

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO (VPH) EN LA
CAVIDAD ORAL EN PACIENTES VIH/SIDA**

Francisca Sofía Donoso Hofer

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCION FISIOPATOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dra. Sandra Ampuero Llanos

2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

FRANCISCA SOFÍA DONOSO HOFER

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biomédicas con mención en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de junio de 2016

**Prof. Dra. Sandra Ampuero Llanos
Directora de Tesis
Programa de Virología ICBM.
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Francisco Aguayo

Prof. Dra. Ana Verónica Ortega

**Prof. Dra. María José Martínez
Presidenta Comisión**

Este trabajo de investigación está dedicado a todos los pacientes que he tenido la suerte de atender en el Hospital San Juan de Dios ya que son ellos la motivación diaria para seguir creciendo en mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dra. Sandra Ampuero por su valiosa tutela intelectual y humana y por todo el apoyo entregado durante los años que duró este trabajo de investigación. También a los miembros del laboratorio de Virología por su desinteresada ayuda, entrega de conocimientos y paciencia. Espero este sea el primero de muchos proyectos de investigación.

A la Dirección del Departamento de Cirugía Máxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile por entregarme el apoyo necesario durante la realización del magister y además por la contribución en insumos para realizar este proyecto de investigación.

A la jefatura del Servicio de Cirugía Máxilofacial del Hospital San Juan de Dios y a mis compañeros de trabajo por darme el espacio para crecer como cirujano y como académico.

A la comisión informante de tesis por los comentarios constructivos e ideas para mejorar este proyecto de investigación.

A mi familia y a Clara.

INDICE

	Página
Glosario de abreviaturas	7
Índice de figuras	8
Índice de tablas	10
Resumen	12
Abstract	13
Introducción	14
Antecedentes Bibliográficos	
▪ Ciclo replicativo de VPH	16
▪ Oncogénesis mediada por VPH	17
▪ Clasificación de VPH	19
▪ Epidemiología de VPH y la cavidad oral	20
▪ Presentación clínica e histológica de VPH en la cavidad oral	21
▪ Infección por VPH en la cavidad oral	24
▪ Infección por VPH en la cavidad oral en pacientes VIH/SIDA	27
▪ Infección por VPH, pacientes VIH/SIDA y cavidad oral	28
▪ Importancia de la detección de lesiones producidas por VPH y pacientes VIH/SIDA	29
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
Metodología	
▪ Aspectos generales	32
▪ Lugar del estudio	32
▪ Universo y muestra	32
▪ Criterios de inclusión	33

INDICE

Página

▪ Ingreso de pacientes y diagnóstico clínico	33
▪ Genotipificación de VPH	34
▪ Toma de biopsia y estudio histopatológico	35
▪ Detección de RNAm de VPH	36
 Resultados	
▪ Caracterización de la muestra	40
▪ Frecuencia de genotipos de VPH	42
▪ Genotipos de VPH, recuento de linfocitos T CD4 y carga viral de VIH	43
▪ Detección de RNAm E2 y E6/E7 de distintos genotipos de VPH	45
▪ Descripción de factores asociados a genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico	51
 Discusión	 56
 Conclusión	 74
 Anexos	
▪ Anexo 1 Consentimiento informado	75
▪ Anexo 2 Ficha ingreso pacientes	81
▪ Anexo 3 Decreto aprobación trabajo de investigación por Dirección Hospital	82
 Referencias bibliográficas	 87

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

B2M: Beta 2 Microglobulina

° C: Grado Celsius

cel/mm: Célula por milímetro cúbico

copia/ml: Copia (de virus) por mililitro

Ct: Threshold cycle

CV: Carga viral

DNA: Deoxyribonucleic acid (Acido desoxirribonucleico)

DNAc: DNA complementario

E: Earlyprotein

ISP: Instituto de Salud Pública

Kb: kilobases

L: Late protein

LT CD4: Linfocito T CD4

ml: Mililitros

mm: Milímetros

p: Proteína

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pRb: Proteína retinoblastoma

RNAm: Mensajero de ácido ribonucleico

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

µl: microlitro

µg: Microgramo

TARV: Terapia antiretroviral

Tm: Temperatura de melting

VPH: Virus papiloma Humano

VPH-AR: Virus papiloma humano alto riesgo oncogénico

VPH-BR: Virus papiloma humano bajo riesgo oncogénico

VPH-SRO: Virus papiloma humano sin riesgo oncogénico

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1a: Papiloma escamoso en borde lateral de la Lengua en paciente VIH (+).....	24
Figura 1b: Condiloma acuminado en límite paladar blando en paciente VIH (+).....	24
Figura 1c: Verruga oral, queratinizada localizada en cara interna mejilla en paciente VIH (+).....	24
Figura 2a: Lesión papilomatosa en dorso lingual.....	36
Figura 2 b: Losanjo de mucosa lingual de espesor total (Biopsia excisional).....	36
Figura 2 c: Lesión papilomatosa sobre mesa operatoria con hoja bisturí para referencia de tamaño.....	36
Figura 3: Amplificación y curva de melting obtenida para B2M mediante PCR tiempo real en las muestras de lesiones papilomatosas.....	46
Figura 4: Amplificación y curva de melting obtenida para E6/7 de VPH18 mediante PCR tiempo real en muestra positiva para VPH18.....	48
Figura 5: Amplificación y curva de melting obtenida para E2 de VPH 6 mediante PCR tiempo real en muestra positiva para VPH6	49

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 6: Amplificación y curva de melting obtenida para E6/E7 de VPH 6 mediante PCR tiempo real en muestra positiva para VPH 6.....	50
Figura 7: Amplificación y curva de melting obtenida para E2 de VPH 11 mediante PCR tiempo real en muestra positiva para VPH11.....	50
Figura 8: Amplificación y curva de melting obtenida para E6/E7 de VPH 11 mediante PCR tiempo real en muestra positiva para VPH11.....	51

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Secuencias de partidores para los RNAm de los genes E2 yE6/E7 de los genotipos de VPH en estudio.....	38
Tabla 2: Condiciones de amplificación para PCR tiempo real para la detección de los RNAm de los genes E2 yE6/E7 de los genotipos de VPH en estudio.....	39
Tabla 3: Características de los pacientes VIH/SIDA: género y edad.....	40
Tabla 4: Características de las lesiones papilomatosas: localización y tamaño.....	41
Tabla 5: Genotipos de VPH detectados en las lesiones papilomatosas intraorales de pacientes VIH/SIDA.....	43
Tabla 6: Genotipos de VPH, recuento de linfocitos T CD4 y carga viral de VIH.....	44
Tabla 7: Genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico y recuento de linfocitos T CD4.....	45
Tabla 8: Valores umbrales del ciclo (Ct) y temperaturas de melting de productos amplificados (Tm) para B2M en las muestras VPH positivas.....	46
Tabla 9: Genotipificación de VPH, uso de TARV y evolución de VIH.....	.52
Tabla 10: Uso de TARV y evolución de VIH en pacientes con genotipos de alto riesgo oncogénico.....	53
Tabla 11: Genotipos VPH de alto y bajo riesgo oncogénico y consumo de Tabaco y Alcohol.....	54

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 12: Genotipos VPH de alto riesgo oncogénico, orientación sexual y actividad sexual.....	55
Tabla 13: Estudios de genotipificación de VPH en pacientes VIH (+).....	64

RESUMEN

Introducción: Pacientes VIH(+) presentan mayor riesgo de infecciones orales con genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico (VPH-AR). No hay publicaciones en nuestro país en relación a los genotipos de VPH en las lesiones papilomatosas intraorales de los pacientes VIH/SIDA ni la caracterización de factores epidemiológicos y moleculares asociados a los genotipos. **Objetivo:** Determinar genotipos de VPH-AR en lesiones papilomatosas orales de pacientes VIH/SIDA, detectar los RNAm virales E2 y E6/E7, caracterizar clínicamente las lesiones, determinar el diagnóstico histopatológico y describir factores asociados como recuento de linfocitos T CD4, carga viral de VIH, tiempo de evolución de la enfermedad y de uso de TARV, consumo de alcohol, de tabaco y conducta sexual. **Metodología:** Se estudiaron 8 pacientes adultos VIH/SIDA con diagnóstico histopatológico y molecular VPH (+). Se tomó una muestra con cepillo citológico en las lesiones papilomatosas. A partir del DNA extraído se realizó detección del genoma viral mediante PCR convencional y la genotipificación mediante Macroarray. A partir de tacos de las biopsias excisionales de las lesiones se extrajo RNA para detectar RNAm de E2 y E6/E7 de los genotipos VPH 6,11,16,18,52 y 56 mediante RT-PCR en tiempo real. Se consignaron factores asociados.

Resultados: Se estudiaron 8 pacientes (7 hombres y 1 mujer) con edad promedio de 43,75 años. Histopatológicamente todas las lesiones correspondieron a papiloma escamoso, localizándose preferentemente en la cara interna de la mejilla (38%). Un 63 % de los pacientes presentó más de un genotipo de VPH y un 75% presentó por lo menos un genotipo de VPH-AR. El genotipo de alto riesgo oncogénico más frecuente fue VPH 52 (27%), seguido de VPH 16 y 56 (18%). El recuento promedio de linfocitos T CD4 de los pacientes que presentaron al menos algún VPH-AR fue de 330.6 cel/mm³ con carga viral de VIH indetectable. Se detectó la expresión de RNAm para E6/E7 en VPH 18, VPH 6 y VPH 11 y el RNAm de E2 en VPH 6 y VPH 11.

Conclusiones: Las lesiones papilomatosas de pacientes VIH/SIDA correspondieron a papiloma escamoso. Se detectó mayor frecuencia de infecciones múltiples por VPH incluyendo por lo menos un genotipo de VPH-AR. VPH 52 es el genotipo de alto riesgo oncogénico más frecuente, seguido de VPH 16 y VPH 56. VPH 52 se presentó como infección única, sin otros VPH-AR. El recuento promedio de linfocitos T CD4 de aquellos pacientes que presentaron al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico indica una inmunosupresión moderada. . La detección de los RNAm de E2 y E6/E7 sólo en VPH 6 y VPH 11, genotipos de bajo riesgo, indica un estado replicativo activo de estos genotipos en las lesiones papilomatosas. Sólo en un genotipo de alto riesgo (VPH18) se detectó el RNAm de E6/E7 pero no de E2. Se requiere de un mayor número de pacientes para corroborar estos antecedentes preliminares y establecer asociaciones con los otros factores estudiados.

ABSTRACT

Introduction: HIV (+) patients have an increased risk of oral infections with high oncogenic risk HPV genotypes. To date there are no publications in our country regarding HPV genotypes in oral papillomatous lesions of HIV / AIDS patients or epidemiological and molecular factors associated with HPV genotypes.

Aim: To determine high oncogenic risk HPV genotypes in oral papillomatous lesions of HIV / AIDS patients, to detect viral mRNA E2 and E6 / E7, to characterize clinical lesions features, to determine histopathological diagnosis and describe associated factors such as T CD4 Lymphocyte count, HIV viral load, disease progression time, antiretroviral therapy using time, alcohol and tobacco habits and sexual behavior.

Methodology: 8 HIV / AIDS adults patients were studied with histopathological and molecular HPV (+) diagnosis. The papillomatous lesions were subjected to sampling with cytological brush. DNA was extracted and viral genome detection was performed using standard PCR and genotyping by macroarray. RNA was extracted of lesions excisional biopsies to detect HPV mRNA E2 and E6 / E7 of genotypes 6, 11, 16, 18, 52 and 56 by real time RT-PCR. Associated factors were registered.

Results: 8 patients (7 males and 1 female) were studied with an average age of 43.75 years. Histopathologically all the lesions were squamous papilloma, most of them located on the buccal mucosa (inner cheek) (38%). 63% of patients had more than one genotype of HPV and 75% had at least one high oncogenic risk HPV genotype. High oncogenic risk HPV 52 genotype was the most common (27%), followed by HPV 16 and 56 (18%). The average CD4 T lymphocytes count of patients who had at least some high oncogenic risk HPV genotype was 330.6 cel / mm³ with undetectable HIV viral load. mRNA expression was observed for E6 / E7 HPV 18, HPV 6 and HPV 11 and E2 in HPV 11 and HPV 6.

Conclusions: The HIV/AIDS patients papillomatous lesions were squamous papilloma. Multiple HPV genotype infections were detected including least one high oncogenic risk HPV genotype. High oncogenic risk HPV 52 was the most frequent followed by HPV 16 and HPV 56. HPV 52 and was presented as a unique infection, without other high risk HPV genotype. The average CD4 T lymphocytes count of patients who had at least one high oncogenic risk HPV genotypes was 330.6 cells / mm³. Transcriptional m RNA activity of E2 and E6/E7 was detected in HPV 11, HPV 6, both low-risk genotypes indicating a replicative state of these genotypes in papillomatous lesions. Only in HPV18 high risk genotype transcriptional mRNA activity of E6/E7 was detected. Increase the numbers of patients is necessary to confirm these preliminary results and to establish a correlation among the risk factors studied.

INTRODUCCION

El virus papiloma humano (VPH) presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas afectando estructuras cutáneas y mucosas del cuerpo. La infección por VPH se manifiesta clínicamente en distintas zonas anatómicas entre las que se incluyen el tracto anogenital, uretra, piel, laringe, mucosa traqueobronquial, cavidad nasal, senos paranasales y cavidad oral (Chang F, 1991) (Campisi G, 2007).

En la mucosa oral, la infección clínica por VPH puede presentarse de distintas formas, en donde su aspecto varía desde lesiones de tipo benignas con características hiperplásicas, papilomatosas o verrucosas hasta lesiones de aspecto carcinomatoso (Kumaraswamy KL, 2011). En la década de los 70s, el Dr. zur Hausen planteó la relación etiológica entre VPH y cáncer cérvico uterino (Zur Hausen et al, 1974) y posteriormente, en 1983 se publicó la primera evidencia de que este virus podría estar involucrado en la etiología del carcinoma escamoso oral (Syrjänen KJ et al, 1983). En los últimos años, incluso, el VPH es considerado un nuevo factor de riesgo para el desarrollo de cáncer oral junto con el consumo de tabaco y alcohol (Krüger et al, 2014) (Ajila et al, 2015).

A pesar del hecho bien establecido de que la mayoría (> 99, 5%) de los carcinomas cérvico uterino son atribuibles a la infección por VPH (Zur Hausen H, 2002) (Syrjänen KJ et al, 2011) y que muchos estudios de casos – controles y meta análisis han confirmado a VPH como un factor etiológico independiente para cáncero faríngeo (Syrjänen KJ et al, 1983) (Miller C & Johnstone B, 2001) (Kreimer AR, 2005), el rol específico de VPH en el desarrollo de carcinoma escamoso en la cavidad oral es un tema que se debate en la literatura actual.

Por otro lado, se conoce que pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida(VIH/SIDA) presentan un mayor riesgo de desarrollar carcinoma escamoso oral o genital (Syrjänen S, 2011) así como también, de presentar un aumento en el riesgo de infecciones genitales y anales con genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico. (Rautava J & Syrjänen S, 2011).

Las particularidades epidemiológicas de cada población, así como también, la falta de un completo entendimiento de la historia natural de la infección hacen que la investigación en VPH en el territorio buco máxilofacial sea de gran interés para la comunidad científica. A la fecha no existen publicaciones en nuestro país en relación a los genotipos de VPH presentes en las lesiones papilomatosas intraorales de los pacientes VIH/SIDA y tampoco una caracterización de los factores epidemiológicos y moleculares asociados a los genotipos de alto riesgo oncogénico detectados en ese tipo de lesiones.

Disponer de información actualizada en relación a este tema es fundamental para realizar maniobras de prevención, diagnóstico precoz y tratamiento de lesiones potencialmente oncogénicas en una población vulnerable.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. CICLO REPLICATIVO DEVPH:

VPH es miembro de la familia *Papillomaviridae*, virus epiteliotrópicos con genoma DNA doble hebra circular de aproximadamente 8 Kb. (McLaughlin-Drubin et al, 2012). En su genoma están contenidos 8 marcos de lectura abierta (ORFs por sus siglas en inglés), los que codifican para seis proteínas tempranas (E, early proteins) y dos proteínas tardías (L, late proteins) (Rautava J & Syrjänen S, 2011) (McLaughlin-Drubin et al, 2012).

Su ciclo replicativo depende exclusivamente de la célula a la que infecta, el queratinocito, en donde la expresión y replicación del virus está regulada temporal y espacialmente por el proceso de diferenciación que sufre la célula blanco.

La infección inicial requiere que las partículas virales ingresen a las células de la membrana basal, a través de la ruptura del epitelio estratificado. Una vez en el interior de la célula, el genoma viral es transportado al núcleo por mecanismos asociados a la interacción con L2 (Scheffer K et al, 2014) (SappM & Bienkowska-Haba M, 2009). En el núcleo, el genoma viral permanece en estado episomal comenzando la expresión de los genes tempranos, E1 y E2. Esto permite la amplificación del genoma viral generando un número bajo de copias episomales en el estrato basal (Doorbar J, 2005).

Cuando las células basales entran en el proceso de diferenciación a queratinocito, migran a estratos celulares superiores, donde se activan los genes virales tempranos E6 y E7, cuyas proteínas modulan y controlan la entrada de la célula a la fase S del ciclo celular. Esto induce la proliferación celular y favorece la replicación viral (Doorbar J et al, 2012).

Posteriormente y a medida que la célula continua avanzando hacia los estratos superiores, se perpetúa la amplificación del genoma viral. En el estrato suprabasal se activa el promotor tardío para inducir la expresión de los genes virales L1 y L2 permitiendo la formación de la cápside viral (Doorbar J, 2005). El virus se libera junto con las células descamadas del epitelio y tiene la capacidad de infectar otros sitios anatómicos del mismo hospedero o a otro individuo, perpetuándose el ciclo de vida viral.

2. ONCOGÉNESIS MEDIADA POR VPH:

Las proteínas tempranas E6 y E7, también conocidas como oncoproteínas virales, son capaces de modificar el ciclo celular a través de la interacción con distintas proteínas celulares para mantener la capacidad de replicación viral en el largo plazo (Bodily J & Laimins L, 2011). Producen la entrada a la fase S del ciclo celular, favoreciendo la división celular en una célula diferenciada como el queratinocito con el propósito de permitir la replicación del genoma viral.

En epitelio no infectado, las células basales no activan el ciclo celular luego de migrar hacia los estratos suprabasales sino que, inician un proceso de diferenciación terminal. Durante la infección de VPH, E7 y E6 se expresan en estas células y fuerzan el ingreso al ciclo celular produciéndose un retraso en la diferenciación celular, sobretodo en aquellos genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico (Doorbar J, 2005).

La proteína blanco fundamental de E7 es pRb (proteína del retinoblastoma) cuya función es suprimir el desarrollo de tumores siendo uno de los principales reguladores del ciclo celular. Cuando E7 se une a pRb, esta última libera el factor de transcripción E2F activando genes que permiten la entrada a la fase S del ciclo celular del queratinocito infectado, con lo que se inicia la replicación del DNA celular y favorece la replicación del DNA viral. Así se produce la amplificación del genoma viral. (Doorbar J, 2005) (Häfner N et al, 2008).

