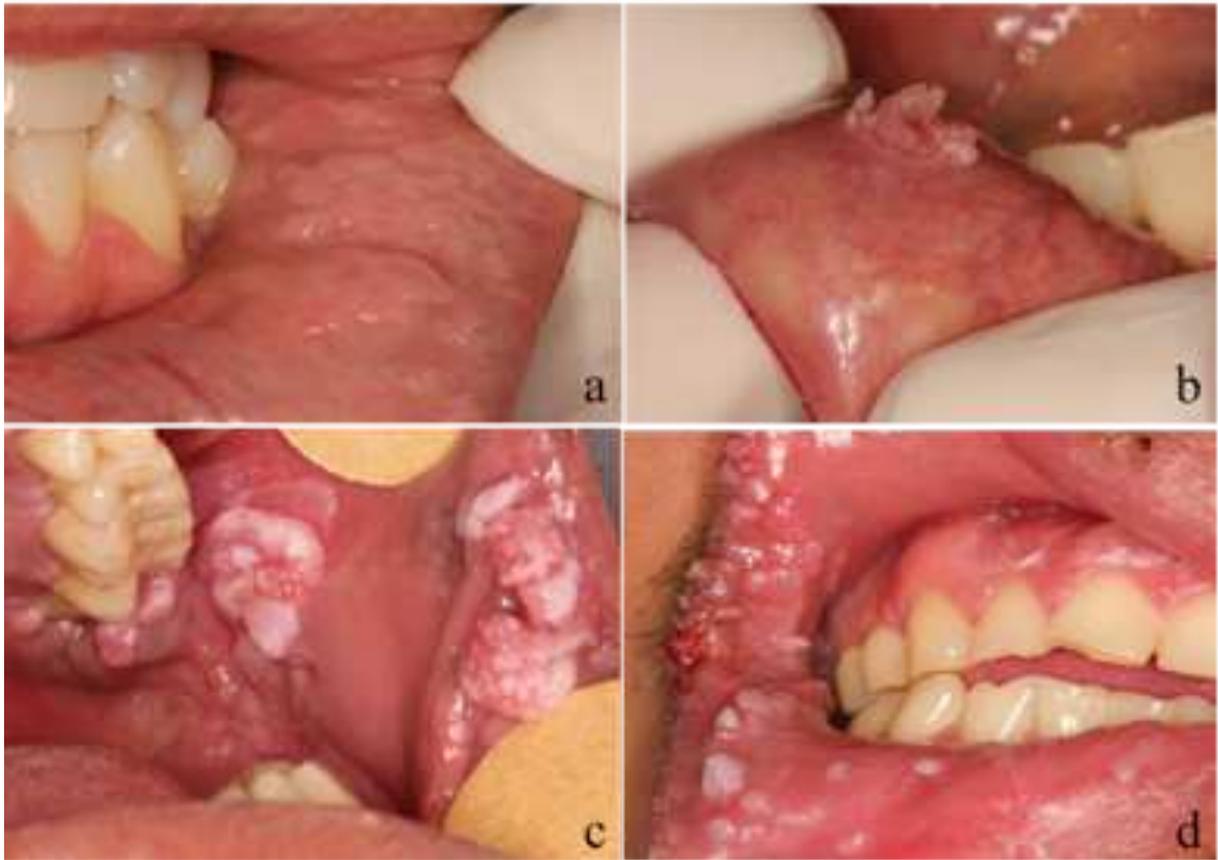
	Intensidad moderada	Intensidad alta	P
	n=27	n=9	
	n (%)	n (%)	
Mediana de edad (años) (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	39.5 (30 - 44)	38.0 (30.7-40 )	0.847
Mediana de TARAA (meses) ( Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	12.5 (2.5-63.5)	12 (5-36.5)	0.890
Consumo de tabaco			
Si	13 (48.1)	5 (55.6)	0.847
No	14 (51.9)	4 (44.4)	
Consumo de alcohol			
Si	12 (44.4)	5 (55.6)	0.563
No	15 (55.6)	4 (44.4)	
Grupo de riesgo			
HSH	24 (88.9)	8 (88.9)	1.000
Heterosexual	3 (11.1)	1 (11.1)	
Estadio CDC			
Asintomático	7 (25.9)	1 (11.1)	0.648
SIDA	20 (74.1)	8 (88.9)	
Linfocitos CD4+			
≤200	10 (37.0)	5 (55.6)	0.613
200-499	12 (44.4)	3 (33.3)	
>500	5 (18.5)	1 (11.1)	
Carga viral indetectable			
No	10 (37.0)	4 (44.4)	0.712
Si	17 (63.0)	5 (55.6)	
Tipo VPH			
Alto riesgo	3 (11.1)	0 ( 0.0)	0.296
Bajo riesgo	24 (88.9)	9 ( 100)	
Infección múltiple			
Si	3 (11.1)	1 (11.1)	1.000
No	24 (88.9)	8 (88.9)	
Diagnóstico histopatológico			
HEM	14 (51.9)	3 (33.3)	0.060
PEC	11 (40.7)	2 (22.2)	
VV	2 ( 7.4)	3 (33.3)	
CA	0 ( 0.0)	1 (11.1)	
Localización de LB-VPH			
Mucosa labial	18 (66.7)	5 (55.6)	0.441
Mucosa yugal	4 (14.8)	2 (22.2)	
Lengua dorso, lateral y ventral	4 (14.8)	1 (11.1)	
Piso de boca	1 ( 3.7)	0 ( 0.0)	
Paladar duro	0 ( 0.0)	1 (11.1)	

HEM=Hiperplasia epitelial multifocal; PEC=Papiloma escamocelular; VV=Verruga vulgar; CA=Condiloma acuminado.