Por otro lado, la proteína viral E6 tiene la capacidad de afectar el funcionamiento de la proteína p53 que, al igual que pRb, es una proteína supresora de tumores. Dentro de sus funciones fundamentales se encuentra la activación de mecanismos de reparación del DNA dañado y activación de la apoptosis en situaciones específicas. La degradación de p53, mediada por la interacción con E6, inhibe la apoptosis de la célula infectada, la cual continúa en activa replicación permitiendo a su vez que el genoma viral se amplifique. (Häfner N et al, 2008).

La acción conjunta de E6 y E7 produce un efecto sinérgico en la activación del ciclo celular, pero también en la pérdida de los mecanismos fisiológicos con que la célula cuenta para prevenir fenómenos tumorales. A pesar de este hecho, no todos los pacientes infectados por VPH desarrollan carcinomas, ya que es fundamental entender que el objetivo del virus no es alterar los mecanismos de protección celular antitumoral para generar procesos oncogénicos, sino que es replicar su genoma en células diferenciadas como el queratinocito para finalmente producir partículas virales y continuar el ciclo infeccioso, ciclo productivo. (Häfner N et al, 2008) (Olthoff N et al, 2014).

Sin embargo, existen eventos que pueden alterar el ciclo replicativo productivo de VPH. Se postula, que uno de los eventos que podría desencadenar la proliferación celular desmedida sería la integración del DNA viral en el genoma del hospedero induciendo la desregulación en la expresión de E6 y E7. La proteína viral temprana E2, regula la expresión de los genes tempranos incluyendo los oncogenes E6 y E7. Al integrarse el genoma viral, uno de los principales genes que se interrumpe es E2. La pérdida de la función de esta proteína está asociada a la expresión constitutiva de los oncogenes virales (Peitsaro P et al, 2002) (De marco L et al, 2007) (Häfner N et al, 2008).

El fenómeno de integración del DNA viral en el genoma del hospedero, es frecuentemente observado en carcinomas cérvico uterino invasivos y es uno de los factores que determinan la progresión. En otro tipo de cánceres no se ha logrado determinar esta asociación. (Olthof N et al, 2014).

3. CLASIFICACION DE VPH:

Se han reconocido y secuenciado más de 170 genotipos de VPH, clasificándose según su secuencia genómica, nicho biológico, potencial oncogénico, localización en los distintos tejidos, entre otros. (Molijn A et al, 2005) (Silva R et al, 2013) (Syrjänen S, 2011) (DeVilliers EM, 2013) (Doorbar J et al, 2012).

En el contexto de este trabajo de investigación, resulta de interés la clasificación de acuerdo a su riesgo oncogénico, en donde VPH de tipo mucoso presente principalmente en lesiones pre cancerosas y cancerosas se han denominado de **alto riesgo oncogénico** (Muñoz N et al, 2003) (Doorbar J et al, 2012) (Rautava J & Syrjänen S, 2012), mientras que VPH de tipo mucoso presente en lesiones papilomatosas genitales y en otras lesiones no malignas se denominan de **bajo riesgo oncogénico** (Rautava J & Syrjänen S, 2012)

La Organización Mundial para la Salud (OMS) ha definido 12 genotipos de alto riesgo oncogénico: **16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59**, mientras que otros autores han agregado a esta lista los genotipos **34, 66, 68, 70 y 73** (Doorbar J et al, 2012) (Rautava J & Syrjänen S, 2012) (Muñoz et al, 2003). En las lesiones de bajo riesgo oncogénico, los genotipos más prevalente detectados son VPH 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 81 y 70, entre otros (Rautava J & Syrjänen S, 2012) (Muñoz et al, 2003).

Al año 2011, tanto en **lesiones orales** benignas como malignas, se han detectado 24 tipos de VPH: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 69, 72, y 73 (Syrjänen S , 2003) (Kreimer AR, 2005) (Syrjänen S et al, 2011).

La persistencia de VPH de alto riesgo por largos periodos de tiempo es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer. (Bodily & Laimins, 2011). Por lo tanto, las infecciones persistentes de los genotipos de alto riesgo aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer mientras que, los de bajo riesgo pueden asociarse con lesiones benignas autolimitadas (Syrjänen S et al, 2011). Los genotipos de VPH de bajo riesgo son por lo general responsables de lesiones mucosas benignas como las verrugas orales, condilomas, hiperplasia epitelial focal y papilomas orales. (Rautava J & Syrjänen S, 2011).

4. EPIDEMIOLOGÍA DE VPH EN LA CAVIDAD ORAL:

El ciclo replicativo de VPH en epitelio pluriestratificado ha impedido la implementación de un diagnóstico clínico basado en aislamiento viral, por lo cual, el diagnóstico etiológico de la infección está dirigido principalmente a la detección del genoma viral. La prevalencia de la infección por VPH en la cavidad oral ha sido estudiada a través de técnicas moleculares como *Polymerase chain reaction* (PCR) y genotipificación en muestras obtenidas a través de colutorios o enjuagues de la cavidad oral como de muestras directas desde las lesiones clínicas.

En el estudio de Gillison (Gillison ML et al, 2012) se evaluaron las muestras de enjuagues de la cavidad oral en una población de 5.579 pacientes de Estados Unidos, detectándose el genoma de VPH en un 6.9% de los pacientes. Se detectaron genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico en infecciones únicas, así como infecciones con múltiples genotipos. Se encontró una prevalencia mayor en hombres que en mujeres. La infección por VPH 16 fue la más común (1%).

Hallazgos similares fueron reportados en un estudio finlandés que se centró en 131 familias, 791 pacientes, a las cuales les tomaban muestras directas de la mucosa oral y luego las analizaban a través de PCR y genotipificación en distintos periodos de tiempo durante 7 años (Kero K et al, 2012). Los hallazgos más relevantes del estudio mencionaban una prevalencia de VPH en la cavidad oral que fluctuaba entre 15,1% y 30,1% durante el periodo de estudio, las mujeres presentaban mayor frecuencia de genotipos de bajo riesgo oncogénico que los hombres, y la infección más frecuente, como en otros estudios reportados, era por VPH 16.

Estos tipos de muestras para detectar VPH como colutorios o muestras directas de la cavidad oral sin presencia de lesión, solamente permiten detectar infecciones subclínicas. La detección de genotipos de alto riesgo en colutorios solo indica que la infección está presente y no entrega información sobre la localización de la infección o el tipo de mucosa infectada (Pringle GA, 2014). A la fecha, no existen estudios de grandes poblaciones de genotipificación en lesiones clínicas provocadas por VPH.

5. PRESENTACIÓN CLÍNICA E HISTOLÓGICA DE VPH INTRAORAL:

Las características clínicas y microscópicas de las lesiones mucosas inducidas por VPH varían dependiendo del sitio anatómico infectado y del genotipo viral. Las lesiones clínicamente pueden ser exofíticas, planas, papilomatosas, verruciformes o incluso endofíticas y otras más difíciles de diagnosticar clínicamente (Kumaraswamy KL, 2011). Desde el punto de vista histopatológico, las lesiones clínicas pueden ser benignas o con grados variables de displasia. Microscópicamente, en los estratos superficiales pueden observarse los coilocitos, que son células con un pequeño núcleo condensado y con un espacio peri nuclear (Pringle GA, 2014).

En la literatura, se ha reportado presencia de VPH en lesiones como Papiloma escamoso, Verruga vulgar (verruca vulgaris), condiloma acuminado, hiperplasia epitelial focal, leucoplasia pilosa, hiperplasia papilar, liquen plano y carcinoma verrucoso (Chang F, 1991). De las lesiones anteriores, se ha demostrado una presencia significativa de VPH en papiloma escamoso, el condiloma acuminado, la verruga vulgar y la hiperplasia epitelial focal. (Syrjänen S, 2003)

Dentro de las manifestaciones orales provocadas por VPH, son de particular interés para este trabajo de investigación debido a su frecuencia, las siguientes lesiones orales provocadas por VPH:

Papiloma de células escamosas:Corresponde a un crecimiento del epitelio escamoso que puede ser exofítico, sesil o pedunculado, con proyecciones papilares. La lesión puede ser rosada o blanca dependiendo del grado de queratinización (**Figura 1a**) (Pringle GA, 2014) (Syrjänen S, 2003).

Debido a su amplio espectro de presentaciones clínicas, es muy difícil de distinguir del condiloma o verruga vulgar, desde el punto de vista clínico como histopatológico. Se presume que es producido por genotipos de VPH de bajo riesgo oncogénico, y los genotipos VPH 6 y VPH 11 han sido detectados en aproximadamente un 50% de las lesiones (Pringle GA, 2014).

Condiloma acuminado: También se le conoce como verruga venérea y es considerado como una enfermedad de transmisión sexual que afecta la piel y las membranas mucosas del tracto ano genital, sin embargo, también pueden aparecer en la cavidad oral. Generalmente se presenta como múltiples nódulos pequeños de color blanco o rosado, que proliferan y coalescen. La superficie es más irregular que en los papilomas orales(Kumaraswamy KL, 2011), pudiendo ser sésiles o pedunculadas, con proyecciones papilares (**Figura 1b**). En los cortes histológicos pueden observarse coilocitos (Pringle GA, 2014).

La mayoría de estos condilomas son causados por VPH 6 y VPH 11, sin embargo, también se ha descrito la presencia de VPH 16 y VPH 18. Son más frecuentes en adolescentes y adultos jóvenes, pero su presencia no se limita exclusivamente a esta edad (Pringle GA, 2014).

Verruga oral: Corresponde a la lesión más prevalente provocada por VPH en la piel, pero también se encuentra en la mucosa oral. Su localización más frecuente son las áreas mucosas en donde la queratinización del epitelio se asemeja a la de la piel, como por ejemplo, piel, paladar duro y encía (Syrjänen S, 2003).

Se debe hacer énfasis en que el diagnóstico de verruga oral debe reservarse para aquellas lesiones que muestran características histológicas de la verruga vulgar de la piel (Syrjänen S, 2003). Clínicamente aparecen como lesiones exofíticas firmes, blanquecinas, de límites definidos, sesiles, que muchas veces muestran queratinización de su superficie(**Figura 1c**)(Kumaraswamy KL, 2011).

Estas características son bastante similares al papiloma oral y al condiloma acuminado. Por esta razón, para confirmar el diagnóstico, genotipos cutáneos de VPH deben identificarse en verrugas orales, en donde los más frecuentes son VPH 2 y VPH 4 (Syrjänen S, 2003). Con respecto a la histopatología, típicamente puede observarse una capa granular importante, así como también coilocitos (Pringle GA, 2014).

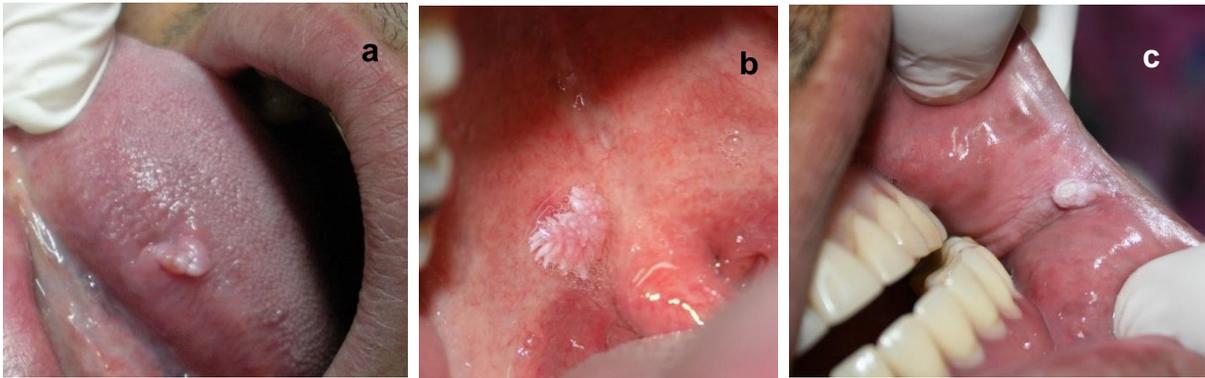


Figura 1: (a) Papiloma escamoso en borde lateral de la lengua en paciente VIH (+). (b) Condiloma acuminado en limite paladar blando en paciente VIH (+). (c) Verruga oral, queratinizada localizada en cara interna mejilla en paciente VIH (+).

6. VPH Y CÁNCER ORAL:

El rol específico de VPH en el desarrollo de carcinoma escamoso oral y también de lesiones premalignas es aún un tema que se debate en la literatura actual, a pesar de la asociación etiológica indiscutible entre carcinoma cérvico uterino y VPH (Zur Hausen HI, 2002) (Syrjänen S et al, 2011).

Muchos estudios de casos – controles y meta análisis han confirmado la infección de VPH como un factor etiológico independiente para cáncer oral y orofaríngeo (Syrjänen KJ et al, 1983) (Miller C& Johnstone B, 2001) (Kreimer AR, 2005). La prevalencia total de VPH en cáncer oral se ha estimado en 16% en Europa y Norte América y de 33% en Asia.

En cáncer orofaríngeo las tasas son mayores, con un 28% en Europa, 47% en Norteamérica y 46% en Asia debido a la alta tasa de detección de VPH en el cáncer tonsilar, muy prevalente en esa región (Kreimer AR, 2005).

La presencia de VPH 16 está asociada a la rápida incidencia de cáncer orofaríngeo en algunas partes del mundo, de manera más importante en Estados Unidos, Suecia y Australia, donde es responsable de más del 50% de los casos. (Kreimer AR et al, 2013).

Debido a estos hallazgos recientemente se ha incluido a VPH como un factor de riesgo para desarrollar cáncer oral junto a los factores de riesgo clásicos como fumar tabaco y consumir alcohol (Krüger M et al, 2014) (Ajila V et al 2015).

En la mucosa oral, se postula que las infecciones persistentes de los genotipos de alto riesgo aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer mientras que, los de bajo riesgo pueden asociarse con lesiones benignas de la mucosa como las verrugas orales, condilomas, hiperplasia epitelial focal y papilomas orales. (Rautava J & Syrjänen S, 2011)

Actualmente, la mayoría de los estudios multicéntricos describen tasas de prevalencia de VPH para carcinomas de todo el territorio de cabeza y cuello que van desde el 32% al 84% (Lassen P et al, 2009) (Attner P et al, 2010) (Rautava J & Syrjänen S, 2011) y solamente del 5,9% exclusivamente para aquellos localizados en la cavidad oral (Lingen M et al, 2013).

Los tumores VPH (+) localizados en cabeza y cuello, incluyendo cavidad oral, tendrían una mejor respuesta a la terapia actual: radioterapia, cirugía con o sin radioterapia y radioterapia combinada con quimioterapia (Ang K & Sturgis E, 2012).

No obstante, lo anterior, la identificación de ADN de VPH en un tumor no provee suficiente evidencia para afirmar que la presencia de virus pudo haber generado la neoplasia, ya que la técnica no permite diferenciar una infección viral transitoria de una oncogénicamente activa (Ndiaye C et al, 2014).

La identificación de transcripción de los oncogenes virales E6/E7, que están implicados en el proceso oncogénico, se acepta como la prueba que permite elucidar el rol oncogénico de VPH en un tumor (Ndiaye C et al, 2014).

La presencia de RNAm de E6/E7 ya sea detectando a su proteína o detección y cuantificación a través del DNA viral son biomarcadores utilizados para evaluar progresión y gravedad de lesiones oncológicas provocadas por VPH en la región cervicouterina, cabeza y cuello, ano, entre otros sitios anatómicos (Barón C et al, 2015) (Combes JD & Franceschi S, 2013) (Silling S et al 2012) (Ndiaye C et al, 2014).

En una revisión sistemática y meta análisis publicada recientemente (Ndiaye C et al, 2014) se encontró que un 89,9% del cáncer oro faríngeo VPH (+) existía presencia de RNAm E6/E7, mientras que en una revisión realizada por Combes & Franceschi (Combes JD & Franceschi S, 2013), se determinó que el porcentaje de detección (sin cuantificación) de RNAm en cánceres de cavidad oral era de 1,4% (muestra de 142 pacientes).

Los hallazgos clínicos, epidemiológicos y moleculares anteriormente expuestos podrían explicar porque la persistencia de la infección por VPH resulta un factor clave para la transformación celular inducida por este virus (Rautava J & Syrjänen S, 2012) (Ndiaye C et al, 2014).

7. INFECCIÓN POR VPH EN CAVIDAD ORAL DE PACIENTES VIH/SIDA:

Desde la introducción de la terapia antiretroviral (TARV) en pacientes VIH(+), se ha visto un aumento en la frecuencia de lesiones papilomatosas (Patton LL, 2000) (Greenspan D, 2001) (Syrjänen S, 2011) (Beachler D et al, 2013). Tanto hombres como mujeres VIH (+) presentan un aumento en el riesgo de desarrollar infecciones genitales y anales por la infección con genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, de generar infecciones persistentes y lesiones precancerosas (Rautava J & Syrjänen S, 2011).

En cavidad oral de individuos VIH (+) se ha determinado una prevalencia entre un 7% – 45% de VPH, incluyendo todos los genotipos y específicamente de 12 a 26% si se considera solo los genotipos de alto riesgo oncogénico. Esta prevalencia se ha determinado con muestras de colutorio y cepillado de la cavidad oral, lo que no necesariamente implica un desarrollo de lesiones. (Beachler D & D' Souza G, 2013) (Anaya-Saavedra G et al, 2013)

Clínicamente las lesiones en estos pacientes presentan una morfología atípica en donde se detectan además, múltiples genotipos de VPH, los cuales son por lo general genotipos de alto riesgo oncogénico que se reportan con poca frecuencia en otras poblaciones (Syrjänen S, 2003) (Syrjänen S. , 2011).

En relación a los factores que contribuyen con la persistencia de la infección por VPH, la literatura publicada describe: mayor edad (sobre 55 años), consumo de tabaco y ser de género masculino (Beachler D et al, 2015) (Fatahzadeh M et al, 2013), siendo el factor de riesgo más importante para la infección por VPH en pacientes VIH/SIDA el recuento disminuido de Linfocitos T CD4+ (Beachler D et al, 2015)(Beachler D & D' Souza G, 2013) especialmente recuentos menores a 200 células/mm³ (Fatahzadeh M et al, 2013).

También se ha observado asociaciones significativas entre presencia de VPH y aumento en la carga viral de VIH, historia de otras enfermedades de transmisión sexual, número de parejas sexuales y prácticas de sexo oral (Beachler D et al, 2014) (Fatahzadeh M et al, 2013).

En la actualidad, y debido principalmente a la falta de estudios de cohorte a largo plazo y a que la mayoría de los estudios epidemiológicos evalúan la cavidad oral a través de colutorios y muestras de saliva y no a lesiones evaluables con el examen clínico, es que la incidencia precisa de las lesiones orales provocadas por VPH en pacientes con VIH/SIDA, su persistencia en el tiempo y factores que podrían determinar la aparición clínica de lesiones, se desconoce. (Patton LL, 2013).

8. INFECCIÓN POR VPH, PACIENTES VIH/SIDA Y CANCER ORAL :

Datos epidemiológicos reportados apoyan el hecho de que tanto hombres como mujeres VIH (+) presentan un mayor riesgo de presentar carcinoma escamoso oral o genital (Syrjänen S, 2011). La incidencia de neoplasias, como el cáncer de cabeza y cuello, neoplasias no definitivas de SIDA, ha aumentado progresivamente con la introducción de TARV y actualmente, la incidencia acumulativa al compararlo con individuos VIH (-) es de 0,8% (Silverberg MJ et al, 2015).