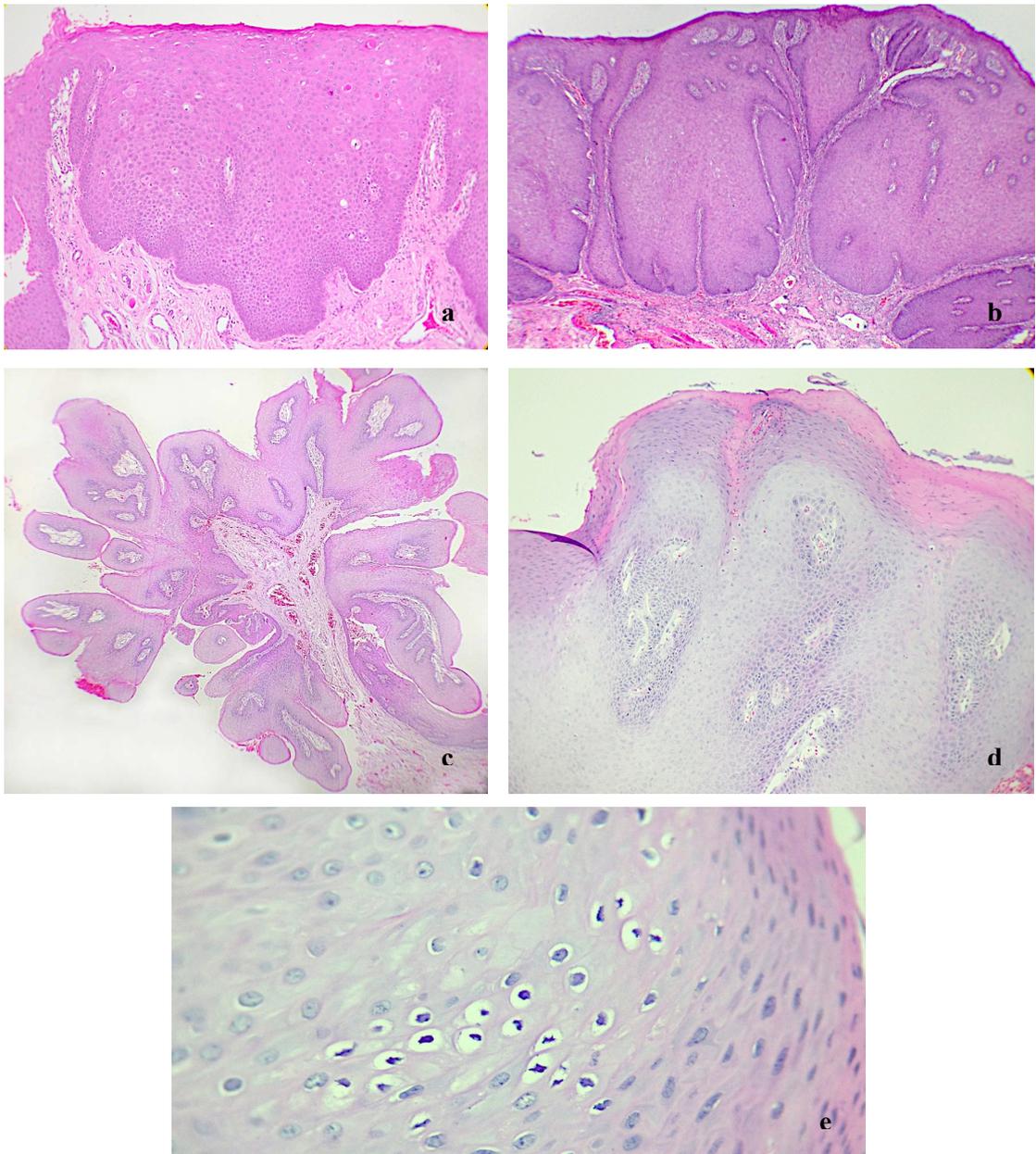
# FIGURAS



**Figura 1. Organización genómica del VPH-16.** Representa la organización genómica típica de los Alfapapilomavirus de alto riesgo (incluyendo VPH-18) y comprende una región larga de control (RLC) y ocho genes, los cuales son necesarios en los diferentes estadios del ciclo viral. La RLC contiene sitios de unión para factores de transcripción celular así como para las proteínas E1 y E2, los cuales controlan la replicación viral y expresión genética. PAE y PAL indican las posiciones de los sitios de poliadenilación temprana y tardía en el genoma. (Adaptado de Doorbar y cols. Vaccine 2012; 30 Suppl 5:F55-70).



**Figura 2. Imágenes clínicas de las diferentes lesiones bucales asociadas al VPH.** a) Hiperplasia epitelial multifocal en mucosa labial inferior, se observan múltiples pápulas de base sésil, superficie plana y coalescentes. b) Papiloma escamocelular en mucosa labial inferior, lesión exofítica de base pediculada y proyecciones digitiformes. c) Condiloma acuminado en mucosa yugal, lesión exofítica, extensa, de color blanquecino y múltiple. d) Ejemplo de presentación múltiple de lesiones bucales asociadas a VPH. La presente fotografía se trata de un paciente masculino de 30 años, a quien se le retiraron cuatro LB-VPH, las cuales al análisis histopatológico fueron tres verrugas vulgares y una hiperplasia epitelial multifocal.



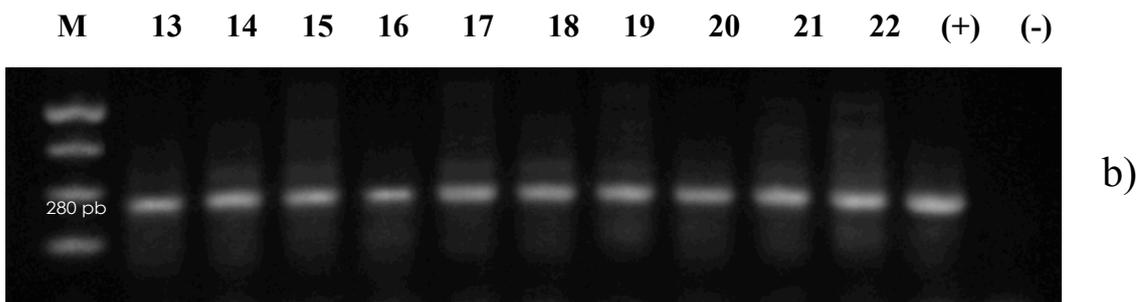
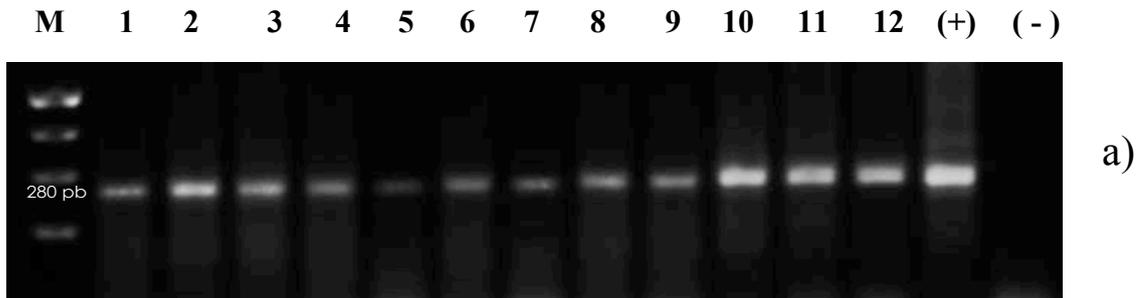
**Figura 3. Características histopatológicas de las diferentes lesiones bucales asociadas al VPH.**

**a) Hiperplasia epitelial multifocal.** Lesión caracterizada por la proliferación de epitelio plano estratificado paraqueratinizado cuyos procesos epiteliales elongados confluyen entre si; se observa hiperplasia basilar, diversos coilocitos y varias figuras mitosoides suprabasales (H&E 10X).

**b) Condiloma acuminado.** Lesión constituida por epitelio plano estratificado acantósico con paraqueratosis leve, dispuesto en proyecciones papilares anchas con escasos coilocitos, dichas proyecciones se encuentran apoyadas sobre tejido fibroconectivo laxo (H&E 4x).

**c) Pápiloma escamocelular.** Se observan múltiples proyecciones dactiliformes compuestas por epitelio plano estratificado paraqueratinizado acantósico, soportada por un delgado tallo de tejido fibroconectivo laxo bien vascularizado (H&E 4x).

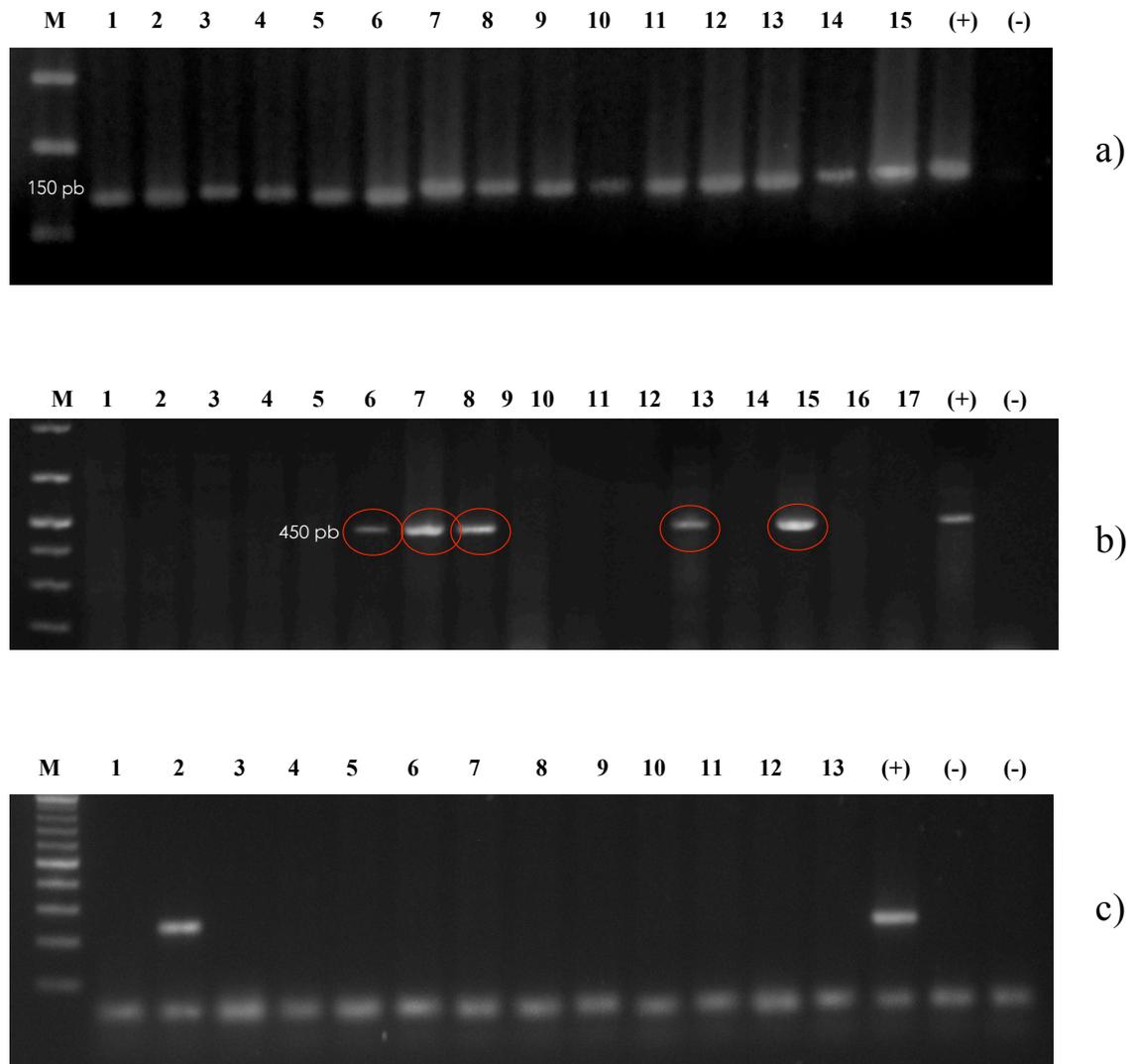
**d) y e) Verruga vulgar.** Las criptas llenas de queratina, característica frecuente de esta lesión (H&E 10x). Los coilocitos son más abundantes que en el papiloma escamocelular (H&E 40x).