Los factores de riesgo más importantes descritos para este fenómeno son la edad avanzada de los pacientes y la cantidad de tiempo que han estado infectados por VIH. Factores de riesgo adicionales incluyen el hábito tabáquico y la exposición a virus oncogénicos como el VPH, mientras que el bajo recuento de linfocitos T CD4+ y el uso de TARV se encuentran en constante investigación (Rubinstein P et al, 2014)

9. IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DE LESIONES PRODUCIDAS POR VPH EN PACIENTES VIH/SIDA:

En la práctica clínica diaria, muchas de las lesiones originadas por VPH solamente se biopsian y no existe en los servicios de Cirugía máxilofacial tanto de Hospitales como de Clínicas de nuestro país, protocolos en relación al estudio diagnóstico que permita identificar las lesiones VPH (+) y los genotipos presentes en las lesiones papilomatosas introrales. Es muy importante también destacar, que la detección de la infección de VPH se hace mediante la detección del genoma, por lo cuál sólo se establece la presencia del genoma pero no el estado replicativo del virus o la actividad transcripcional viral.

Tanto en neoplasias cérvico uterinas, anales como de cabeza y cuello se ha determinado la presencia de RNAm de E6/E7 (Combes JD & Franceschi S, 2013) (Silling S et al, 2011) (Ndiaye C et al, 2015) estableciéndose este biomarcador como relevante al momento de evaluar actividad oncogénica.

En una revisión sistemática y meta análisis se evaluó la detección de RNAm de E6/E7 en cáncer de cabeza y cuello de todos los genotipos reportados en la literatura entre 2004 y 2012, en donde el porcentaje de detección en carcinoma escamoso de la cavidad oral fue de 16.3% mientras que, para la orofarínge fue de 39.8% (Ndiaye C et al, 2015). La literatura en relación a la evaluación de RNAm de E6/E7 en lesiones papilomatosas intraorales de pacientes VIH (+) es escasa.

En un estudio realizado por Stoddard et al en 2015, se estudió la actividad transcripcional de los oncogenes de VPH E6/E7 en lesiones denominadas papilomas invertidos a través de hibridación *in situ* en un estudio retrospectivo de muestras parafinadas (Stoddard D et al, 2015).

Se seleccionaron 19 muestras parafinadas en el donde RNAm E6/E7 para VPH fue detectado en todas las muestras estudiadas. Los genotipos de VPH estudiados fueron VPH 16, 18 y 33. No existen estudios similares realizados en lesiones papilomaosas intraorales.

Determinar los genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico así como también biomarcadores de actividad oncogénica y factores de riesgo asociados en una población vulnerable como los pacientes inmunosuprimidos por VIH, permite realizar maniobras preventivas como por ejemplo aumentar la frecuencia de controles médicos, incentivar el auto examen de la cavidad oral y disminuir el consumo de tabaco.

Considerando estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue determinar genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en lesiones papilomatosas orales de pacientes VIH/SIDA, detectar los RNAm de E2 y E6/E7, caracterizar clínicamente las lesiones, determinar diagnóstico histopatológico y describir factores asociados como recuento de linfocitos T CD4, carga viral de VIH, tiempo de evolución de la enfermedad, tiempo de uso de TARV, consumo de alcohol y tabaco y conducta sexual.

OBJETIVOS:

I. OBJETIVO GENERAL:

Determinar genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en lesiones papilomatosas orales de pacientes VIH/SIDA, detectar los RNAm de E2 y E6/E7, caracterizar clínicamente las lesiones, determinar diagnóstico histológico de la lesión y describir factores asociados como recuento de linfocitos T CD4, carga viral de VIH, tiempo de evolución de la enfermedad, tiempo de uso de TARV, consumo de alcohol y tabaco y conducta sexual.

II. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- a) Caracterizar epidemiológica, clínica e histopatológicamente a la muestra en estudio.
- b) Determinar la frecuencia de los genotipos de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico presentes en lesiones papilomatosas orales en pacientes VIH/SIDA.
- c) Relacionar el recuento de linfocitos T CD4 y carga viral en aquellas muestras de VPH de alto riesgo oncogénico.
- d) Detectar los RNAm E2 y E6/ E7 en muestras de lesiones papilomatosas orales de pacientes VIH/SIDA que presentaron algunos de los 4 genotipos VPH de alto riesgo oncogénico más frecuentes y VPH 6 y 11..
- e) Describir factores asociados como tiempo de evolución de la enfermedad, tiempo de uso de TARV, consumo de alcohol y tabaco y conducta sexual para aquellos genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico

METODOLOGÍA

ASPECTOS GENERALES: Se efectuó un estudio observacional descriptivo de corte transversal para determinar la frecuencia de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico presentes en lesiones papilomatosas intraorales en pacientes VIH/SIDA en tratamiento en el Hospital San Juan de Dios, la actividad transcripcional de E2 y E6/E7 de VPH y factores de riesgo asociados como recuento de linfocitos TCD4, carga viral, consumo de tabaco, consumo de alcohol y hábitos sexuales.

LUGAR DEL ESTUDIO: Servicio de Cirugía Máxilofacial y Laboratorio de Biología Molecular del Hospital San Juan de Dios en conjunto con el Programa de Virología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

UNIVERSO Y MUESTRA: El universo estuvo conformado por todos aquellos pacientes adultos con diagnóstico de VIH/SIDA en tratamiento en el servicio de infectología del Hospital San Juan de Dios que a la fecha corresponden a 2.000 pacientes en tratamiento activo. La muestra se conformó por todos aquellos pacientes derivados hacia el Servicio de Cirugía Maxilofacial del mismo hospital por presentar lesiones intra orales clínica e histológicamente compatibles con Papiloma oral, Condiloma acuminado intraoral y verruga oral con genotipificación (+) para VPH y que cumplieran todos los criterios de inclusión. Inicialmente se ingresaron 12 muestras de las cuales solo 8 resultaron con un diagnóstico molecular positivo para VPH. Así, la muestra final incluida quedó conformada por 8 pacientes.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN: Fueron incluidos en el estudio aquellos pacientes adultos (≥ 18 años de edad) con diagnóstico de VIH/SIDA notificado al ISP, de género masculino y femenino en tratamiento en el Servicio de infectología del Hospital San Juan de Dios con lesiones clínica e histológicamente compatibles con papiloma oral, condiloma acuminado oral y verruga oral que se encontraran dentro de la cavidad oral, cuyo análisis molecular indicó VPH (+).

Los pacientes accedieron a participar en el estudio a través de la firma del consentimiento informado (Anexo 1).

INGRESO DE PACIENTES Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO: Los pacientes VIH (+) derivados del servicio de infectología por presentar lesiones intraorales papilomatosas fueron ingresados al servicio de Cirugía Máxilofacial siguiendo el conducto regular de atención del Hospital San Juan de Dios. Se realizó la ficha de ingreso común a todos los pacientes y posteriormente se realizó el examen físico intraoral para el diagnóstico clínico de la lesión papilomatosa. Durante el ingreso del paciente se consignaron datos como género, edad, hábito tabáquico, hábito alcohólico, conducta sexual y los valores recientes de recuento de Linfocitos TCD4 y carga viral de VIH, los cuales fueron traspasados a la ficha de estudio de cada paciente (Anexo 2).

Los pacientes debían contar con un examen de Linfocitos TCD4 y carga viral de VIH en una fecha cercana al momento de ingreso al estudio. Ambos exámenes se realizan en el Hospital San Juan de Dios como parte del tratamiento que reciben estos pacientes en el servicio de infectología del mismo hospital. La carga viral de VIH se determina a través de un kit Real Time HIV-1 Amplification Reagent (IVD, Abbott), metodología totalmente automatizada desde la extracción hasta la cuantificación de la carga viral. El recuento de subpoblaciones linfocitarias (recuento de linfocitos TCD4) se realiza por Citometría de flujo, con un método también validado para diagnóstico

Para el diagnóstico de la lesión producida por VPH se consideraron las siguientes características clínicas:

Aumento de volumen localizado dentro de la cavidad oral, asintomática, superficie irregular con proyecciones digitiformes que se semejan a la superficie de una coliflor, de color blanco o rosado, de base sésil o pediculada.

Aquellos pacientes que presentaron una fuerte sospecha clínica de lesiones papilomatosas provocadas por VPH como las definidas con anterioridad, fueron sometidos a la toma de muestra para **genotipificación de VPH** y posteriormente a la toma de biopsia excisional para el **estudio histopatológico**.

GENOTIPIFICACION VPH: Frente a la sospecha clínica de lesiones papilomatosas intraorales provocadas por VPH, se tomó una muestra de la lesión con un cepillo citológico ejerciendo una presión constante a modo de arrastrar la mayor cantidad de células. La parte activa del cepillo se sumergió totalmente en 3 ml de buffer PBS estéril contenidos en un tubo de 15 ml con tapa rosca trasladándose inmediatamente al Laboratorio de Biología Molecular del hospital San Juan de Dios.

Las muestras obtenidas se sometieron a extracción de DNA mediante el kit de extracción de ácidos nucleicos virales siguiendo las indicaciones del fabricante (High pure viral nucleic acid extraction kit, Roche). El ácido nucleico obtenido fue almacenado a – 20°C hasta el momento de análisis.

La detección de VPH se realizó mediante PCR convencional utilizando FastStart DNA Master Hybprobe Kit (Roche) y los partidores universales para VPH: MY11 y MY09 y un mix de partidores para subtipos poco frecuentes, “mix 125” incluidos en Kit LCD-Array HPV type 3.5, Chipron.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl en el termociclador Applied Biosystems 2720, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la genotipificación, los amplificados se hibridaron en el sistema LCD-Chip (sistema ADN-ADN, Kit LCD-Array HPV type 3.5, Chipron.) con sondas para distintos genotipos de VPH. Las sondas se encuentran en duplicado y permiten la detección simultánea de 32 genotipos de VPH. Para los procesos de hibridación y detección se siguieron las indicaciones del fabricante. Los genotipos incluidos en este sistema son:

Riesgo oncogénico: 16, 18, 31,33,35, 39, 45,51,52, 53,56,58,59, 68 y 73.

Bajo riesgo oncogénico: 6,11,42,44,54, 61,62,66,67,70,72, 81,82,83,84,90 y 91

Para la lectura de la placa se utilizó un scanner fotográfico. Mediante el software Chipron V9 se analizaron los spots positivos y se determinaron los genotipos presentes en cada muestra.

TOMA DE BIOPSIA Y ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO: Una vez ingresado los pacientes y tomado la muestra con cepillo citológico para la genotipificación, se programó un pabellón ambulatorio para efectuar la biopsia excisional de la lesión bajo anestesia local. Todas las biopsias fueron tomadas por el mismo operador. Se efectuó una incisión en losanjo, de espesor completo, teniendo cuidado en la manipulación de la lesión para no alterar su estudio histopatológico (**Figuras 2a, 2b y 2c**). Dependiendo del lugar anatómico, la herida operatoria fue suturada con el material indicado. La muestra fue almacenada en un recipiente con formalina tamponada de acuerdo al protocolo vigente de manejo y transporte de muestras para biopsias del Hospital San Juan de Dios y fue enviada al laboratorio de Anatomía Patológica del hospital para su diagnóstico definitivo.

El diagnóstico histopatológico se basó en la detección de las características histopatológicas conservadas en las lesiones provocadas por VPH como la presencia de proyecciones largas y delgadas que se asemejan a dedos y que se extienden por sobre la superficie mucosa, cada una formada por una capa continua de epitelio escamoso estratificado con un núcleo delgado de tejido conectivo central que contiene los vasos sanguíneos.

Pueden presentar hiperqueratosis y coilocitos en el estrato superficial. El diagnóstico fue realizado por patólogos del servicio de anatomía patológica del hospital San Juan de Dios.



Figura 2: (a) Lesión papilomatosa en dorso lingual. (b) Losanjo de mucosa lingual de espesor total (Biopsia excisional). (c) Lesión papilomatosa sobre mesa operatoria con hoja bisturí para referencia de tamaño

DETECCION DE RNAm DE VPH: Una vez determinados los casos VPH (+) histológica y molecularmente, se seleccionaron aquellas muestras que presentaran genotipos VPH 16 y 18 por ser los genotipos de alto riesgo oncogénico más prevalentes encontrados en la literatura, VPH 6 y 11 genotipos de bajo riesgo oncogénico más prevalentes encontrados en la literatura y VPH 52 y 56 por ser los que con mayor frecuencia se encontraron en los pacientes estudiados. Para ello se obtuvieron los tacos parafinados previa autorización de la Dirección del Hospital San Juan de Dios a través de su comité científico mediante la aprobación del proyecto de investigación (Anexo 3)

En estas muestras se detectó los RNAm de los genes E2 y E6/E7 de los genotipos indicados. A partir de los tacos parafinados de las biopsias de las muestras seleccionadas se realizaron cortes de aproximadamente 10 µm. La extracción del RNA se realizó utilizando el kit comercial High Pure RNA paraffin (Roche) según protocolo del fabricante. Del RNA extraído de los cortes parafinados se tomaron 10 ul para realizar la transcripción inversa utilizando 200 U de M-MLV RT(Promega), 0,5 ug de random primers (Promega), 25 U de RNasin (Promega) y 10mM de dNTPs. El volumen final fue de 25 ul y la reacción se realizó a 37°C por 1 hr (PxE 0.2 Thermal Cycler, Thermo Corporation) Las reacciones se hicieron en duplicado.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron con el kit Kapa SybrFast qPCR Master Mix Universal (KapaBiosystems) en el termociclador Eco™(Real time PCR system, Illumina). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 ul. Cada reacción se realizó con 2 ul de DNAc obtenido de cada muestra. Los partidores para cada uno de los genes a evaluar de cada genotipo fueron tomados de la literatura (Lindh M et al , 2007) y, o diseñados con el Programa Molecular Beacons basados en las secuencias del genoma descrito en GenBank. Se realizaron las estandarizaciones de cada PCR para los genes E2 y E6/E7 de VPH utilizando muestras clínicas y plasmidios como controles. Las muestras clínicas para la estandarización fueron donadas por la Dra. María José Martínez (Programa de virología-ICBM) y el Dr. Eugenio Ramírez (ISP), mientras que los plasmidios fueron donados por el Dr. Francisco Aguayo (Programa de virología-ICBM) Se determinó la presencia del RNAm celular B2M como control de calidad de la muestra, esta detección había sido estandarizada previamente en el laboratorio.

Los protocolos de estandarización y amplificación para cada gen se describen en las tablas 1 y 2:

Tabla1: Secuencias de partidores para los RNAm de los genes E2 y E6/E7 de los genotipos de VPH en estudio

GENOTIPO	GEN	SECUENCIA PARTIDORES
VPH6	E2	D: 5'CGA GGA GTC CAA CAG TCA-3'
		R: 5'TGG TCG TGA TTG TTA GTG ATG-3'
	E6/E7	D: 5'GTC GCT GCC TAC ACT GCT -3'
		R: 5' ACT TCG TCC ACC TCA TCT TCT G-3'
VPH11	E2	D: 5' GGA CAT TAC AGG ACA CCA GTT A-3'
		R: 5' TCC ATA CCA CAT ACT CCA TTA CAT-3'
	E6/E7	D: 5' GCT TCA TAA AAC TAA ATA ACC AGT GGA A-3'
		R: 5' GTC AGG AGG CTG CAG GTC TAG TA-3'
VPH16	E2	D: 5'ACT ATC CAG CGA CCA AGA-3'
		R: 5'ACT ATT ACA GTT AAT CCG TCC TT-3'
	E6/E7	D: 5'TTG CAG ATC ATC AAG AAC ACG TAG A-3'
		R: 5'CAG TAG AGA TCA GTT GTC TCT GGT TGC-3'
VPH18	E2	D: 5'CGG AGA AGC AGC ATT GTG-3'
		R: 5'TGT ATT ATA GGC GTA GTG TTA CCA-3'
	E6/E7	D: 5' GCA CGA CAG GAA CGA CTC- 3'
		R: 5'CAA TGT TGC CTT AGG TCC AT-3'
VPH 52	E2	D:5'ATT ATT GGT GTG ATG GAG AA-3'
		R:5'TGG ATA CTT CGT TAC TAG ATA C-3'
	E6/E7	D: 5'ATA TTA TGG GTC GTT GGA-3'
		R: 5'TTA TAG TTG CTT TGT CTC C-3'
VPH56	E2	D: 5'CAA GAC GCC GCA GTA TCC-3'
		R: 5'TAT TGT CTG TGT CGC TGA TGT G-3'
	E6/E7	D: 5'GCT GGA GAC AAA CAT CTA -3'
		R: 5'ACT GTA GGT CAA TTT CTG T -3'

Tabla 1: Secuencia de los partidores para los RNAm de los genes E2 y E6/E7 de cada genotipo. D: directo; R: reverso.

Tabla 2: Condiciones de amplificación para PCR tiempo real para la detección de losRNAm de los genes E2 y E6/E7 de los genotipos de VPH en estudio

GENOTIPO	GEN	AMPLIFICACIÓN	CICLOS
VPH6	E2	95°C-5s/ 60°C-10s / 72°C- 10s / 80°C- 3s	50
	E6/E7	95° x 15s/ 55°c x15s/ 72°C x 15s	50
VPH11	E2	95°C x 3s/ 58°C x 15s	50
	E6/E7	95°C x 3s/ 59°C x 10s	50
VPH16	E2	95°C x 3s/ 60°C x 15s/ 72°C x 3s	50
	E6/E7	95°C x 3s/ 60°C x 15s/ 72°C x 5s	50
VPH18	E2	95°C x 3s/ 59°C x 5s/ 72°C x 5s	50
	E6/E7	95°C x 3s/ 50°C x 5s/ 72°C x 5s	50
VPH52	E2	95°C x 3s/ 57°C x 10s	50
	E6/E7	95°C x 3s/ 58°C x10s	50
VPH56	E2	95°C x 3s/ 61°C x 5s/ 72°C x 5s	50
	E6/E7	95°C x 5 s/ 56 °C x 10 s/ 72°C x 2s	50

Tabla 2: Protocolos de amplificación de cada PCR para los RNAm de E2 y E6/E7 de VPH utilizando muestras clínicas y plasmidios como controles. Todas las reacciones incluyeron un paso previo de 3 minutos a 95 °C para la activación de la polimerasa. Al finalizar todos los ciclos, se realizó la curva de melting desde 55 °C a 95 °C con análisis de fluorescencia cada 0,1 °C. (s: segundo)

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA:

Se incorporaron al estudio 8 pacientes. La tabla 3 muestra el género, y la edad de los pacientes. Un 87,5% de los pacientes fue de género masculino. La edad promedio del total de pacientes fue de 43,75 años (rango 21 – 57 años), mientras que la mediana fue de 45 años.

Tabla 3: Características de los pacientes VIH/SIDA: género y edad.

PACIENTE	GÉNERO	EDAD (AÑOS)
026-2013	Masculino	54
070-2014	Masculino	50
061-2013	Masculino	45
046-2013	Femenino	57
059-2013	Masculino	41
XXX-2015	Masculino	21
014-2012	Masculino	45
012-2012	Masculino	37
Promedio		43,75
Mediana		45,00
Desviación standard		11,30

Tabla 3: Caracterización de la muestra de acuerdo a género y edad representada en años. Se indica el promedio, mediana y desviación standard.

En relación a la localización anatómica de las lesiones intraorales, éstas se localizaron en cara interna de la mejilla, labio, encía y lengua. La mayoría se localizó en la cara interna de la mejilla (38%).