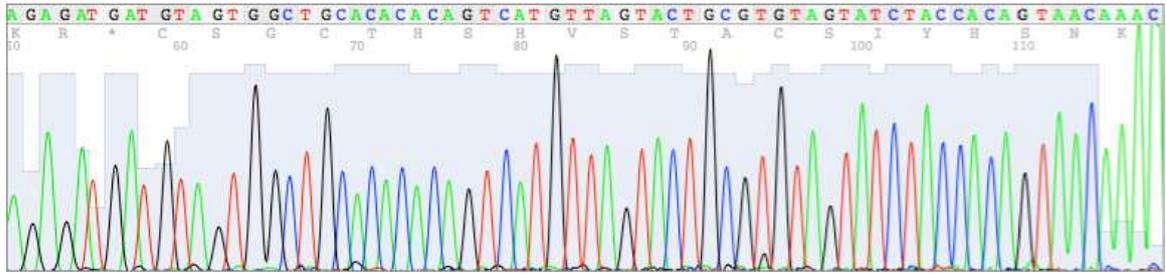
**Figura 4. Figura representativa de amplificación del gen  $\beta$ -globina.**

M=Marcador de peso molecular. (+)=Control positivo, ADN de la línea celular HeLa. (-)=Control negativo, mezcla de PCR sin ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Representa los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa del gen  $\beta$ -globina, con oligonucleótidos PC04 y GH20.

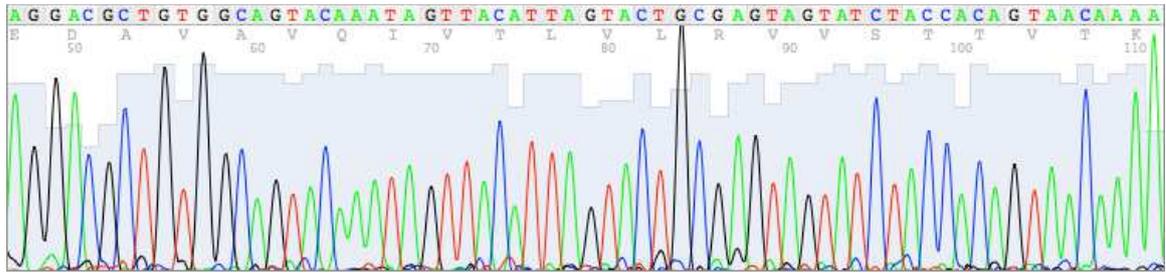
a) Se observa amplificación de todas las muestras (1-12), excepto el control negativo. b) Amplificaron todas las muestras (13-22), excepto el control negativo.



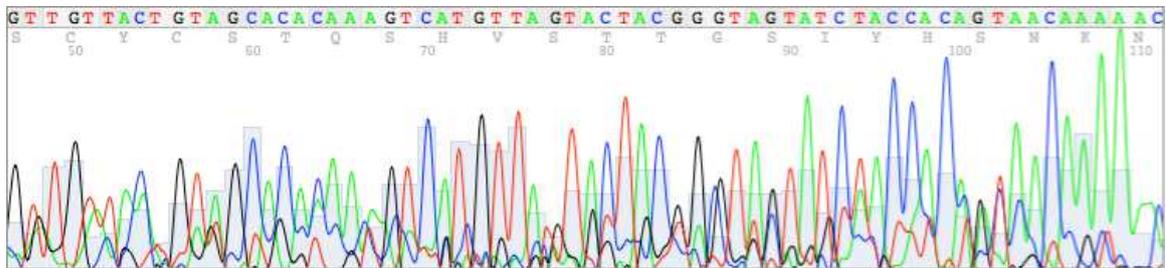
**Figura 5. Figura representativa de amplificación del gen de región L1 de VPH y E6 de VPH-16.** (M)=Marcador de peso molecular. (+)=Control positivo: ADN de la línea celular HeLa. (-)=Control negativo, mezcla de PCR sin ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. a)Amplificación del fragmento GP del gen L1, con oligonucleótidos GP5+/GP6+, se observa que todas las muestras amplificaron, excepto el control negativo b) Resultados de la reacción en cadena de la polimerasa del fragmento MY del gen L1, con oligonucleótidos MY09/11, de las 17 muestras. Amplificaron el fragmento de 450 pb las muestras 6, 7, 8, 13 y 15. c)Amplificación del gen E6 del VPH-16 con oligonucleótidos específicos F204/R419, únicamente la muestra 2 y el control positivo (Siha) amplificaron.



a) VPH-13



b) VPH-32



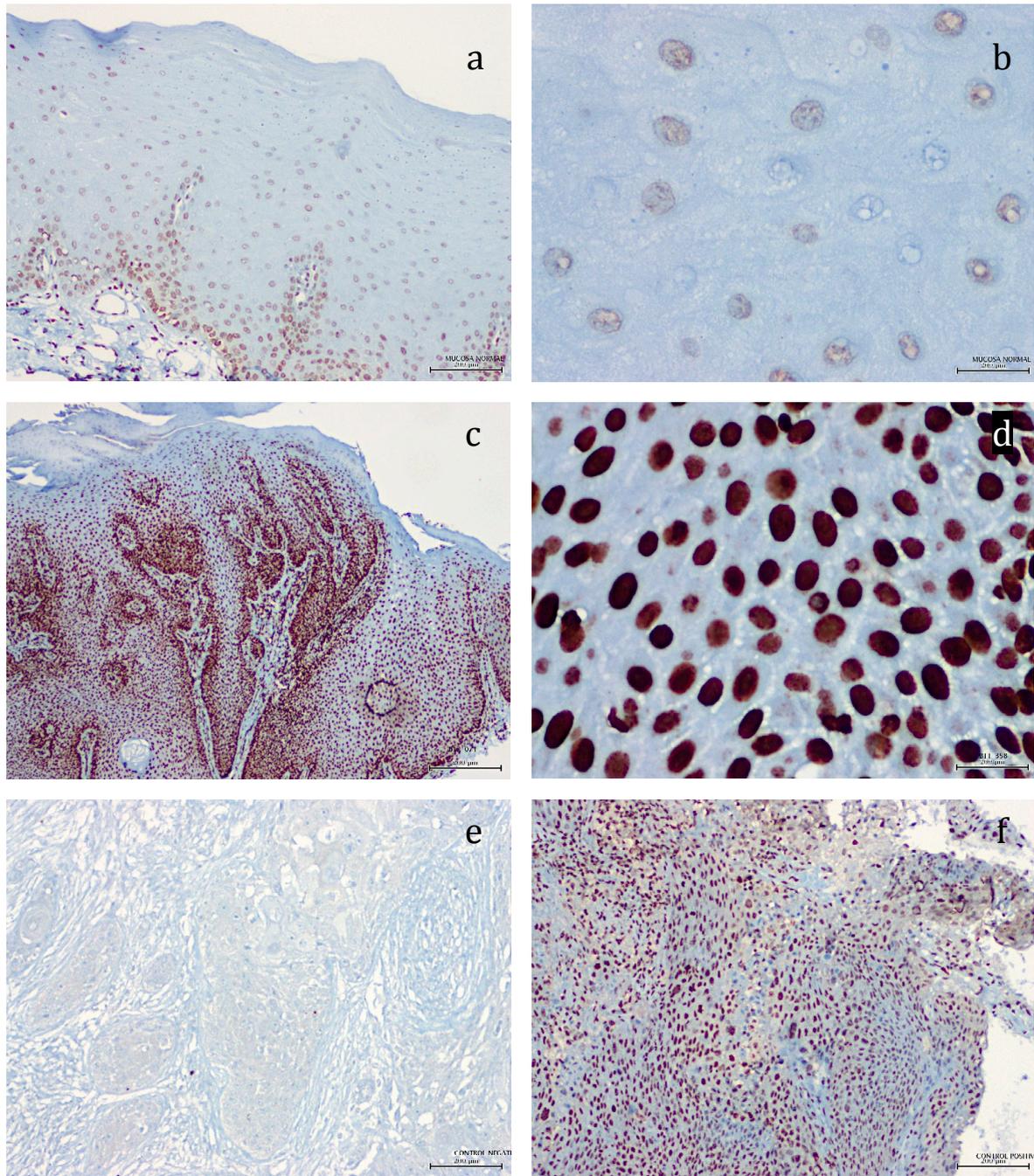
c) Infección múltiple.

**Figura 6. Figuras representativas de las secuencias de VPH encontradas en las LB-VPH.**

a) Cromatograma correspondientes al tipo viral de bajo riesgo 13.

b) Cromatograma correspondiente al tipo viral de bajo riesgo 32.

c) Cromatograma representativo de infección múltiple.



**Figura 7. Figura representativa de la inmunodetección de la proteína p16<sup>INK4a</sup>.** a) Mucosa bucal sana. Se observa inmunodetección nuclear leve, la cual disminuye gradualmente desde el estrato basal hacia el superficial. b) Detalle de acercamiento a 40x de mucosa bucal sana, se observa inmunodetección nuclear leve en algunas células y ausencia de inmunodetección en otras. c) Lesión bucal asociada al VPH. Se observa gradiente de intensidad moderada generalizada y mayor expresión de la proteína en comparación a la mucosa bucal sana. d) Detalle de acercamiento a 40x de lesión bucal asociada al VPH, se observa inmunodetección nuclear y gradiente de intensidad moderada y alta. e) Control negativo del ensayo de inmunohistoquímica (carcinoma escamocelular bucal negativo a p16<sup>INK4a</sup>). f) Control positivo del ensayo de inmunohistoquímica (CaCU positivo a VPH).