En relación al tamaño de la lesión, determinado en milímetros (mm) por el diámetro mayor, tuvo un promedio de 6,75 mm (4 a 10 mm) y una mediana de 5,5 mm. El diagnóstico histológico de la totalidad de los pacientes correspondió a papiloma escamoso (Tabla 4).

Tabla 4: Características de las lesiones papilomatosas: localización y tamaño.

PACIENTE	LOCALIZACIÓN LESIÓN	TAMAÑO LESIÓN (mm)	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO
026-2013	Encía adherida maxilar	4	Papiloma escamoso
070-2014	Borde lateral lengua izquierda	10	Papiloma escamoso
061-2013	Cara interna mejilla izquierda	10	Papiloma escamoso
046-2013	Dorso lingual	5	Papiloma escamoso
059-2013	Cara interna mejilla derecha	5	Papiloma escamoso
XXX-2015	Cara interna labio superior	6	Papiloma escamoso
014-2012	Cara interna labio inferior	4	Papiloma escamoso
012-2012	Cara interna mejilla bilateral	10	Papiloma escamoso
Promedio		6,75	
Mediana		5,50	
Desviación standard		2,76	

Tabla 4: Caracterización clínica de las lesiones, localización anatómica dentro de la cavidad oral, tamaño de la lesión determinado por su diámetro mayor expresado en milímetros (mm) y diagnóstico histopatológico. Se indica promedio, mediana y desviación standard.

FRECUENCIA DE GENOTIPOS DE VPH

Con respecto a la frecuencia de genotipos de VPH obtenidos a partir de las lesiones papilomatosas, la tabla 5 muestra los distintos genotipos de VPH separados por riesgo oncogénico.

Un 63 % de los pacientes presentó más de un genotipo de VPH. Un 75% presentó por lo menos un genotipo de VPH de alto riesgo oncogénico. El genotipo de alto riesgo oncogénico más frecuente fue VPH 52 con un 27%, seguido del VPH 16 y 56 con un 18%. Los genotipos VPH 6 y 11 estuvieron presentes en dos pacientes (20%).

El genotipo VPH 52, a diferencia de otros genotipos de alto riesgo oncogénico se presentó como infección única en los pacientes, sin la presencia de otros genotipos oncogénicos, a diferencia de los otros genotipos de alto riesgo oncogénico que se presentaron de manera combinada.

Tabla 5: Genotipos de VPH detectados las lesiones papilomatosas intraorales de pacientes VIH/SIDA.

Paciente	Genotipo alto riesgo oncogénico	Genotipo bajo riesgo oncogénico
026-2013	16,56,59	67
070-2014	16, 18, 58	
061-2013	39, 56	83,72
046-2013	52	11
059-2013	52	
xxx-2015	52	
014-2012		6, 61
012-2012		72

Tabla 5: Genotipos de VPH de acuerdo al riesgo oncogénico detectados en las lesiones intraorales y determinados a través del Kit LCD-Array HPV type 3.5, Chipron.

GENOTIPOS DE VPH, RECUENTO DE LINFOCITOS T CD4 Y CARGA VIRAL DE VIH

El recuento promedio de linfocitos T CD4 de todos los pacientes participante en el estudio fue de 418.3 cel/mm³, mientras que la mediana fue 417.5 cel/mm³. La carga viral de VIH de todos los pacientes fue indetectable, es decir, menor a 500 copias/ml (Tabla 6).

Tabla 6: Genotipos de VPH, recuento de linfocitos T CD4 y carga viral de VIH

Paciente	Genotipo VPH AR	Genotipo VPH BR	Recuento LT CD4 (cel/mm ³)	Carga viral VIH (copias/ml)
026-2013	16,56,59	67	483	I
070-2014	16, 18, 58		455	I
061-2013	39, 56	83,72	144	I
046-2013	52	11	203	I
059-2013	52		172	I
xxx-2015	52		527	I
014-2012		6, 61	380	I
012-2012		72	983	I
Promedio			418.3	
Mediana			417.5	
Desviación standard			272.54	

Tabla 6: Genotipos de VPH detectados (AR: alto riesgo oncogénico; BR bajo riesgo oncogénico) y el recuento de Linfocitos T CD4 para cada caso y la carga viral de VIH. I: corresponde a una carga viral indetectable, menos de 500 copias/ml. Se indica promedio, mediana y desviación standard.

El recuento promedio de linfocitos T CD4 de aquellos pacientes que presentaron al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico fue de 330.6 cel/mm³, mientras que su mediana fue de 329 cel/mm³ (Tabla 7)

Tabla 7: Genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico y recuento de linfocitos T CD4

Paciente	Genotipo VPH-AR	Recuento LT CD4 (cel/mm ³)
026-2013	16,56,59	483
070-2014	16, 18, 58	455
061-2013	39, 56	144
046-2013	52	203
059-2013	52	172
xxx-2015	52	527
Promedio		330.6
Mediana		229.0
Desviación standard		175.23

Tabla 7: Genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico (AR) y recuento de Linfocitos T CD4 para cada caso. Se indica el promedio, mediana y desviación standard.

DETECCIÓN DE RNAm E2 Y E6/E7 DE DISTINTOS GENOTIPOS DE VPH:

Se seleccionaron aquellas muestras que presentaron genotipos VPH 16 y 18 por ser los genotipos de alto riesgo oncogénico más prevalentes encontrados en la literatura, VPH 6 y 11 genotipos de bajo riesgo oncogénico más prevalentes encontrados en la literatura y VPH 52 y 56 por ser los que con mayor frecuencia se encontraron en los pacientes estudiados.

En la figura 3 se observa una curva representativa de la amplificación y curva de *melting* del RNAm celular de B2M, utilizado como control de calidad de los DNAc de cada paciente.

En la tabla 8 se muestra los valores umbrales del ciclo o Ct (threshold cycle) y temperaturas de melting promedio de los productos amplificados (T_m) obtenidos en cada muestra para el RNAm de B2M.

Figura 3: Amplificación y curva de melting obtenida para B2M mediante PCR tiempo real.

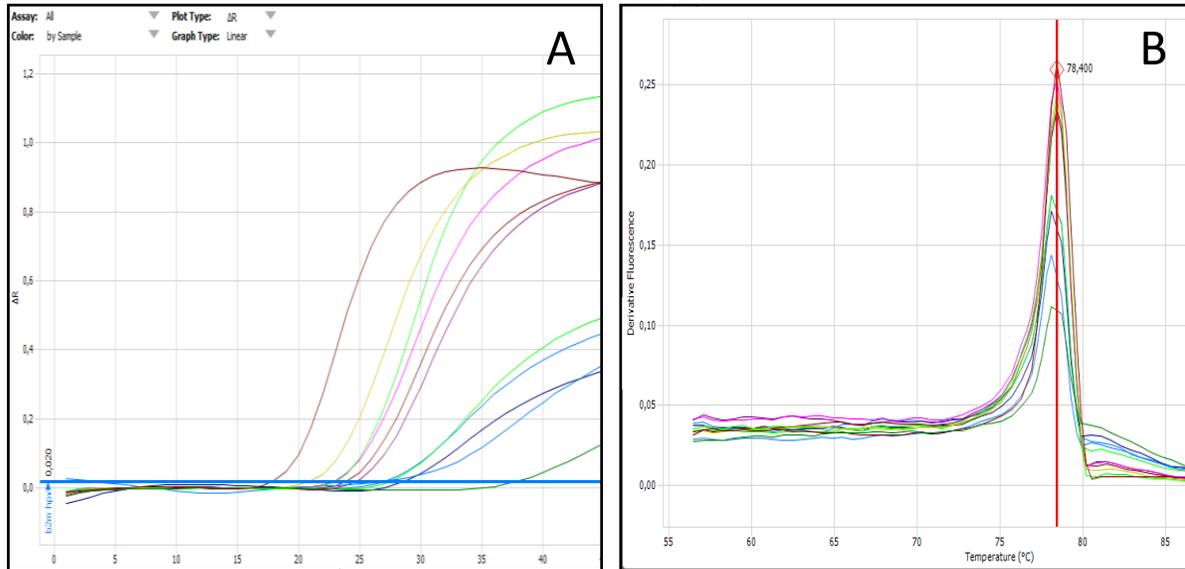


Figura 3: En el panel A se observa la curva de amplificación de los DNAc de B2M de todas las muestras de pacientes. En el panel B se observan las curvas de T_m , la línea vertical está posicionada en un sector intermedio de las curvas para señalar la T_m promedio.

Tabla 8: Valores umbrales del ciclo (Ct) y temperaturas de melting de productos amplificados (Tm) para B2M en las muestras VPH positivas

Paciente	Promedio Ct	DS Ct	Tm(C°)
026-2013	32,3	7,86	78,4
070-2014	22,9	1,369	78,6
061-2013	28,9	2,64	78,3
046-2013	23,0	0,03	78,1
059-2013	22,9	0,12	78,6
xxx-2015	20,9	0,14	78,6
014-2012	24,4	0,31	78,6

Tabla 8: Valores umbrales del ciclo o Ct (threshold cycle) y temperaturas de melting promedio de los productos amplificados (Tm) obtenidos para cada muestra clínica para el gen B2M utilizado como control de calidad de los RNAm extraídos de los tacos de las lesiones.(DS: desviación standard)

En todas las reacciones de amplificación, a pesar de ser PCR en tiempo real, se realizó un gel de agarosa para corroborar la presencia y tamaño esperado del amplificado. Todas las reacciones se repitieron para corroborar la negatividad o positividad en cada situación. En el caso de los genotipos VPH16, 52 y 56, no se logró obtener amplificación positiva para ninguno de los RNAm en estudio.

Para el genotipo VPH18, se detectó la expresión de RNAm de E6/E7 como se muestra en la **figura 4** (Curva de amplificación y de melting). Para este genotipo no se detectó el RNAm de E2. La Ct para la muestra positiva de VPH18 (muestra 070-2014) fue de 36,23. La temperatura de melting (Tm) fue de 77,5°C, esta misma temperatura se obtuvo para el control positivo.

Figura 4: Amplificación y curva de melting obtenida para E6/7 de VPH18 mediante PCR tiempo real.

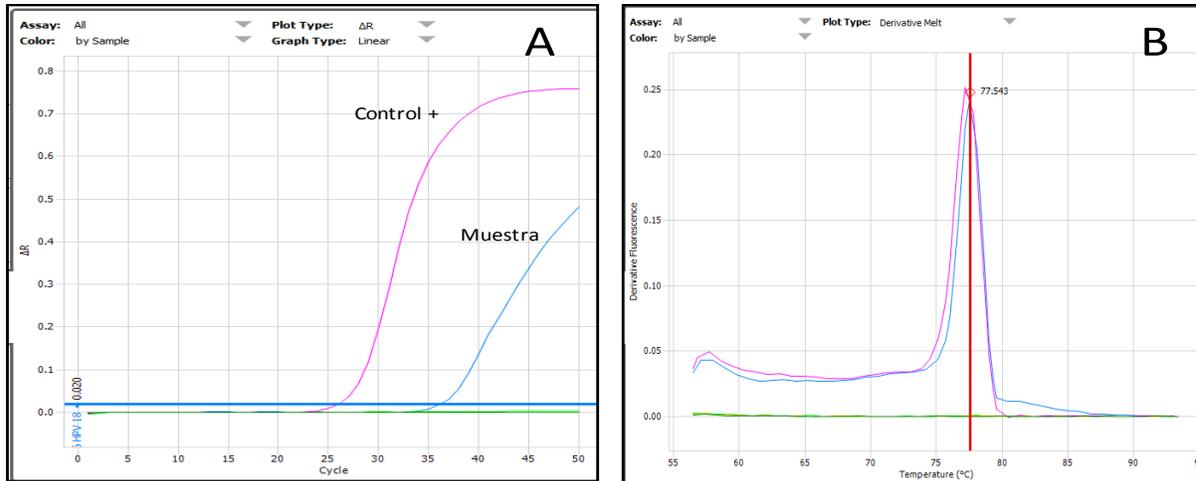


Figura 4: En el panel A se observa la curva de amplificación de la muestra control y de la muestra070-2014, positiva para VPH18. El control negativo no presenta señal de amplificación. En el panel B se observa la curva de T_m , tanto el control positivo como la muestra 070-2014, presentan la misma temperatura de melting. (T_m 77.5 C°)

Para los genotipos VPH6 y VPH11 se detectaron los RNAm tanto de E2 como de E6/7. En las **figuras 5 y 6** se observan las amplificaciones para VPH6, en las **figuras 7 y 8** se observan las amplificaciones para VPH11 para cada gen. Estos amplificados se detectaron con una Ct baja indicando una posible mayor expresión de estos RNAm en estos genotipos.

Figura 5: Amplificación y curva de melting obtenida para E2 de VPH 6 mediante PCR tiempo real.

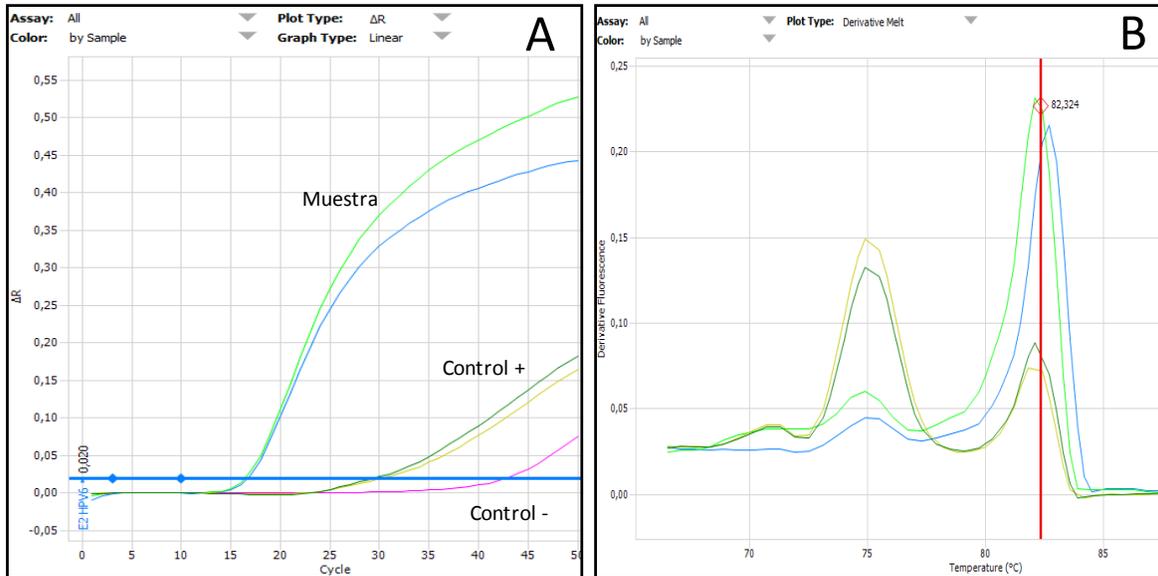


Figura 5: En el panel A se observa la curva de amplificación de la muestra control y de la muestra 014-2012, positiva para VPH 6. El control negativo presenta señal de amplificación tardía con una T_m diferente al control positivo. En el panel B se observa la curva de T_m , tanto el control positivo como la muestra 014-2012, presentan una temperatura de melting similar (T_m 82.4 °C)

Figura 6: Amplificación y curva de melting obtenida para E6/E7 de VPH 6 mediante PCR tiempo real.

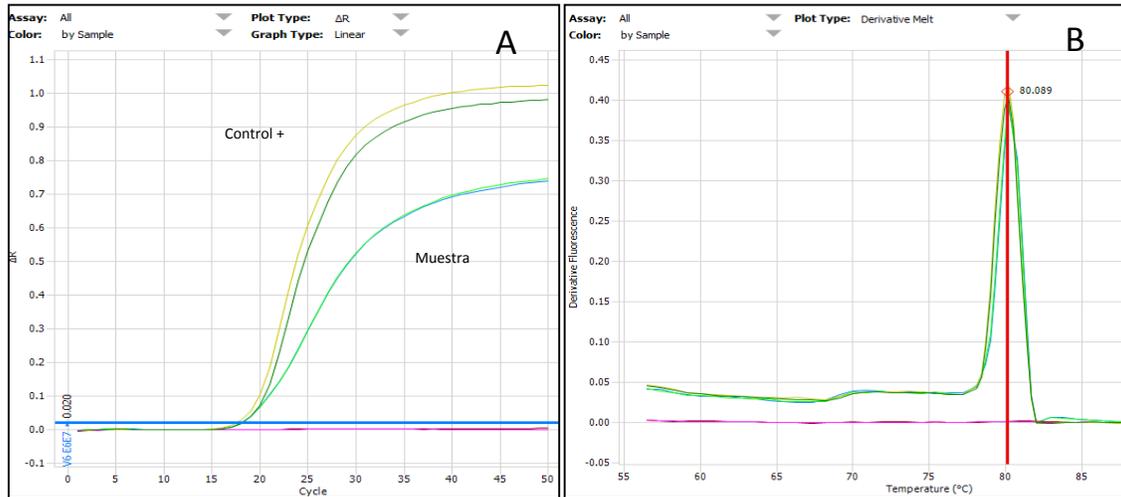


Figura 6: En el panel A se observa la curva de amplificación de la muestra control y de la muestra 014-2012, positiva para VPH 6. El control negativo no presenta señal de amplificación. En el panel B se observa la curva de T_m , tanto el control positivo como la muestra 014-2012, presentan la misma temperatura de melting. (T_m 80.1 C°)

Figura 7: Amplificación y curva de melting obtenida para E2 de VPH11 mediante PCR tiempo real.

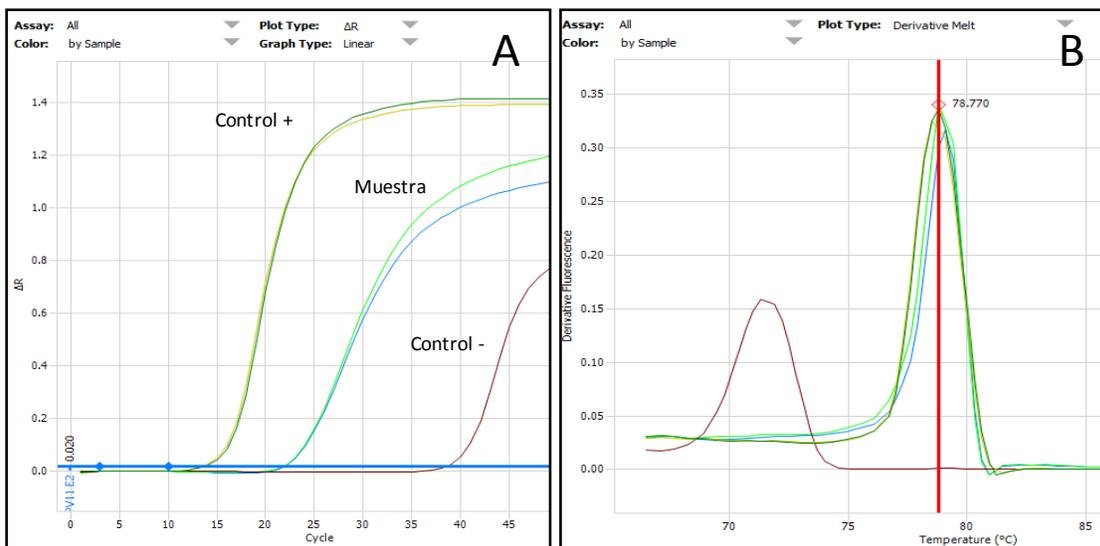


Figura7: Panel A: Curva de amplificación de la muestra control y de la muestra 046-2013, positiva para VPH 11. El control negativo presenta señal de amplificación tardíamente. Panel B: Curva de T_m , tanto el control positivo como la muestra 046-2013, presentan temperaturas de melting similar (T_m 79.1 C°). El control negativo presenta una T_m inferior (71.5°C)

Figura 8: Amplificación y curva de melting obtenida para E6/E7 de VPH 11 mediante PCR tiempo real.

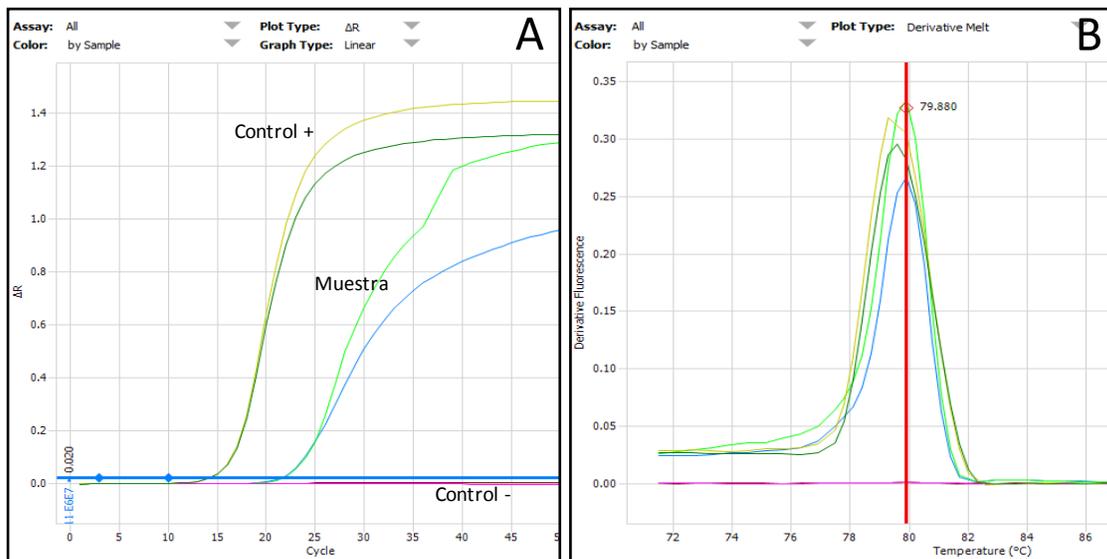


Figura 8: En el panel A se observa la curva de amplificación de la muestra control y de la muestra 046-2013, positiva para VPH 11. El control negativo no presenta señal de amplificación. En el panel B se observa la curva de Tm (Temperatura de melting), tanto del control positivo como la muestra 046-2013, presentan una temperatura de melting promedio de Tm 79.9°C°.

DESCRIPCIÓN DE FACTORES ASOCIADOS EN GENOTIPOS DE VPH DE ALTO RIESGO ONCOGÉNICO

Genotipos de VPH, TARV y tiempo de evolución de VIH.

Los pacientes tienen un promedio de tiempo de evolución de la infección de VIH de 4,81 años (0,5 – 21 años) con una mediana de 4,83 años y un tiempo promedio de uso de TARV de 3,68 años (0,5 – 14 años) y una mediana de 3,5 años (Tabla 9).

El promedio de evolución de la infección de VIH en aquellos pacientes que presentan por lo menos un genotipo oncogénico de VPH es de 6,08 años (0,5 a 21 años) con una mediana de 3,5 años, mientras que el promedio de uso de TARV en

estos pacientes es de 4,6 años (0,5 a 14 años) con una mediana de 2,5 años (Tabla 10).

Tabla 9: Genotipificación de VPH, uso de TARV y evolución de VIH.

Paciente	Genotipo VPH-AR	Genotipo VPH-BR	Tiempo VIH (años)	Tiempo TARV (años)
026-2013	16,56,59	67	21	14
070-2014	16, 18, 58		7	7
061-2013	39, 56	83, 72	0,5	0,5
046-2013	52	11	3	1
059-2013	52		4	4
XXX-2015	52		1	1
014-2012		6, 61	1	1
012-2012		72	1	1
Promedio			4,81	3,68
Mediana			4,83	3,50
Desviación standard			6,89	7,67

Tabla 9: Tiempo de evolución de VIH y de TARV (Terapia antiretroviral) expresada en años, de acuerdo a cada genotipo de VPH encontrado detectado en las muestras (AR: alto riesgo oncogénico; BR: Bajo riesgo oncogénico; SRO: riesgo oncogénico sin determinar). Se indica promedio, mediana y desviación standard.

Tabla 10: Uso de TARV y evolución de VIH en pacientes con genotipos de alto riesgo oncogénico

Paciente	Genotipo VPH-AR	Tiempo VIH (años)	Tiempo TARV (años)
026-2013	16,56,59	21	14
070-2014	16, 18, 58	7	7
061-2013	39, 56	0,5	0,5
046-2013	52	3	1
059-2013	52	4	4
XXX-2015	52	1	1
Promedio		6,08	4,58
Mediana		3,5	2,5
Desviación standard		7,67	5,24

Tabla 10: Tiempo de evolución de VIH y de TARV (Terapia antiretroviral) expresada en años, de acuerdo a los genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico detectado en las muestras. Se indica promedio, mediana y desviación standard.

Genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico y hábito tabáquico y alcohólico

La mayoría de los pacientes (83%) no presentan hábito tabáquico o alcohólico activo (Tabla 11)

Tabla 11: Genotipos VPH de alto y bajo riesgo oncogénico y consumo de Tabaco y Alcohol

Paciente	Genotipo VPH-AR	Tabaco	Alcohol
026-2013	16,56,59	NO	NO
070-2014	16, 18, 58	NO	NO
061-2013	39, 56	NO	NO
046-2013	52	NO	Crónico detenido desde 2009
059-2013	52	20 cigarros/día por 25 años	NO
XXX-2015	52	NO	NO

Tabla 11: Frecuencia de consumo de tabaco y alcohol en aquellos pacientes que presentaron genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en las muestras de lesiones papilomatosas.

Genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico y conducta sexual

De todos los pacientes que presentan al menos un genotipo de VPH de alto riesgo oncogénico, un 50% corresponden a hombres homosexuales, mientras que un 33,35% son hombres heterosexuales y el resto corresponde a una mujer heterosexual. Desde el momento de notificación de VIH, un 66,6% de los pacientes ha optado por la abstinencia sexual, mientras que el resto de los pacientes mantiene relaciones sexuales genitales/anales en un 100% con protección a través de preservativo, y un 50% (1 caso) refiere practicar relaciones sexuales orales sin protección alguna (Tabla 12)

Tabla 12: Genotipos VPH de alto riesgo oncogénico, orientación sexual y actividad sexual.

Paciente	Género	Genotipo VPH-AR	Orientación sexual	Sexo anal/genital	Sexo oral
026-2013	Masculino	16,56,59	Homosexual	Protegido	No protegido
070-2014	Masculino	16, 18, 58	Heterosexual	Abstinencia	Abstinencia
061-2013	Masculino	39, 56	Homosexual	Abstinencia	Abstinencia
046-2013	Femenino	52	Heterosexual	Abstinencia	Abstinencia
059-2013	Masculino	52	Heterosexual	Abstinencia	Abstinencia
XXX-2015	Masculino	52	Homosexual	Protegido	Protegido

Tabla 12: Orientación y Conducta sexual de aquellos pacientes en los que se encontró al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico en las muestras de estudio. La abstinencia sexual se refiere a la ausencia de relaciones sexuales genitales, anales u orales desde el momento de la notificación de VIH.

DISCUSION

En los últimos años, ha aumentado el interés en el estudio del VPH por su rol en la patogénesis de tumores malignos planteada inicialmente por el Dr. zur Hausen en la década de los 70's (Zur Hausen et al, 1974). Actualmente, el VPH es considerado un nuevo factor de riesgo para el desarrollo de cáncer oral junto con el consumo de tabaco y alcohol (Krüger et al, 2014) (Ajila et al, 2015). Por otro lado, se conoce que pacientes con VIH/SIDA presentan un mayor riesgo de desarrollar carcinoma escamoso oral o genital (Syrjänen S, 2011) así como también, de presentar un aumento en el riesgo de infecciones genitales y anales con genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico. (Rautava J & Syrjänen S, 2011). Este fenómeno podría ser explicado por la disminución del recuento de linfocitos T CD4 entre otros factores (Beachler et al, 2011).

En nuestro país no existen antecedentes publicados acerca de la frecuencia de genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico así como también biomarcadores de actividad oncogénica y factores de riesgo asociados en una población vulnerable como los pacientes inmunosuprimidos por VIH. Por esta razón, el objetivo general de este trabajo de investigación fue determinar genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en lesiones papilomatosas orales de pacientes VIH/SIDA, detectar los RNAm de E2 y E6/E7, caracterizar clínicamente las lesiones, determinar su diagnóstico histológico y describir factores asociados como recuento de linfocitos T CD4, carga viral de VIH, tiempo de evolución de la enfermedad, tiempo de uso de TARV, consumo de alcohol y tabaco y conducta sexual en pacientes VIH/SIDA del Hospital San Juan de Dios.

De manera general, en este estudio se encontró que la mayoría de los pacientes presentó por lo menos un genotipo de VPH de alto riesgo oncogénico (75%) y por lo menos más de un genotipo de VPH (63%). El genotipo de VPH de alto riesgo oncogénico más frecuente fue VPH 52 (27%) seguido de VPH 16 y VPH 56 (18%). VPH 52 se presentó de manera solitaria, sin otros VPH de alto riesgo oncogénico.

El recuento promedio de linfocitos T CD4 de aquellos pacientes que presentaron al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico fue de 330.6 cel/mm³. Se detectó además RNAm E6/E7 de VPH 18, VPH 6 y VPH 11, y del RNAm E2 de VPH 6 y VPH 11, pero no se logró la detección de los RNAm de los genotipos VPH16, 52 y 56.

Cada uno de estos resultados serán discutidos a continuación.

CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA: Durante el período de reclutamiento, se incluyeron en el estudio 8 pacientes. La literatura describe un aumento en la incidencia y prevalencia de lesiones por VPH en pacientes VIH/SIDA bajo TARV que va desde un 7% a un 45% dependiendo el tipo de estudio (Beachler D & D' Souza G, 2013) (Anaya-Saavedra G et al, 2013) (Patton LL. 2013) (Beachler D et al, 2013) (King M et al, 2002). Desde que comenzó la protocolización de atención de pacientes en el Servicio de Cirugía Máxilofacial en el año 2012 y hasta diciembre de 2015, han sido derivados para evaluación de lesiones papilomatosas o se han pesquisado por hallazgo clínico, sólo 12 pacientes, de los cuales, 8 han tenido una genotipificación y una biopsia positiva para VPH.

Si consideramos que la población de pacientes VIH/SIDA del Hospital asciende a 2.000 pacientes aproximadamente, sólo un 0,4 % ha presentado lesión. Esta baja frecuencia de lesiones en comparación con la literatura mundial puede deberse a los métodos diagnósticos reportados en los estudios (clínico, histopatológico, molecular), tipos de estudios (prospectivos, retrospectivos) y oportunidad de atención de los pacientes, en donde a pesar de ser derivados para evaluación por presentar estas lesiones, no asisten a la consulta.

Los 4 pacientes que quedaron fuera del estudio fue producto de una discrepancia entre el diagnóstico histopatológico y la genotipificación para VPH, en donde a pesar de tener un examen histopatológico compatible con papiloma escamoso, la genotipificación para VPH fue negativa para los genotipos de VPH evaluados en el kit del estudio.

Una posibilidad de la generación de esta discrepancia, radique en el sistema para detectar los genotipos. Si bien, el kit utilizado es capaz de detectar la presencia de los genotipos mucosos más prevalentes, los partidores iniciales no cubren el 100% de todos los genotipos descritos en literatura, por lo que puede no haberse amplificado el genoma de VPH del genotipo específico de esas muestras. La utilización de secuenciación de estas muestras podría haber permitido su detección como VPH positivas.

Por otro lado, hay que considerar que muy a menudo, la recolección celular a través del cepillado de la lesión puede ser limitada y no se alcanza el mínimo necesario de 100.000 células para obtener una muestra representativa (Kellokoski J et al, 1990). Esto podría explicar porque muestras histológicamente positivas para papiloma, resultaran molecularmente negativas para VPH.

La detección que resulta más segura y confiable sería realizar la genotipificación a través de muestra fresca a partir de la biopsia, sin embargo, el tamaño de éstas, es por lo general bastante pequeño. En nuestro estudio la mediana fue de 5,5 mm de diámetro mayor para las muestras estudiadas (Tabla 4). Si consideráramos dividir la muestra para obtener el material fresco para el estudio de genotipificación y para la histopatología, esta maniobra puede alterar el diagnóstico histopatológico y tal vez, se mejoraría la detección de VPH, pero alteraríamos los resultados histopatológicos.

La edad promedio de los pacientes fue de 43,8 años (rango de 21 – 57 años, mediana de 45 años) (Tabla 3). En otros estudios se ha descrito una mayor frecuencia en pacientes sobre los 50 años de edad (Fatahzadeh M et al, 2013) (Muller K et al, 2015) (Beachler D et al, 2015). Estos estudios sugieren que la gran cantidad de carga viral y el amplio espectro de tipos de VPH, se debe a que la cavidad oral es un reservorio de infección subclínica para VPH en aquellos pacientes en que sus expectativas de vida han mejorado enormemente gracias al uso de TARV (Fatahzadeh M et al, 2013).

En relación al género, prácticamente la totalidad de pacientes son de género masculino (87%) (Tabla 3). En un estudio reciente de 5.579 pacientes VIH (-) (rango de edad de 14 a 69 años) se encontró que los hombres eran más propensos a presentar infección por VPH en la cavidad oral que las mujeres independientes de otros factores de riesgo como número de parejas sexuales y consumo de tabaco (Gillison ML et al, 2012).

Reportes en pacientes VIH (+) también han encontrado una mayor prevalencia de VPH en hombres que en mujeres (Beachler D et al, 2013).

El género masculino también está asociado a una persistencia de VPH en la cavidad oral, lo que reviste especial interés debido a las altas tasas de cáncer oro faríngeo VPH (+) reportado en esta población (72.6% en hombres y 27.4 % en mujeres) (Chaturvedi AK et al, 2008). Se postula que, la persistencia del virus en hombres en comparación con las mujeres es consistente con una respuesta inmune muchos más efectiva por parte de las mujeres en contra de agentes infecciosos, debido probablemente a factores hormonales (Klein SL, 2000).

En relación a la localización anatómica de las lesiones, no existen muchos artículos publicados que consideren la genotipificación de lesiones puntuales encontradas en la cavidad oral, ya que la mayoría realiza la genotipificación a partir de colutorios o saliva.

De acuerdo al trabajo de Mravak-Stipetic (Mravak-Stipetic M et al, 2013) realizado en una población VIH (-), en donde se evalúan lesiones que son VPH (+) de acuerdo a la topografía de la cavidad oral, se determina que la localización anatómica juega un rol en la prevalencia de VPH dentro de las lesiones orales. La presencia de VPH puede darse en toda la cavidad oral, por lo que se considera una infección multifocal, a excepción del piso de boca y cara ventral de la lengua en donde no hubo presencia de VPH. Los sitios anatómicos de la cavidad oral con mayor frecuencia de lesiones VPH (+) corresponden al bermellón del labio, paladar duro, mucosa labial y comisura labial. Una explicación a este fenómeno sería la exposición de estos sitios a microtraumas, pre requisito para que se produzca la infección por VPH (Mravak-Stipetic M et al, 2013). Por otro lado, en una serie de 9 casos de pacientes VIH (+) con lesiones por VPH en cavidad oral, un 67% de las lesiones papilomatosas estaban localizadas en la encía y un 22% en el labio inferior (Syrjänen S, 2011).

En nuestro trabajo de investigación, la mayoría de las lesiones se localizó en la cara interna de la mejilla (38%), lo que difiere de los escasos hallazgos de la literatura. (Tabla 4). Esto podría deberse a que, en este sitio anatómico de acuerdo a los hábitos de cada paciente, podrían producirse micro traumas que faciliten la entrada de partículas virales que infecten la capa basal de la mucosa intraoral (Mravak-Stipetic M et al, 2013).

Independiente de la localización, la totalidad de los pacientes presentaron diagnóstico histopatológico de papiloma escamoso. Este diagnóstico fue informado por dos patólogos que trabajan en forma conjunta en el servicio de anatomía patológica del hospital San Juan de Dios (Tabla 4).

No existen muchos trabajos en la literatura en donde el diagnóstico de las lesiones se realice desde el punto de vista clínico, histopatológico y molecular, por lo que el contraste de los resultados resulta complejo. En el estudio de Anaya-Saavedra de 2013 (Anaya-Saavedra G et al, 2013), de un total de 55 lesiones biopsiadas de pacientes VIH (+), un 40% correspondió a papiloma escamoso y el resto era compatible con Hiperplasia epitelial focal, verruga vulgar y verrugas orales.

Estas diferencias pueden deberse a distintos criterios diagnósticos ya que la totalidad de las lesiones papilomatosas como papiloma oral, verruga oral y condiloma acuminado comparten características histológicas que muchas veces son indistinguibles entre sí, y el diagnóstico diferencial se produce al conocer los genotipos de VPH involucrados. Como la conducta terapéutica es la misma para cualquiera de estos tipos de lesiones descritas, que consiste en la eliminación de la lesión vía quirúrgica, por lo general, no se realiza la genotipificación para realizar un diagnóstico definitivo.

FRECUENCIA DE GENOTIPOS DE VPH: Los pacientes VIH/SIDA tienen una mayor predisposición de infectarse con genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, así como también, de infectarse con más de un tipo de VPH (Kreuter A & Wieland U, 2009). Esto concuerda con los resultados obtenidos en donde de un total de 8 pacientes, 5 (63%) de ellos presentaron más de un genotipo de VPH y 6 (75%) presentaron por lo menos un genotipo de alto riesgo oncogénico. (Tabla 5)

Con respecto a los distintos genotipos encontrados en cavidad oral, es importante hacer la diferencia entre aquellos estudios que realizan la genotipificación en muestras de colutorios de la cavidad oral y de saliva frente a aquellos que lo realizan directamente sobre las lesiones.

En el primer caso, no es posible discriminar el sitio anatómico del cual proviene la muestra y tampoco determinar si es exclusivo de cavidad oral o de la región faríngea, así como tampoco se puede evaluar si la infección está activa, ya que, por lo general, son realizados en población que no presenta lesiones orales (infección sub clínica). Estos son los estudios que con mayor frecuencia encontramos en la literatura.

El estudio de Cameron & Hagansee de 2008 (Cameron J & Hagansee M, 2008) determinó que VPH 32 era el más frecuentemente encontrado, sin embargo, la mayoría de los estudios que realizan genotipificación a través de colutorios, indican que el genotipo más prevalente es VPH 16. (D'Souza G et al 2007) (Fakhry C & Gillison ML, 2006) (Kreimer AR, 2005). En un estudio que comparó la frecuencia de distintos genotipos de VPH en población VIH (+) y VIH (-) (161 pacientes VIH/SIDA y 128 pacientes sanos) con colutorios de cavidad oral, se determinó que un 32% de los pacientes VIH (+) presentó VPH en la muestra de cavidad oral mientras que un 16% de los pacientes VIH (-) presentaba VPH. Los genotipos de VPH más frecuentemente encontrados en pacientes VIH (+) fueron VPH 16, seguido por VPH 35, VPH 32, VPH 72, VPH 6-11 y VPH 18. (Muller K et al, 2015).