# **A N E X O S**

## Anexo I. Sintomatología y condiciones indicadoras de categorías clínicas B y C.

(Schneider y cols, 2008)

Condiciones de categoría B	Condiciones indicadoras de SIDA
1. Angiomatosis bacilar.	1. Candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar.
2. Candidiasis bucal.	2. Candidiasis esofágica.
3. Candidosis vulvovaginal persistente, frecuente o con mala respuesta al tratamiento.	3. Carcinoma invasor de cérvix.
4. Displasia de cérvix (moderada o grave) o carcinoma de cuello uterino.	4. Coccidioidomicosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares).
5. Fiebre ( $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ ) o diarrea de más de un mes.	5. Criptococosis extrapulmonar.
6. Leucoplasia vellosa.	6. Criptosporidiasis con diarrea de más de un mes.
7. Herpes zóster (dos episodios o uno que afecte más de un dermatoma).	7. Infección por citomegalovirus, de un órgano diferente del hígado, bazo o ganglios linfáticos, en un paciente de edad superior a 1 mes.
8. Púrpura trombocitopénica idiopática.	8. Retinitis por citomegalovirus.
9. Listeriosis.	9. Encefalopatía por VIH.
10. Enfermedad inflamatoria pélvica, sobre todo si se complica con absceso tuboovárico.	10. Infección por virus del herpes simple que curse una úlcera mucocutánea de más de 1 mes de evolución, o bien con bronquitis, neumonitis o esofagitis de cualquier duración, que afecten a un paciente de más de 1 mes de edad.
11. Neuropatía periférica.	11. Histoplasmosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares).
12. Herpes zóster (dos episodios o uno que afecte más de un dermatoma).	12. Isosporidiasis crónica ( $>1$ mes).
	13. Sarcoma de Kaposi.
	14. Linfoma de Burkitt o equivalente.
	15. Linfoma inmunoblástico o equivalente.
	16. Linfoma cerebral primario.
	17. Infección por <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> o <i>Mycobacterium kansasii</i> diseminada o extrapulmonar.
	18. Tuberculosis pulmonar.
	19. Tuberculosis extrapulmonar o diseminada.
	20. Infección por otras micobacterias, diseminada o extrapulmonar.
	21. Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i> .
	22. Neumonía bacteriana recurrente.
	23. Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
	24. Sepsis recurrente por especies de <i>Salmonella</i> diferentes de <i>Salmonella typhi</i> .
	25. Toxoplasmosis cerebral en un paciente de más de 1 mes de edad.
	26. Síndrome de desgaste por VIH.
	27. Tuberculosis extrapulmonar o diseminada.

**Anexo II. Lesiones bucales relacionadas a la infección por VIH. (Shiboski y cols, 2009).**

<b>Etiología</b>	<b>Lesión bucal/Condición</b>	<b>Localización</b>
Infecciones micóticas	Candidosis pseudomembranosa	Cualquier sitio
	Candidosis eritematosa	Paladar, dorso de lengua, mucosa bucal
	Queilitis angular	Comisuras labiales
Infecciones virales	Leucoplasia vellosa	Lengua lateral
	LB-VPH	Cualquier sitio
	Herpes labial recurrente	Borde bermellón
	Herpes simple recurrente intrabucal	Encía y paladar duro
Infecciones bacterianas	Gingivitis ulcerativa necrotizante	Encía
	Periodontitis ulcerativa necrotizante	Encía y hueso alveolar
Condiciones idiopáticas	Estomatitis aftosa recurrente	Mucosa no queratinizada
	Úlceras no especificadas (NOS)/Estomatitis ulcerativa necrotizante	Cualquier sitio
		Cualquier sitio
Neoplasias	Sarcoma de Kaposi	Cualquier sitio (más en paladar, encías)
	Linfoma No-Hodgkin bucal	Cualquier sitio (más en paladar, encías, fauces)
	Carcinoma escamocelular bucal	Cualquier sitio (más en lengua)

### ANEXO III. Consentimiento informado.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

Consentimiento de participación en el estudio:

#### **EXPRESIÓN DE P16<sup>INK4a</sup> EN LESIONES BUCALES ASOCIADAS A VPH EN PACIENTES CON VIH/SIDA**

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 los tipos de lesiones bucales asociadas al Virus del Papiloma Humano (VPH) en pacientes con VIH/SIDA, los tipos virales involucrados, así como la determinación de la expresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup>. 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.

Estoy enterado de que es probable que se me tomen fotografías clínicas de la lesión bucal encontrada, protegiendo siempre mi identidad y únicamente con fines diagnósticos, necesarios para la correlación clínico-histopatológica.

Adicionalmente, se me hará un interrogatorio que incluirá preguntas en relación a uso de antirretrovirales y antecedentes de tabaquismo, alcohol 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. Sin embargo al finalizar el procedimiento se me darán indicaciones post-operatorias para evitar complicaciones posteriores.

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.

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



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

consignará en el expediente correspondiente. No será 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: \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO: \_\_\_\_\_

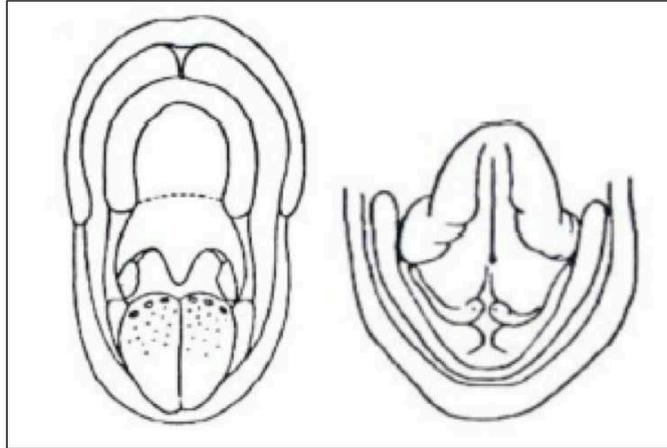




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO



**Localizaciones:** <sup>1</sup>Mucosa labial, <sup>2</sup>Mucosa yugal/Fondo de saco, <sup>3</sup>Piso de boca, <sup>4</sup>Lengua ventral/Frenillo lingual, <sup>5</sup>Paladar blando/Úvula/Orofaringe, <sup>6</sup>Dorso de lengua, <sup>7</sup>Borde lingual derecho, <sup>8</sup>Borde lingual izquierdo, <sup>9</sup>Paladar duro, <sup>10</sup>Encía/Proceso alveolar, <sup>11</sup>Bermellón