En relación a los estudios que realizan la genotipificación directamente sobre las lesiones en pacientes VIH (+), estos son pocos y presentan un número de pacientes bastante acotado. Uno de los primeros trabajos publicados en relación a este tema es el de Völter de 1996 (Völter et al, 1996) en donde a partir de biopsias (tacos parafinados) de lesiones papilomatosas intraorales de pacientes VIH (+), detectaron VPH en un 67% de los casos (45 pacientes). Los genotipos más frecuentes detectados fueron VPH 32 (28%) y VPH 7 (19%). Estos genotipos están en la categoría 3 por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), genotipos que no están, hasta el momento, asociados a ningún proceso oncogénico (Doorbar J et al, 2012). También se reporta presencia de VPH 18, VPH 6 y VPH 16 en menor proporción.

En el estudio de Syrjänen realizado el 2011 (Syrjänen S 2011), que incluyó 9 pacientes de nacionalidad alemana VIH (+) en donde se evaluaron lesiones que clínicamente eran compatibles con lesiones papilomatosas, sin estudio histopatológico, se determinó como genotipo más frecuente a VPH 32 (40%), seguido por VPH 6 (30%) y VPH 16 (20%).

En nuestro estudio el genotipo más frecuente fue VPH 52 con 3 casos (27%), seguido de VPH 16 y 56 con dos casos (18%) (Tabla 5). Estos tres genotipos están en la categoría 1 por la IARC, o de alto riesgo oncogénico. Estos resultados no se condicen con los hallazgos de la literatura en donde los genotipos más frecuentemente encontrados corresponden a VPH 32 y VPH 16 (Tabla 13), aunque las metodologías de genotipificación varían de estudio en estudio. Así, la no detección de casos con VPH32, en nuestro estudio, era esperable, pues el kit de genotipificación no incluye la detección de este genotipo. Considerando este antecedente, podría realizarse una detección específica en las muestras para determinar la presencia del genotipo VPH 32 y verificar si en nuestra población detectamos dicho genotipo. Aquellos pacientes discrepantes entre genotipificación e histología podrían presentar genotipos como el VPH 32 no incluidos en las sondas de hibridación del kit utilizado. Por otro lado, aunque VPH16 no fue el más frecuente, si se detectó en 18% de nuestra población, siendo el segundo más frecuente.

Debido a lo reducido de la muestra, no es posible atribuir estas diferencias a factores epidemiológicos exclusivamente ya que también hay que considerar los diferentes métodos de genotipificación utilizados, así como también la sensibilidad de dichos métodos.

Tabla 13: Estudios de genotipificación de VPH en pacientes VIH (+)

Estudio	Tipo muestra	Cantidad de pacientes	Genotipo más frecuente	Metodología de genotipificación
Cameron J & Hagansee M, 2008	Colutorio	170	VPH 32 (37%)	Ensayo PCR específico para VPH 32
Muller K et al, 2015	Colutorio	161	VPH 16 (8%)	Técnica de Hibridación (dot blot)
D'Souza G et al 2007	Colutorio	136	VPH 16 (3,8%)	Hibridación reversa (Macroarray) 37 genotipos
Völter et al, 1996	Biopsia (bloque parafina)	45	VPH 32 (28%)	Secuenciación directa
Syrjänen S 2011	Directa	9	VPH 32 (40%)	Hibridación reversa (Reverse line blot) 24 genotipos
Trabajo actual	Directa	8	VPH 52 (27%)	Hibridación reversa (Macroarray) 32 genotipos

Tabla 13: Estudios publicados en la literatura y estudio actual que compara tipo de muestra, cantidad de pacientes, genotipo de VPH encontrado con mayor frecuencia y metodología de genotipificación.

El genotipo VPH 52, a diferencia de otros genotipos de alto riesgo oncogénico se presentó como infección única en los pacientes, sin la presencia de otros genotipos oncogénicos. Los otros genotipos de alto riesgo oncogénico que se presentaron de manera combinada (Tabla 5).

En relación a la co-infección con distintos tipos de VPH en cavidad oral, no existen estudios epidemiológicos importantes, sin embargo, para múltiples infecciones de VPH en la región cérvico uterina, si existen. En el trabajo de Dickson de 2013 (Dickson et al, 2013) en donde se realizó un estudio de corte transversal analizando 309.471 muestras de citología cervical de rutina, se determinó que el 24% de la muestra era VPH (+) (74.543) y que los genotipos VPH 52, 53, 81 y 83 eran los que con mayor frecuencia se presentaban en co-infecciones. Hallazgos similares fueron descritos en el estudio de Spinillo de 2009 (Spinillo et al, 2009) en donde se evaluaron 681 mujeres con neoplasia cervical intraepitelial. En estas muestras, un 99,4% eran VPH (+) y de éstas, 72,1% presentaban co-infecciones con distintos genotipos de VPH. VPH 52 se encontró como infección única en un 9,1% de los casos y como parte de co-infección en un 22,6% de los casos.

Ya que, en todos estos trabajos, solo hay detección del genoma viral no podríamos asegurar si hay una interferencia viral relacionada con la replicación y producción de nuevas partículas virales en el caso de las infecciones múltiples. Por otro lado, considerando que estos estudios son de mucosa cervical, no se puede descartar que la mucosa oral presente otros factores que permitan una ventaja infectiva para producir lesiones clínicas al genotipo 52 frente a los otros genotipos, aunque en este estudio solo es un hallazgo en un número acotado de muestras sería tema de futuros estudios.

FRECUENCIA DE GENOTIPOS DE VPH, RECUENTO DE LINFOCITOS T CD4 Y CARGA VIRAL: Si bien, el mecanismo que permite la reactivación de una infección latente o la adquisición de una nueva infección por VPH no es del todo claro (Fatahzadeh M et al, 2013), la inmunosupresión asociada al VIH podría ser un importante factor de riesgo para la incidencia o persistencia de VPH en la cavidad oral.

Estadíos avanzados de inmunosupresión de SIDA caracterizados por bajos recuentos de Linfocitos T CD4 (menores a 200 cel/mm³) también están asociados a un aumento en la prevalencia de VPH en la cavidad oral, lo que reflejaría una falta de control virológico en aquellos pacientes con un sistema inmune comprometido (Beachler D et al, 2013).

La capacidad de persistencia del virus también se vincula al recuento de linfocitos T CD4, sobre todo cuando el recuento es menor a 500 cel/mm³. (Syrjänen S ,2011).

En nuestro estudio, el recuento promedio de linfocitos T CD4 de todos los pacientes participante fue de 418.3 cel/mm³, mientras que, el recuento promedio de linfocitos T CD4 de aquellos pacientes que presentaron al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico fue de 330.6 cel/mm³ (Tabla 6 y tabla 7)

Estos datos se correlacionan con la literatura en donde en el estudio de Anaya-Saavedra del año 2013 y de Syrjänen del año 2011 (Anaya-Saavedra G et al, 2013) (Syrjänen S ,2011), el recuento promedio de Linfocitos T CD4 de los pacientes que presentaron genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en la cavidad oral fue de 282 cel/mm³ y 330.1 cel/mm³, respectivamente. Sin embargo, hay que considerar que en estos estudios y en el nuestro, a pesar de un recuento de linfocitos bajo y similar, corresponden solo a un momento de la situación del paciente y estudios de seguimiento podrían apoyar, si la mantención de estos recuentos se correlaciona con la persistencia de la infección de genotipos VPH de alto riesgo.

De manera contraria al recuento de Linfocitos T CD4, un aumento de la carga viral de VIH generaría una atenuación de la inmunidad local y por ende, un aumento en las lesiones papilomatosas (Anaya-Saavedra G et al, 2013).

En nuestro estudio, la carga viral de todos los pacientes fue indetectable, es decir, menor a 500 copias/ml y a pesar de eso, existía expresión clínica de infección por VPH. Se necesita un mayor número de pacientes para poder establecer una relación (Tabla 6).

DETECCIONDE RNAm E2 Y E6/E7:

La identificación de ADN de VPH en un tumor no provee suficiente evidencia para afirmar que la presencia de virus pudo haber generado la neoplasia, ya que la técnica no permite diferenciar una infección viral transitoria de una oncogénicamente activa. La identificación de transcripción de los oncogenes virales E6/E7, que están implicados en el proceso oncogénico, se acepta como la prueba que permite elucidar el rol oncogénico de VPH en un tumor (Ndiaye C et al, 2014).

La presencia de RNAm de E6/E7 ya sea detectando a su proteína o detección y cuantificación a través del DNA viral son biomarcadores utilizados para evaluar progresión y gravedad de lesiones oncológicas provocadas por VPH en la región cervicouterina, cabeza y cuello, ano, entre otros sitios anatómicos (Barón C et al, 2015) (Combes JD & Franceschi S, 2013) (Silling S et al 2012) (Ndiaye C et al, 2014).

En una revisión sistemática y meta análisis publicada recientemente (Ndiaye C et al, 2014) se encontró que un 89,9% del cáncer orofaríngeo VPH (+) existía presencia de RNAm E6/E7, mientras que en una revisión realizada por Combes & Franceschi (Combes JD & Franceschi S, 2013), se determinó que el porcentaje de detección (sin cuantificación) de RNAm en cánceres de cavidad oral era de 1,4% (muestra de 142 pacientes).

Sin embargo, la literatura disponible en donde se detecta RNAm de E6/E7 de lesiones papilomatosas con presencia de genotipos de alto riesgo oncogénico es escasa. En un estudio realizado por Stoddard en 2015, se estudió la actividad transcripcional de los oncogenes de VPH E6/E7 en lesiones denominadas papilomas invertidos a través de hibridación *in situ* en un estudio retrospectivo de muestras parafinadas (Stoddard D et al, 2015). Se seleccionaron 19 muestras parafinadas de papiloma invertido localizado en seno maxilar y se les realizó la prueba de hibridación *in situ* para RNAm E6/E7. De las muestras, 3 de ellas (19%) presentaron signos histopatológicos de malignidad. RNAm E6/E7 para VPH fue detectado en todas las muestras estudiadas, pero en la mayoría (58%) se detectó en menos del 1% de las células estudiadas. Se realizó identificación para 18 genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, de las cuales, ninguna resultó positiva, por lo que no fue posible conocer a que genotipo pertenecía el porcentaje de presencia de RNAm E6/E7.

En nuestro estudio, se seleccionaron aquellas muestras que presentaron genotipos VPH 16 y 18 por ser los genotipos de alto riesgo oncogénico más prevalentes encontrados en la literatura, VPH 6 y 11 genotipos de bajo riesgo oncogénico más prevalentes encontrados en la literatura y VPH 52 y 56 por ser los que con mayor frecuencia se encontraron en los pacientes estudiados. Se observó expresión de RNAm para E6/E7 en VPH 18, VPH 6 y VPH 11 y para E2 en VPH 6 y VPH 11. No es posible descartar expresión de RNA de E2 y E6/E7 para los otros genotipos estudiados ya que las curvas de amplificación obtenidas no fueron concluyentes.

El uso de muestras parafinadas para obtener RNAm siempre es menos sensible que obtener RNA directamente de la muestra fresca, sin embargo, por el pequeño tamaño de la lesión y la necesidad de contar con una muestra adecuada para el estudio histopatológico, no fue posible obtener el RNA directamente de la muestra fresca. Además, una falencia de este estudio fue la carencia de la cuantificación del RNA obtenido debido a la interferencia del método de extracción en la cuantificación espectrofotométricamente del ácido nucleico. Así todas las reacciones de transcripción inversa se hicieron con un volumen de 10ul del producto extraído, lo cual, implica que las reacciones de amplificación podrían tener una baja cantidad de DNAc y no ser detectable el RNAm por cantidad más que por su ausencia.

A pesar de ello, en todas las muestras se obtuvo señal positiva para el RNAm de B2M, gen celular, es decir se obtuvo RNA. Sin embargo, hubo muestras cuya amplificación fue muy tardía, sugiriendo que la cantidad de RNA debió ser muy baja y esto debió indudablemente interferir en la detección de los RNAm en dichas muestras. Así, muestras que eran positivas para los genotipos 56 y 16 presentaron una curva muy baja de B2M, lo cual implicaría una baja recuperación de RNA y podría ser la una de las causas de la no detección.

Por otro lado, las muestras con los genotipos VPH 6 y VPH 11 presentaron curvas de amplificación con Ct muy altas sugiriendo que estos genotipos tendrían una mayor actividad transcripcional en esas muestras. Así en nuestro estudio, la mayor actividad fue en los genotipos de bajo riesgo.

Es interesante destacar que la muestra 046-2013 presentaba los genotipos 52 y 11, sin embargo, sólo se logró detectar los RNAm de E2 y E6/E7 de VPH11 y no de VPH52, lo cuál puede deberse a una actividad transcripcional disminuida de VPH52 o una interferencia viral entre ambos genotipos.

Esta interferencia también puede haberse producido en la muestra 070-2014, donde sólo se detectó RNAm de VPH18 y no VPH16. En el caso de la detección de E6/E7 de VPH18 y la no detección de E2, puede estar asociada a la baja transcripción de E2 o tal vez a una etapa inicial de transformación, con integración del genoma viral, donde habitualmente se produce una ruptura del gen E2 y la pérdida de su expresión.

Otro factor importante relacionado con la muestra obtenida de tacos de parafina, y que puede influir en la detección de la actividad transcripcional es que la extracción de ese RNA está sujeto a la sección del corte del taco. Los cortes proveídos pueden no haber contenido un sector del tejido con mayor expresión de los RNAm, no es un barrido de todas las secciones. Poder realizar el estudio en todo el tejido puede mejorar la detección del RNAm. En el caso de los genotipos, la muestra fue de cepillado de la lesión y abarcó toda la zona siendo factible detectar los genotipos. En la detección del RNA por la técnica utilizada, solo es una proporción del tejido y se puede perder información.

GENOTIPOS DE VPH DE ALTO RIESGO ONCOGÉNICO Y FACTORES DE RIESGO: La introducción masiva de la Terapia antiretroviral (TARV) en los pacientes VIH/SIDA ha producido un aumento en las lesiones papilomatosas asociadas a VPH., sin embargo, a pesar del establecimiento de TARV como un factor importante que influye en el desarrollo de lesiones orales asociadas a VPH, a la fecha, no existe evidencia científica suficiente para concluir que este tipo de terapia podría ser un factor de riesgo para el desarrollo y progresión de estas lesiones (Anaya-Saavedra G et al, 2013).

En nuestro estudio, la totalidad de los pacientes se encuentran bajo TARV, lo que lógicamente, aumenta sus expectativas de vida. En relación a este hecho, el promedio de tiempo de evolución de VIH de los pacientes enrolados fue de 4,8 años y el tiempo promedio de uso de TARV fue de 3,7 años (Tabla 9).

Si bien el uso de este tipo de terapia prolonga la expectativa de vida de estos pacientes (Anaya-Saavedra G et al, 2013), la inmunosupresión ya instalada por VIH no alcanza a ser revertida por el uso de TARV, y es por esta razón que el beneficio de este tipo de terapia es limitado sobre las lesiones producidas por VPH (Anaya-Saavedra G et al, 2013). Cabe señalar que los pacientes masculinos con mayor edad fueron los que presentaron un tiempo más prolongado de TARV en conjunto con mayor cantidad de genotipos detectados en la lesión papilomatosa. A pesar de este hallazgo, no hay correlación con su estado inmunológico pues fueron los que presentaron a su vez un mayor recuento de LT CD4.

En nuestro estudio, aunque encontramos una asociación de infecciones múltiples por VPH con mayor tiempo de uso de TARV, no se asocia a un estado más inmunodeprimido. Obviamente por el reducido número de individuos, esto debe analizarse en más casos. Resultaría interesante realizar un estudio de cohorte en la población de estudio evaluando una posible reaparición de las lesiones orales por VPH y la capacidad de eliminar el virus de acuerdo al estado inmunológico del paciente.

Con respecto a otros factores asociados independientes del estado inmunológico del paciente VIH/SIDA, existe una mayor prevalencia de VPH oral en pacientes con hábito tabáquico activo, lo que se debe principalmente a la persistencia de la infección más que a la posibilidad de infectarse *denovo* o de una reactivación de VPH (Beachler D et al, 2014). En relación al consumo de alcohol, no existen resultados concluyentes en la literatura. En los pacientes del estudio, solamente dos tenían un consumo importante de cigarros y uno de alcohol, por lo que no es posible contrastar los datos con los de la literatura (Tabla 11).

Con respecto a los hábitos sexuales, se postula que el VPH oral podría transmitirse a través de relaciones oro-genitales y orales-orales (Dahlstrom et al, 2014). Existen reportes que indican que existe una mayor prevalencia de VPH oral en hombres Heterosexuales/Bisexuales en comparación con hombres Homosexuales, sugiriendo que la vía genital vaginal-oral sería un mecanismo de infección importante (Muller K et al, 2015).

En nuestro estudio, de todos los pacientes que presentan al menos un genotipo de VPH de alto riesgo oncogénico, un 50% corresponden a hombres homosexuales, mientras que un 33,35% son hombres heterosexuales y el resto corresponde a una mujer heterosexual (Tabla 12)

Desde el momento de notificación de VIH, un 66,6% de los pacientes ha optado por la abstinencia sexual, mientras que el resto de los pacientes mantiene relaciones sexuales genitales/anales en un 100% con protección a través de preservativo, y un 50% (1 caso) refiere practicar relaciones sexuales orales sin protección alguna (Tabla 12). No se infiere ninguna asociación de la práctica sexual con el tipo y número de genotipos VPH de alto riesgo.

En el estudio de Beachler (Beachler et al, 2014) se observó un importante número de nuevas infecciones por VPH en la cavidad oral en personas que declararon no tener ninguna forma de actividad sexual en el periodo de la investigación. En esos pacientes abstinentes sexualmente, existía una fuerte asociación entre VPH oral e inmunosupresión. En nuestro estudio, en la totalidad de los pacientes homosexuales, el 75% de ellos tiene actividad sexual, mientras que el 67% del total de pacientes tienen abstinencia de cualquier práctica sexual desde el momento de notificación de VIH (Tabla 12). No es posible realizar una correlación de las nuevas infecciones debido a la carencia de un seguimiento de los pacientes.

Resulta difícil comparar los resultados obtenidos con los de la literatura, en primer lugar, por lo reducido de la muestra y en segundo lugar por las diferencias en los métodos de estudio y genotipificación de VPH. Realizar un estudio multicéntrico permitiría aumentar el número de casos y así poder realizar análisis estadísticos para no solamente describir factores de riesgo asociados, sino que poder asociarlos a las variables más importantes del estudio como el recuento de Linfocitos CD4 y la expresión de E2, E6/E7.

Si bien, el número de la muestra es reducido, la cantidad de pacientes que presentaron genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico justifica la necesidad de seguir investigando para poder establecer la necesidad de instalar la genotipificación de VPH en poblaciones vulnerables como parte del protocolo de estudio y tratamiento de lesiones papilomatosas de la cavidad oral.

Es necesario aumentar el número de casos ya sea realizando un estudio multicéntrico o reclutando nuevos pacientes del hospital. Esto permitiría aumentar la muestra y así poder realizar análisis estadísticos para no solamente describir factores de riesgo asociados, sino que poder asociarlos a las variables más importantes del estudio como el recuento de Linfocitos T CD4 y la expresión de E2, E6/E7. Además, estudios de seguimiento permitirían realizar asociaciones de persistencia de la infección de VPH con los distintos factores analizados.

En relación a la toma de muestra para genotipificación y detección de RNAm de proteínas oncogénicas como E6/E7, debería hacerse en base a muestra fresca para asegurar una carga viral de VPH que permita hacer la detección del genoma y su genotipificación, así como también, la detección de RNAm sin los elementos que dificultan el análisis que presentan los tacos parafinados.

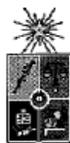
Con respecto a la genotipificación, sería interesante incluir aquellos genotipos de VPH que están más frecuentemente reportados en la literatura como VPH 32.

CONCLUSIONES

- Las lesiones papilomatosas detectadas en los pacientes con VIH/SIDA del hospital San Juan de Dios fueron de tipo papiloma escamoso y existió una mayor frecuencia de infección múltiple por VPH incluyendo, por lo menos un genotipo de VPH de alto riesgo oncogénico.
- El genotipo de VPH de alto riesgo oncogénico más frecuente fue VPH 52 seguido de VPH 16 y VPH 56. VPH 52 se presentó como infección única, sin otros VPH de alto riesgo oncogénico.
- El recuento promedio de linfocitos T CD4 de aquellos pacientes que presentaron al menos un genotipo de alto riesgo oncogénico indica una inmunosupresión moderada.
- En lesiones con los genotipos VPH6 y VPH11 había actividad transcripcional dada por la detección de RNAm de E2 y E6/E7. Esto sugiere una activa replicación de estos virus en esas lesiones y serían responsables del efecto clínico observado.
- No se detectó actividad transcripcional de genotipos de alto riesgo, excepto en VPH18, posiblemente por estar en un estado latente, sin replicación activa o existir una baja concentración de RNAm virales en dichas muestras.
- Se requiere futuros estudios con un número mayor de pacientes y seguimiento para establecer asociaciones con otros factores no virales y la posibilidad de la persistencia de la infección por VPH de alto riesgo oncogénico.

ANEXO 1

1/2



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 05 de Marzo 2015.

05 MAR. 2015



PROYECTO: "EXPRESIÓN GÉNICA DE E6/E7 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE TIPO ONCOGÉNICO EN LESIONES PAPILOMATOSAS ORALES DE PACIENTES VIH/SIDA".

INVESTIGADOR RESPONSABLE: SRTA. FRANCISCA DONOSO HOFER.

INSTITUCIÓN: PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON MENCIÓN EN FISIOLÓGÍA. TUTOR: PROF. SANDRA AMPUERO, DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA MAXILOFACIAL, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

Con fecha 05 de Marzo de 2015, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada con fecha 04 de Marzo de 2015.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Teléfono: 9789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



**INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
 EN SERES HUMANOS**

05 MAR. 2015



NOMBRE	CARGO	RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Prof. Gina Raineri	Secretaria Ejecutiva	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dra. Lucia Cifuentes	Miembro	Sí
Prof. Nina Horwitz	Miembro	Sí
Dra. María Eugenia Pinto	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	No
Dra. Grisel Orellana	Miembro	Sí
Prof. M. Julieta González	Miembro	Sí

Santiago, 05 de Marzo de 2015.

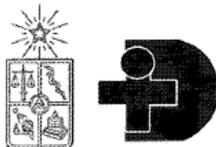
Prof. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

GRB/mfp.
 Proy. N° 174-2014

Teléfono: 9789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl

ANEXO 1

Fecha Edición: ___/___/___



CONSENTIMIENTO INFORMADO

05 MAR. 2015

TÍTULO DEL PROYECTO: EXPRESIÓN GÉNICA DE E6/E7 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE TIPO ONCOGÉNICO EN LESIONES PAPILOMATOSAS ORALES DE PACIENTES VIH/SIDA

Investigador principal: **Francisca Donoso Hofer**
Sede del estudio: **Servicio de Cirugía Máxilofacial, Hospital San Juan de Dios.**
Direccion: **Av. Portales 3239, Santiago.**
Patrocinador: **ICBM, Facultad de Medicina, Univeridad de Chile
Facultad de Odontología, Universidad de chile.
Hospital san juan de dios**

INVITACION A PARTICIPAR: Lo estamos invitando a participar en el proyecto de investigación **EXPRESIÓN GÉNICA DE E6/E7 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE TIPO ONCOGÉNICO EN LESIONES PAPILOMATOSAS ORALES DE PACIENTES VIH/SIDA** debido a que para nosotros es muy importante el estudio de las lesiones papilomatosas y su probable rol en el cáncer oral. Antes de participar, es necesario que se le informe acerca de este estudio y resuelva todas las dudas que usted tenga al respecto. Ese proceso se conoce como **CONSENTIMIENTO INFORMADO**. Una vez que haya comprendido la Investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formulario.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACION: Esta investigación tiene como objetivo determinar cuáles son los tipos de virus papiloma presentes en las lesiones papilomatosas intraorales de pacientes VIH/SIDA y además, conocer si en estas lesiones existen unos genes que podrían hacer que las lesiones fueran malignas.



BENEFICIO DE LA INVESTIGACION: Acepte o no acepte ser parte del estudio, usted tendrá el beneficio de poder someterse al examen para saber qué tipo de Virus papiloma tiene y si hay presencia de los genes que podrían malignizar la lesión. De esta manera usted podrá conocer las maniobras preventivas y los exámenes a los que debe someterse para disminuir el riesgo de malignización de las lesiones o la aparición de una nueva lesión. Si usted acepta, los datos recabados de su examen podrán ser utilizados para aumentar el conocimiento existente sobre su enfermedad, contribuyendo con el tratamiento de otros pacientes.

05 MAR. 2015

RIESGOS: Usted no presentara ningún riesgo al someterse a este estudio, ni físico ni emocional.

TIPO DE PROCEDIMIENTO: Usted no será sometido a ningún procedimiento extra, ya que todo es parte de la atención que el Servicio de Cirugía Maxilofacial debe otorgarle por ser paciente de nuestro servicio de salud, y consiste en cepillar la lesión de manera suave y luego enviar el cepillo para ser analizado. Además, es necesario efectuar una biopsia de la lesión porque siempre es importante saber cuál es el diagnóstico definitivo. En el caso de tener virus papiloma presente en la lesión, la muestra será analizada para determinar si existen genes que podrían malignizar su lesión. Ese análisis será realizado en la Facultad de medicina de la Universidad de Chile.

COMPLICACIONES: Usted podría presentar complicaciones derivadas del proceso quirúrgico (Biopsia), pero por esa razón será citado a un control 7 días después del procedimiento para retirar los puntos y evaluar la herida y 30 días después para darle el resultado de la biopsia y volver a controlar la herida. Si es necesario más controles, estos se realizarán de acuerdo de la evolución del proceso de reparación de la herida quirúrgica.

USO DE MUESTRAS: El material genético del virus extraído de las muestras así como también el material genético del paciente no serán utilizados en ningún otro estudio de otras características, como por ejemplo, no será utilizado para clonarlo a usted o a las lesiones ni tampoco para otros propósitos que los expresados en el objetivo del estudio.

COSTOS ECONOMICOS: Los procedimientos que se realizaran en este estudio son los mismos que se realizan como parte del protocolo de atención de TODOS los pacientes del Hospital, y el costo está asociado a la previsión de salud que cada paciente tenga. Participar en este estudio NO SIGNIFICA UN COSTO ECONOMICO EXTRA PARA USTED.

REMUNERACION: No recibirá pago alguno por participar en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD: Toda la información derivada de su participación en este estudio, será manejada con **estricta confidencialidad**. Solamente el investigador responsable (Francisca Donoso Hofer) tendrá acceso a la ficha de ingreso. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación no revelará su nombre o su RUT ya que se trabajará con un código asignado, ejemplo: Paciente 033-2013.



FOTOGRAFÍAS: Puede que usted presente alguna lesión en su boca que sea interesante para el estudio de registrar ya sea por su poca frecuencia o por las características que presente. Usted es libre de decidir si quiere que esta lesión sea fotografiada o no. Recuerde que solo será una fotografía de la lesión y en ningún caso de su rostro u otra zona que pueda revelar su identidad.

PERMANENCIA EN EL ESTUDIO: Su participación en el estudio es VOLUNTARIA, y usted podrá retirarse de él, cuando usted lo estime conveniente, sin tener que dar ninguna explicación. Si usted quiere retirarse del estudio, puede seguir atendiéndose en el servicio de Cirugía Máxilofacial o en el Servicio de Infectología del centro de salud donde usted se atiende regularmente.

DERECHOS DEL PARTICIPANTE: Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. En caso de cualquier duda puede acudir personalmente al Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital San Juan de Dios de Lunes a Viernes de 8.30 – 12.00 hrs o comunicarse el teléfono (2) 5741935 o al mail frandonoso@u.uchile.cl para gestionar una reunión con Francisca Donoso Hofer.

OTROS DERECHOS DEL PARTICIPANTE: En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del “Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos”, Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

CONCLUSIÓN: Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto **EXPRESIÓN GÉNICA DE E6/E7 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE TIPO ONCOGÉNICO EN LESIONES PAPILOMATOSAS ORALES DE PACIENTES VIH/SIDA**

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

RUT: _____ - _____ FECHA: ____/____/201__

FIRMA: _____

NOMBRE REPRESENTANTE: _____

RUT: _____ - _____ FECHA: ____/____/201__

FIRMA: _____



RELACION CON EL PACIENTE: _____

Autorizo la toma de fotografías de las lesiones que resulten relevantes para esta investigación para ser utilizadas con fines de la investigación misma o con fines académicos, siempre y cuando no se revele mi identidad.

_____ AUTORIZO _____ NO AUTORIZO

05 MAR. 2015

NOMBRE DEL PACIENTE (Tutor o representante legal) :

RUT: _____ - ____ FECHA: ____/____/201__

FIRMA: _____

NOMBRE REPRESENTANTE: _____

RUT: _____ - ____ FECHA: ____/____/201__

FIRMA: _____

RELACION CON EL PACIENTE: _____

Sección a llenar por el profesional que imparte el Consentimiento informado.

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente proporcionada por el Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

FIRMA PROFESIONAL QUE IMPARTE CI

Fecha: ____/____/201__

NOMBRE: _____

RUT: _____ -- _____

ANEXO 2



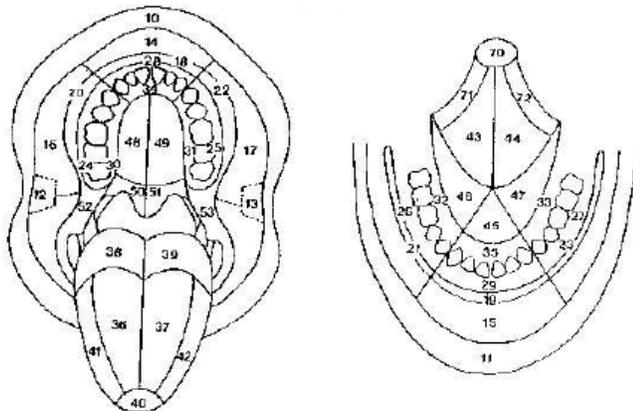
EXPRESIÓN GÉNICA DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE TIPO ONCOGÉNICO EN LESIONES PAPILOMATOSAS ORALES DE PACIENTES VIH/SIDA

CODIGO IDENTIFICADOR: _____ FECHA INGRESO: _____ Edad: _____ años

GENERO: __ M __ F RECUENTO CD4+ _____ FECHA RECUENTO: _____

DESCRIPCIÓN CLÍNICA LESIÓN PAPILOMATOSA:

LOCALIZACION LESIONES



FECHA GENOTIPIFICACION: / / 201 GENOTIPO: _____

FECHA BIOPSIA: / / 201 RESULTADO HISTOPATOLOGICO: _____

COMENTARIOS: _____

ANEXO 3

MINISTERIO DE SALUD
SERVICIO DE SALUD M. OCCIDENTE
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS
UNIDAD DE INVESTIGACION Y DESARROLLO
(DR. JMN/SR. EDV)

EXENTA N°: **2187**

Santiago, **27 ABR. 2015**

VISTO: 1.- La solicitud de fecha 20 de marzo de 2015, presentada por la Dra. **FRANCISCA SOFÍA DONOSO HOFER**, Cirujano Dentista, de la Universidad de Chile, RUT: 14.145.036-0, profesional que se desempeña en el Servicio de Cirugía Máxilofacial en el Hospital San Juan de Dios, dirigida al Director del Hospital San Juan de Dios, a fin que se le autorice en su calidad de Directora Responsable, la ejecución de la investigación científica en el establecimiento, denominada **“EXPRESIONES GÉNICAS DE E6/E7 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO DE TIPO ONCOGÉNICO EN LESIONES PAPILOMATOSAS ORALES DE PACIENTES VIH/SIDA.”** La que se enmarca en el contexto de su tesis del Magister en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, cuya hipótesis plantea que “los pacientes VIH/SIDA presentan múltiples genotipos de VPH en una lesión, con tipos predominantes de alto riesgo oncogénico y mayor cantidad de RNAM E6/E7”; **2.-** Los antecedentes mencionados por la Directora Responsable de la investigación científica biomédica en Seres Humanos, en el **“FORMULARIO “B” PRESENTACION DE ESTUDIOS CLINICOS EN EL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS POR INTERESADOS QUE NO SON INDUSTRIA FARMACEUTICA”**, presentados con fecha 20 de marzo de 2015; **3.-** La declaración formulada por la investigadora en su carta a la Dirección del Hospital de fecha 20.03.2015, en cuanto **“Me comprometo a cumplir las normas administrativas del Hospital y las disposiciones de la Ley N°20.120 y su reglamento, asimismo, a lo establecido en Resolución Exenta N° 5962 de 13.11.2014 de la Dirección del Hospital San Juan de Dios que establece los requisitos y condiciones para la presentación de proyectos de investigación científicas. Junto a lo anterior me comprometo a respetar las pautas éticas de acuerdo a lo estipulado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, entidad que aprobó la investigación”**; **4.-** Copia del documento de Consentimiento Informado, versión oficial única 2015, insertas en el proyecto de tesis del Magister en Fisiopatología de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile; **5.-** Copia de la comunicación remitida de 05 de Marzo de 2015, del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, a la investigadora Francisca Sofía Donoso Hofer en que se comunica que el proyecto **“Expresiones Génicas de e6/e7 del Virus Papiloma Humano de Tipo Oncogénico en**

Lesiones Papilomatosas Orales de pacientes VIH/SIDA.”, fue aprobado el 05 de Marzo de 2015 con vigencia de un año; **6.-** Carta de fecha 20 de Marzo de 2015 de la Dra. Mirtha Landaeta Mendoza, Jefa de Servicio de Cirugía Máxilofacial del Hospital San Juan de Dios, manifestando conocer el proyecto de investigación y que no tiene reparos en la utilización de la toma de muestras, ya que no interfiere con la labor asistencial debido a que forma parte del proceso de diagnóstico de los pacientes del Servicio de Cirugía Maxilofacial; **7.-** Copia de los datos curriculares de los co-investigadores: Sandra Patricia Ampuero Llanos, Alejandro Enrique Ramírez Acharán; **8.-** Copia del Currículo Vitae de la Investigadora Responsable Francisca Sofía Donoso Hofer; **9.-** Lo previsto en las letras e) y f) del artículo 25 del D.L. N° 2763 y lo señalado en los artículos 22 y letra w) del artículo 23 del REGLAMENTO ORGANICO DE LOS ESTABLECIMIENTOS DE SALUD DE MENOR COMPLEJIDAD Y DE LOS ESTABLECIMIENTOS DE AUTOGESTION EN RED, dictado conforme al Decreto Supremo N° 38 de 2005 del Ministerio de Salud; **10.-** Lo previsto en la ley N° 19.628, Sobre Protección de la Vida Privada, de 28.08.1999, específicamente sobre acceso a bases de datos sensibles; **11.-** Lo dispuesto en la ley N° 20.120 y en el Decreto Supremo N° 114 de 19.11.2011, que Aprueba Reglamento de la ley N° 20.120, Sobre Investigación Científica en el Ser Humano, su Genoma, y prohíbe la Clonación Humana, especialmente en lo relacionado al consentimiento informado de los sujetos de una investigación científica; **12.-** La Resolución Afecta N° 0203 de 26 de marzo de 2015 de la Dirección del Servicio de Salud M. Occidente, mediante la cual se me designa Director Titular del Hospital San Juan de Dios; **13.-** La Resolución N° 1.600 de 30.10.2008, de la Contraloría General de la República que Fija Normas Sobre Exención del Trámite de Toma de Razón, dicto la siguiente:

RESOLUCIÓN:

- 1.- AUTORIZASE** a la **Dra. FRANCISCA SOFÍA DONOSO HOFER**, Especialista en Cirugía y Traumatología Bucal y Máxilofacial, RUT: 14.145.036-0, profesional que se desempeña en el Servicio de Cirugía Máxilofacial en el Hospital San Juan de Dios, en su calidad de Directora Responsable, para ejecutar **en el establecimiento**, la investigación científica biomédica denominada **“Expresiones Génicas de e6/e7 del Virus Papiloma Humano de Tipo Oncogénico en Lesiones Papilomatosas Orales de pacientes VIH/SIDA.”**, estudio correspondiente a la tesis de Magister en Fisiopatología en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile que esta realiza, autorización conjunta para los co-investigadores Sandra Patricia Ampuero Llanos y Alejandro Enrique Ramírez Acharán, individualizados en los datos curriculares contenidos en el proyecto; en los términos y condiciones que se indican en la presente resolución y en la normativa legal aplicable.
- 2.- Deberá darse estricto cumplimiento** por parte de la Directora Responsable como por los co-investigadores ya individualizados, a las normas

de la ley N° 19.628 sobre protección de la vida privada, especialmente en lo concerniente al acceso de datos sensibles de los sujetos de la investigación y al consentimiento informado de los mismos, a las normas de la ley N° 20.120 y la reglamentación correspondiente, en especial sobre el consentimiento informado de los sujetos de la investigación. La Directora Responsable y los co-investigadores deberán **observar diligentemente**, en la ejecución del estudio clínico, las recomendaciones internacionales de carácter científico y ético aplicables a investigaciones clínicas con personas humanas, es el caso de las normas CIOMS; las normas contenidas en la Declaración de Helsinki y demás normas contenidas en los tratados y convenios suscritos por Chile sobre Derechos Humanos.

3.- La Directora Responsable y los co-investigadores, deberán **informar** a la Unidad de Investigación y Desarrollo del Hospital San Juan de Dios, cualquier evento potencialmente riesgoso para los participantes en el estudio y de cualquier efecto adverso con la debida anticipación o en forma inmediata de advertirlo o de producirse.

4.- Todos los **gastos** que implique el desarrollo, aplicación y efectos de cualquier naturaleza del estudio, serán de cargo de la Directora Responsable y de los co-investigadores y en ningún caso del Hospital San Juan de Dios y/o del Servicio de Salud Metropolitano Occidente o del Estado de Chile.