No. de biopsia: \_\_\_\_\_ Resultado histopatológico: \_\_\_\_\_

Cepillado: \_\_\_\_\_

Tipo viral: \_\_\_\_\_

Expresión de p16: \_\_\_\_\_

**Anexo V. Orden sistemático para el examen bucal** (Ramírez-Amador y cols, 1986).

1. *Labio externo, superior e inferior.* Parte del labio cubierta por piel limitada en la parte superior por el surco nasolabial, a los lados por los surcos nasogenianos y en la parte inferior por el surco labio mentoniano.
2. *Área bermellón, superior e inferior.* Área de color rojo que está entre el labio externo y la mucosa labial.
3. *Comisuras labiales, derecha e izquierda.* Área de mucosa bucal que se extiende aproximadamente 1.5cms distalmente del ángulo de la boca.
4. *Mucosa labial, superior inferior.* Área rectangular que se extiende del borde bermellón a un centímetro de la parte más profunda del surco bucal y lateralmente a una línea trazada verticalmente de los ángulos de la boca.
5. *Surco bucal superior e inferior.* Área comprendida entre la línea mucogingival, a una línea imaginaria que corre paralela y que está ubicada a 1cm de la mucosa bucal.
6. *Mucosa bucal derecha e izquierda.* Parte interna de los carrillos limitada por los surcos bucales superior o inferior y anteriormente por la mucosa labial
7. *Frenillo labial superior e inferior.* Banda continua de tejido blando localizada en la línea media que une a la mucosa labial con la mucosa alveolar.
8. *Paladar duro.* Área triangular comprendida entre el proceso alveolar superior y la unión del paladar duro y blando.
9. *Paladar blando.* Área limitada en su parte anterior por la unión con paladar duro y en la posterior con los pilares anteriores, amigdalinos e incluyendo la úvula.
10. *Amígdalas.*
11. *Base del dorso en la lengua.* Área rectangular posterior a la V lingual y entre los dos pilares anteriores.
12. *Lengua tercio medio.* Área triangular posterior a la punta de la lengua limitada atrás por el surco terminal y a los lados por los bordes laterales.
13. *Punta de lengua.* Área circular con un radio de aproximadamente 1cm ubicado en la parte anterior de la misma.

14. *Bordes laterales derecho e izquierdo.* Área rectangular que empieza posterior a la punta de la lengua, se extiende atrás y cubre 1cm del borde dorsal y ventral de la lengua.
15. *Superficie ventral de la lengua.* Superficie inferior de la lengua, limitada lateralmente por los bordes de la lengua e inferiormente por el piso de la boca.
16. *Piso de boca.* Frontal: área triangular cuyo vértice está localizado en el frenillo lingual y cuya base está formada por el área comprendida por las caras distales de los caninos inferiores.
17. *Lateral: derecho e izquierdo.* Áreas triangulares al área frontal.
18. *Frenillo lingual.* Banda continua de tejido blando localizada en línea media que une a la parte ventral de la lengua con el piso de la boca.
19. *Surco lingual.* Se encuentra entre la línea mucogingival lingual y el piso de boca.
20. *Encía libre.* La encía libre o marginal es la parte coronaria no insertada que rodea al diente a modo de manguito y forma el surco gingival.
21. *Encía adherida.* Esta encía, está limitada por la unión mucogingival y por la línea del surco gingival libre y puede presentar un ancho variable.
22. *Proceso alveolar superior.* Reborde óseo en forma de herradura, suavemente convexo, no presenta dientes y está cubierto por mucosa.
23. *Proceso alveolar inferior.* Reborde óseo en forma de herradura, convexo, no presenta dientes y está cubierto por mucosa.

## **Anexo VIa. Criterios para el diagnóstico clínico de LB-VPH.**

**Hiperplasia epitelial multifocal.** Clínicamente se caracteriza por la presencia de múltiples pápulas o nódulos poco elevados, redondeados, los cuales tienden a coalescer, de color pálido o igual a la mucosa adyacente, superficie lisa y consistencia suave (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Falaki F y cols, 2009; Delgado y cols, 2005), de tamaño entre 0.1 y 1 cm (Syrjanen 2003). Se localizan en mucosa no queratinizada, generalmente mucosa labial. Tienden a desaparecer al traccionar la mucosa afectada (Syrjanen 2003). En el desarrollo de esta lesión se encuentran involucrados los tipos virales VPH-13 y VPH-32. (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003)

**Papiloma escamocelular.** Se presenta clínicamente como un nódulo exofítico, con numerosas proyecciones digitiformes puntiagudas o aplanadas, con apariencia similar a una coliflor, generalmente pediculada; de color blanco, ligeramente eritematoso o similar a la mucosa bucal y asintomático. Pueden presentarse únicas o múltiples, pueden llegar a medir desde 0.5 hasta tres centímetros. Los sitios de predilección son paladar blando, labios y lengua (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Prashant y cols, 2010; Anderson y cols, 2003; Abbey y cols 1980) Los tipos virales involucrados son VPH-6 y VPH-11. (Syrjanen 2003)

**Verruga vulgar.** Es la LB-VPH mas frecuente de piel, sin embargo, también se ha encontrado en mucosa bucal (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003). En donde pueden presentarse como una pápula o nódulo, asintomáticos, con proyecciones papilares o superficie rugosa, de base pediculada o sésil, color blanquecino, únicas o múltiples, y usualmente miden menos de 5 mm. Los sitios de localización más frecuentes en mucosa bucal son las áreas cuyo epitelio muestra queratinización similar a la piel como labio, paladar duro y encía (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003). A esta lesión se encuentran involucrados los tipos virales VPH-2, VPH-4 y VPH-57 (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003).