5.- El **uso** de cualquier servicio, insumo o prestación con bienes o personal del Hospital San Juan de Dios, con ocasión o como consecuencia de la investigación, deberá ser pagado a éste según los precios y aranceles determinados o que deberá determinar la Subdirección Administrativa del establecimiento, sin perjuicio de las excepciones que en razón del interés público pudiera hacer la Dirección del establecimiento, lo que deberá constar expresamente.

6.- La Directora Responsable deberá **dar curso al proceso de consentimiento informado**, utilizando al efecto el formato autorizado en el Proyecto y por el Comité de Ético Científico, debiendo contar con la aceptación y la firma estampada en el protocolo de las personas que participen como sujetos de la investigación, o de sus representantes legales según el caso, **antes de efectuar cualquier acto de ejecución del estudio**. De acuerdo con las prescripciones de la ley N° 20.120, el Consentimiento Informado deberá estar autorizado por el o la Ministro de Fe designado (a) por la Dirección del Hospital. Será responsabilidad de la Directora Responsable de la investigación, informar cada vez al Ministro de Fe para que concurra a participar en el proceso de consentimiento informado.

7.- Al efecto anterior **se designa como Ministro de Fe** para el proceso de Consentimiento Informado a la **Dra. Maria de los Ángeles Fernández Toro**, del Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital San Juan de Dios, quien deberá **entregar** a la Unidad de Investigación y Desarrollo del Hospital, el texto de Consentimiento Informado de cada sujeto de la investigación inmediatamente después de haber actuado en cada caso, para su revisión y registro. Sin perjuicio de lo anterior, deberá informar oportunamente a la mencionada Unidad de todo evento en que no se respete el proceso de consentimiento informado en relación a la mencionada investigación.

8.- Todo **daño** que se produzca, a cualquiera de las personas participantes en el estudio clínico que por este acto se autoriza, será de responsabilidad de la Directora Responsable de la investigación y de los co-investigadores, cuando se refiera a su ámbito de responsabilidad.

9.- La Directora Responsable de la investigación, así como los co-investigadores, deberán **informar** a la Unidad de Investigación y Desarrollo Estratégico del Hospital San Juan de Dios, cualquier circunstancia que tenga significación biomédica que haya ocurrido, esté ocurriendo o potencialmente pueda preverse que ocurra con el uso o utilización de sustancias o procedimientos autorizados que se empleen en el estudio científico biomédico o respecto de cualquier variabilidad o cambio del protocolo o de cualquiera de las especificaciones que contienen los documentos acompañados en este trámite de autorización. Comunicación que se deberá hacer simultáneamente a todos los sujetos que participen en el estudio.

10.- La Directora Responsable, así como los co-investigadores, se obligan a informar a la Unidad de Investigación y Desarrollo el desarrollo y avances de la Investigación, tanto a requerimiento de dicha Unidad como de iniciativa propia en forma periódica.

11.- La Directora Responsable, así como cada co-investigador, deberán arbitrar las medidas para que los sujetos que participen en la investigación **se beneficien** de los potenciales éxitos de la misma, del mismo modo, deberán retribuir al Hospital San Juan de Dios con la transferencia de conocimientos que correspondan a los estándares éticos y científicos aceptados por la comunidad científica internacional a los médicos del establecimiento, en forma oportuna, amplia y documentada a fin que nuestros profesionales aprovechen el desarrollo científico y puedan aplicarlo a nuestra población.

12.- La Dirección del Hospital San Juan de Dios queda expresamente facultada por la Directora Responsable así como por los co-investigadores, para **suspender** y eventualmente, según el caso, **poner término** en forma unilateral al desarrollo de la investigación científica biomédica ya individualizada, de producirse el incumplimiento grave de la normativa ético-científica aplicable, a las normas administrativas o a lo dispuesto en la presente resolución, sin derecho a indemnización alguna para cualquiera de los investigadores o para cualquier tercero.

13.- Notifíquese la presente Resolución tanto a la Directora Responsable de la investigación como a los co-investigadores, ya individualizadas.

14.- El inicio de cualquier acto correspondiente a la investigación, **supondrá** que tanto la Directora Responsable cuanto los co-investigadores, han aceptado plena y totalmente lo dispuesto en la presente resolución.

15.- Las jefaturas del Hospital San Juan de Dios que estén vinculadas a las bases de datos que requiere la investigación, **deberán exigir** el pleno cumplimiento de la normativa legal que cautele los derechos de los pacientes a su intimidad, en especial respecto de sus datos sensibles y el acceso a los mismos.

ANOTESE Y COMUNIQUESE.



DR. JUAN MENDOZA NAVARRO
DIRECTOR
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS

TRANSCRITO FIELMENTE



SRA. ANGELICA NOVOA
MINISTRO DE FE

Distribución:

- Dirección HSJD.
- Dra. Francisca Donoso Hofer.
- Co-investigadores: Sandra Patricia Ampuero Llaños y Alejandro Enrique Ramírez Acharán.
- Unidad de Investigación y Desarrollo HSJD.
- Dra. Mirtha Landaeta Mendoza. Jefa Cirugía Máxilofacial HSJD.
- Dra. Maria de los Ángeles Fernández Toro. Servicio de Cirugía Maxilofacial. Ministra de Fe.
- Of. de Partes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJILA V, SHETTY, BABU S, SHETTY V, HEGDE S (2015). Human Papilloma Virus Associated Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Sex Transm Dis.*2015;2015:791024. doi: 10.1155/2015/791024.

ANAYA-SAAVEDRA G, FLORES-MORENO B, GARCÍA-CARRANCÁ A, IRIGOYEN-CAMACHO E, GUIDO-JIMENEZ M, RAMIREZ-AMADOR V (2013). HPV oral lesions in HIV-infected patients: The impact of long term HAART. *JorolPathol Med.* 42:443 – 449.

ANG KK, STURGIS EM (2012). Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *SeminRadiatOncol* 22: 128 – 142.

ATTNER P, DU J, NASMAN A, HAMMARSTEDT L, RAMQVIST T, LINDHOLM J (2010). The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 126: 2879-2884.

BARON C, HENRY M, TAMALET C, VILLERET J, RICHET H, CARCOPINO X (2015). Relationship between HPV16, 18, 31, 33, 45DNA detection and quantitation and E6/E7mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. *J Med Virol.* 87(8):1389-96

BEACHLER D, D'SOUZA G. (2013). Oral HPV infection and head and neck cancers in HIV-infected individuals. *Curr opin Oncol.* 25 (5): 503 – 510

BEACHLER DC, D'SOUZA G, SUGAR EA, XIAO W, GILLISON ML.(2013). Natural history of anal vs oral HPV infection in HIV-infected men and women. *J Infect Dis.*15;208(2):330-9

BEACHLER D, ABRAHAM AG, SILVERBERG MJ, JING Y, FAKHRY C, GILL MJ, DUBROW R, KITAHATA MM, KLEIN MB, BURCHELL AN, KORTHUIS PT, MOORE RD, D'SOUZA G.(2014) Incidence and risk factors of HPV-related and HPV-unrelated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in HIV-infected individuals. *Oral Oncol.* 50(12):1169-76.

BEACHLER D, SUGAR E, MARGOLICK J, WEBER K, STRICKLER H, WILEY D, CRANSTON R, BURK R, MINKOFF H, REDDY S, XIAO W, GUO Y, GILLISON M, D'SOUZA G (2015). Risk Factors for Acquisition and Clearance of Oral Human Papillomavirus Infection Among HIV-Infected and HIV-Uninfected Adults *Am J Epidemiol.* 1;181(1):40-53.

BODILY J, LAIMINS L (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in Microbiology*, 19 (1): 33 – 39.

CAMERON JE, HAGENSEE ME (2008) Oral HPV complications in HIV-infected patients. *Curr HIV/AIDS Rep.* 5(3):126-31.

CAMPISI G (2007). Human Papillomavirus: Its identikit and controversial role i oral oncogenic, premalignant and malignant lesions (Review). *Int J Oncol*, 30: 813-823.

COMBES JD, FRANCESCHI S (2014). Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol.* 50(5):370-9

CHANG F (1991). Human Papilloma virus infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med*, 20: 305 - 310.

CHATURVEDI AK, ENGELS EA, ANDERSON WF (2008). Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.*26(4):612–619.

DAHLSTROM KR, BURCHELL AN, RAMANAKUMAR AV, ET AL (2014) . Sexual transmission of oral human papillomavirus infection among men. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 23:2959–64.

DARWICH L, CAÑADAS MP, VIDELA S, COLL J, MOLINA-LÓPEZ RA, COBARSÍ P, SIRERA G, CLOTET B (2014) Oral human papillomavirus type-specific infection in HIV-infected men: a prospective cohort study among men who have sex with men and heterosexual men. *ClinMicrobiolInfect.* 20(9):O585-9.

DE MARCO L, GILLIO-TOS A, BONELLO L, GHISSETTI V, RONCO G, MERLETTI F.(2007). Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *Journal of clinical virology*, 38(1):7-13

DE VILLIERS EM. (2013) Cross-roads in the classification of the papillomaviruses. *Virology* 44S: 2 – 10.

DICKSON EL, VOGEL RI, BLISS RL, DOWNS LS JR (2013) Multiple-type human papillomavirus (HPV) infections: a cross-sectional analysis of the prevalence of specific types in 309,000 women referred for HPV testing at the time of cervical cytology. *Int J Gynecol Cancer*.23(7):1295-302.

DOORBAR J (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*. 32S: S7 – S15.

DOORBAR J, QUINT W, BANKS L, BRAVO I, STOLER M, BROKER T, STANLEY M (2012) The biology and Life-cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 30S F55 – F70.

D'SOUZA G, FAKHRY C, SUGAR EA, SEABERG EC, WEBER K, MINKOFF HL, ANASTOS K, PALEFSKY JM, GILLISON ML (2007) Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer*. 121(1):143-50.

FAKHRY C, GILLISON ML. (2006) Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol*.10;24(17):2606-11

FATAHZADEH M, SCHLECHT NF, CHEN Z, BOTTALICO D, MCKINNEY S, OSTOLOZA J, DUNNE A, BURK RD (2013). Oral human papillomavirus detection in older adults who have human immunodeficiency virus infection *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 115(4):505-14

GILLISON ML, BROUTIAN T, PICKARD RK, TONG ZY, XIAO W, KAHLE L, GRAUBARD BI, CHATURVEDI AK (2012) Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 15;307(7):693-703

GREENSPAN D (2001). Effect of highly active antiretroviral therapy on frequency of oral warts. *Lancet*, 357: 1411 - 1412.

HÄFNER N, DRIESCH C, GAJDA, JANSEN L, KIRCHMAYR R, RUNNEMAUM IB, DURST M. (2008). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene* (27):1610 – 1617.

KELLOKOSKI J, SYRJÄNEN S, SYRJÄNEN K, YLISKOSKI M (1990). Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. *J Oral Pathol Med.* 19(3):142-8.

KERO K, RAUTAVA J, SYRJÄNEN K, GRENNAN S, SYRJÄNEN S (2012). Oral mucosa as a reservoir of human papillomavirus: point prevalence, genotype distribution, and incident infections among males in a 7-year prospective study. *Eur Urol.*62(6):1063-70

KING MD, REZNIK DA, O'DANIELS CM, LARSEN NM, OSTERHOLT D, BLUMBERG HM. (2002) 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.* 1;34(5):641-8

KLEIN SL (2000) The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *NeurosciBiobehav Rev.*24(6):627–638

SCHEFFER K, BERDITCHEVSKI F, FLORIN L (2014). The Tetraspanin CD151 in Papillomavirus Infection. *Viruses.* 6(2), 893-908

KREUTER A&, WIELAND U (2009) Human papillomavirus-associated diseases in HIV-infected men who have sex with men. *Curr Opin Infect Dis.* 22(2):109-14.

KREIMER A. R. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, (14) 467-475.

KREIMER AR, JOHANSSON M, WATERBOER T, KAAKS R, CHANG-CLAUDE J, DROGEN D, TJØNNELAND A, OVERVAD K, QUIRÓS JR, GONZÁLEZ CA, SÁNCHEZ MJ, LARRAÑAGA N, NAVARRO C, BARRICARTE A, TRAVIS RC, KHAW KT, WAREHAM N, TRICHOPOULOU A, LAGIOU P, TRICHOPOULOS D, PEETERS PH, PANICO S, MASALA G, GRIONI S, TUMINO R, VINEIS P, BUENO-DE-MESQUITA HB, LAURELL G, HALLMANS G, MANJER J, EKSTRÖM J, SKEIE G, LUND E, WEIDERPASS E, FERRARI P, BYRNES G, ROMIEU I, RIBOLI E, HILDESHEIM A, BOEING H, PAWLITA M, BRENNAN P (2013). Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer. *J ClinOncol.* 20;31(21):2708-15

KRÜGER M, PABST AM, WALTER C, SAGHEB K, GÜNTHER C, BLATT S, WEISE K, AL-NAWAS B, ZIEBART T. (2014). The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: A retrospective analysis of 88 patients and literature overview. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 42:1506 – 1514.

KUMARASWAMY KL (2011). Human Papiloma virus and oral infections: An update. *J Cancer research and Therapeutics*, 7(2): 120 - 127.

LASSEN P, ERIKSEN JG, HAMILTON-DUTOIT S, TRAMM T, ALSNER J, OVERGAARD J (2009) Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J ClinOncol* .27: 1992-1998.

LINDH M, GÖRANDER S, ANDERSSON E, HORAL P, MATTSBY-BALZER I, RYD W (2007). Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *J ClinViro*. 40(4):321-4

LINGEN MW, XIAO W, SCHMITT A, JIANG B, PICKARD R, KREINBRINK P, PEREZ-ORDONEZ B, JORDAN RC (2013). Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 49(1):1-8

MCLAUGHLIN-DRUBIN M, MEYERS J, MUNGER K. (2012). Current opinion in *Virology* (2) 459466.

MILLER, C & JOHNSTONE B. (2001). 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*, 91: 622 - 635.

MOLIJN A, KLETER B, QUINT W, VAN DOOR LJ (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of clinical virology* 32S: S43-S51.

MULLER K, KAZIMIROFF J, FATAHZADEH M, SMITH R, WILTZ M, POLANCO J, GROSSBERG R, BELBIN T, STRICKLER H, BURK R, SCHLECHT N (2015). Oral Human Papillomavirus and Oral Lesions In HIV-positive and HIV-negative Dental Patients. *The Journal of Infectious Diseases*; 212:760–8

MUÑOZ N, BOSCH X, DE SANJOSE S, HERRERO R, CASTELLSAGUE X, SHAH V, SNIJDERS P, MEIJER C (2003). Epidemiologic Classification of Human

Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. N Engl J Med ;348:518-27.

MRAVAK-STIPETIĆ M¹, SABOL I, KRANJČIĆ J, KNEŽEVIĆ M, GRCE M (2013) Humanpapillomavirus in the lesions of the oralmucosaaccording to topography.PLoSOne.29;8(7):e69736

NDIAYE C, MENA M, ALEMANY L, ARBYN M, CASTELLSAGUÉ X, LAPORTE L, BOSCH FX, DE SANJOSÉ S, TROTTIER H(2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol. 15(12):1319-31

OLTHOF N, SPEEL EJ, KOLLIGS J,HAESEVOETS A,HENFLING M (2014). Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. Plos one. 9(2) e88718.

PATTON LL, (2000). Changing prevalence of oral manifestations of human immune-deficiency virus in the era of pretease inhibitor therapy. . Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod , 89:299 - 304.

PATTON LL (2013). Oral lesions associated with human immunodeficiency virus disease. Dent Clin North Am. 57(4):673-98.

PEITSARO P, JOHANSSON B, SYRJÄNEN S (2002) Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. JClinMicrobiol.40(3) :886-91

PRINGLE GA. The role of human papillomavirus in oral disease (2014) Dent Clin North Am. 58(2):385-99

RAUTAVA J, SYRJÄNEN, S. (2011). Human papillomavirus infection in the oral mucosa. JADA, 142 (8):905-914.

RAUTAVA J, SYRJÄNEN, S. (2012). Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol.*6 Suppl1:S3-15

RUBINSTEIN PG, ABOULAFIA DM, ZLOZA A (2014). Malignancies in HIV/AIDS: from epidemiology to therapeutic challenges. *AIDS.*20;28(4):453-65.

SAPP M, BIENKOWSKA-HABA M (2009). Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *Febs letter.* 276(24): 7206–7216).

SILVA, R., LEÓN, D., BREBI, P., ILI, C., ROA, J., & SÁNCHEZ, R. (2013). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev Chilena Infectol*, 30(2): 186 - 192.

SILLING S, KREUTER A, HELLMICH M, SWOBODA J, PFISTER H, WIELAND U (2012) Human papillomavirus oncogene mRNA testing for the detection of anal dysplasia in HIV-positive men who have sex with men. *J Clin Virol.* 53(4):325-31

SILVERBERG MJ, LAU B, ACHENBACH CJ, JING Y, ALTHOFF KN, D'SOUZA G, ENGELS EA, HESSOL NA, BROOKS JT, BURCHELL AN, GILL MJ, GOEDERT JJ, HOGG R, HORBERG MA, KIRK GD, KITAHATA MM, KORTHUIS PT, MATHEWS WC, MAYOR A, MODUR SP, NAPRAVNIK S, NOVAK RM, PATEL P, RACHLIS AR, STERLING TR, WILLIG JH, JUSTICE AC, MOORE RD, DUBROW R (2015). Cumulative Incidence of Cancer Among Persons With HIV in North America: A Cohort Study. *Ann Intern Med.*163(7):507-18

SPINILLO A, DAL BELLO B, ALBERIZZI P, CESARI S, GARDELLA B, ROCCIO M, SILINI EM (2009). Clustering patterns of human papillomavirus genotypes in multiple infections. *Virus Res.*142(1-2):154-9

STODDARD DG, KEENEY MG, GAO G, SMITH DI, GARCÍA JJ, O'BRIEN EK (2015). Transcriptional activity of HPV in inverted papilloma demonstrated by in situ hybridization for E6/E7 mRNA. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 152(4):752-8

SYRJÄNEN, KJ., PYRHONEN, S., SYRJÄNEN, S., & LAMBERG, M. (1983). Immunohistochemical demonstration of human papillomavirus antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg*, (21) 147 - 153.

SYRJÄNEN KJ, SHABALOVA I, NAUD P, DERCHAIN S, SARIAN L, KOZACHENKO V, ZAKHARCHENKO S, ROTELI-MARTINS C, NEROVJNA R,

LONGATTO-FILHO A, KLJUKINA L, TATTI S, BRANOVSKAJA M, BRANCA M, GRUNJBERGA V, ERZEN M, JUSCHENKO A, HAMMES LS, COSTA S, PODISTOV J, SYRJÄNEN S (2011). Co-factors of high-risk human papillomavirus infections display unique profiles in incident CIN1, CIN2 and CIN3. *Int J STD AIDS*. 2011 May;22(5):263-72

SYRJÄNEN, S. (2003). Human Papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol*, (192) 123 - 128.

SYRJÄNEN S (2011) Human Papillomavirus Infection and its Association with HIV. *Adv Dent Res*. 23(1): 84-89.

VÖLTER C, HE Y, DELIUS H, ROY-BURMAN A, GREENSPAN JS, GREENSPAN D, DE VILLIERS EM (1996) Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer*. 16;66(4):453-6

ZUR HAUSEN H, MEINHOF W, SCHEIBER W, BORNKAMM GW (1974). Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*; 13(5):650-6

ZUR HAUSEN, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, (2) 342–350.