**Condiloma acuminado.** Esta LB-VPH clínicamente se caracteriza por la presencia de un aumento de volumen exofítico, con proyecciones aplanadas de base sésil, bien delimitada, de consistencia firme y color rosada o blanquecina. El tamaño puede variar de uno hasta tres centímetros. Los sitios de localización mas frecuentes son la mucosa labial, paladar blando y frenillo lingual (Kumaraswamy y Vidhya 2011). Los tipos virales involucrados en el desarrollo de esta lesión son VPH-6 y VPH-11 (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003), y en menor frecuencia VPH-16 y VPH-18 (Kumaraswamy y Vidhya 2011).

**Anexo VIb. Criterios histopatológicos utilizados para el diagnóstico histopatológico de las LB-VPH (Barnes y cols, 2005; Praetorius 1997; Abbey y cols, 1980).**

Criterios histológicos	LB-VPH			
	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	*	***	-	-

\* Característica poco evidente, en menos del 30% de la lesión; \*\* Característica evidente del 30% hasta el 50% de la lesión; \*\*\*Característica muy evidente, en más del 50% de la lesión.

**Papiloma escamocelular.** Al análisis histopatológico, se observa una lesión caracterizada por la proliferación de epitelio plano estratificado queratinizado, con patrón de maduración normal, dispuesto en proyecciones digitiformes con tallos de tejido fibroconectivo. Ocasionalmente pueden mostrar hiperplasia basilar y actividad mitótica. Algunas ocasiones, en el estrato espinoso se observan *coilocitos*, los cuales son células epiteliales alteradas por el virus, con núcleos picnóticos rodeados por un halo claro. (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Prashant y cols, 2010; Abbey y cols 1980).

**Verruga vulgar.** Al análisis histopatológico, se observa una lesión caracterizada por la proliferación de epitelio plano estratificado hiperqueratinizado, dispuesto en proyecciones digitiformes con centros de tejido conectivo y procesos epiteliales, los cuales convergen hacia el centro de la lesión, formando una “cúpula”. Abundantes *coilocitos* en el estrato espinoso superficial y un estrato granular prominente, en el cual se pueden observar inclusiones virales intranucleares eosinófilas (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003).

**Hiperplasia epitelial multifocal.** Histopatológicamente es una lesión caracterizada por un epitelio hiperplásico, acantótico, de procesos epiteliales anchos, los cuales confluyen en la base. Puede haber queratinocitos superficiales con cambios *coilocíticos* y otros con núcleos alterados mostrando figuras mitosoides (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003).

**Condiloma acuminado.** Al análisis histopatológico se observa una proliferación de epitelio plano estratificado acantótico con queratosis leve y superficie con proyecciones papilares anchas y aplanadas, con delgados centros de tejido conectivo, con apariencia de criptas llenas de queratina. Son frecuentes los *coilocitos* en el estrato espinoso (Kumaraswamy y Vidhya 2011; Syrjanen 2003).

**ANEXO VII. Condiciones utilizadas para los oligonucleótidos utilizados.**

Condiciones utilizadas para oligonucleótidos GH20/PCO<sub>4</sub> para amplificar gen β-globina.

<b>Amplificación del gen β-globina en 20 µl totales (GH20/PCO<sub>4</sub>)</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Concentración Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad µl</b>
Buffer	10x (+20mM MgCl <sub>2</sub> )	1x	2.0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3mM	0.8 µl
dNTP's	2mM	0.2mM	2.0 µl
PCO <sub>4</sub>	50pM/µl	20pM	0.4 µl
GH20	50pM/µl	20pM	0.4 µl
Taq	5U/µl	1U/µl	0.2 µl
DNA	-----	-----	1 µl
H <sub>2</sub> O	-----	-----	13.2 µl
			20 µl Total

Condiciones utilizadas para cada juego de oligonucleótidos, para amplificar gen L1.

<b>Amplificación del gen L1 en 20 µl totales</b>			
<b>(MY09/MY11)</b>		<b>(GP5+/GP6+)</b>	
	<b>Concentración final</b>		<b>Concentración final</b>
Buffer 10x	1x	Buffer 10x	1x
MgCl <sub>2</sub> (1.5 mM)	4mM	MgCl <sub>2</sub> (3.5 mM)	3mM
MY09	20pM	GP5+	20pM
MY11	20pM	GP6+	20pM
dNTP	0.2mM	dNTP	0.2mM
Taq	1U/µl	Taq	1U/µl
H <sub>2</sub> O	-----	H <sub>2</sub> O	-----
DNA	2µl	DNA	2µl
20 µl Total		20 µl Total	

**Anexo VIII. Instrumento de recolección de expresión inmunohistoquímica.**

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
 UNIDAD XOCHIMILCO  
 Maestría en Patología y Medicina Bucal



**Instrumento de recolección de datos de expresión inmunohistoquímica del proyecto:  
 EXPRESIÓN DE P16 EN LESIONES BUCALES ASOCIADAS A VPH EN PACIENTES  
 CON VIH/SIDA.**

ID Biopsia:	Nombre del paciente:		
Diagnóstico histopatológico:	Secuencia tipo viral:		
<b>Porcentaje de expresión de núcleos de células epiteliales teñidas:</b>			
	n/Total	%	
Tercio superficial	_____	_____	
Tercio medio	_____	_____	
Tercio basal	_____	_____	
Expresión Total:			
<b>Intensidad generalizada de la lesión:</b>	+	++	+++
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Intensidad de núcleos epiteliales por estratos:</b>	+	++	+++
Tercio superficial del epitelio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tercio medio del epitelio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tercio basal del epitelio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>