

INSTITUTO NACIONAL DE  
SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

**PERSISTENCIA Y CARGA VIRAL ANAL DE VPH 16 Y  
18, EN UNA COHORTE DE HOMBRES QUE TIENEN  
SEXO CON HOMBRES Y QUE VIVEN CON VIH**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN  
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

P R E S E N T A

**I.B.T. CLAUDIA VICTORIA MEDINA GARCÍA**

COMITÉ DE TESIS:

DIRECTOR:  
DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ ALEMÁN.

ASESOR:  
DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2014.

---

## **Agradecimientos.**

A mis padres, familia y amigos que siempre me han acompañado en cada uno de mis proyectos. Especialmente agradezco a mi padre, quien aunque ya no está conmigo, siempre será mi razón para seguir adelante.

A mi jurado de tesis; gracias Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán, por todo lo que me ha enseñado y por el tiempo que ha dedicado para guiarme y ayudarme en la realización de este trabajo, y porque más que mi director de tesis, siempre ha sido un buen amigo; al Dr. Oscar Peralta Zaragoza y al Dr. Eduardo Guzmán Olea, por sus comentarios y observaciones durante la revisión de tesis.

Al Dr. Eduardo Lazcano Ponce por autorizar el empleo de las muestras biológicas y la base de datos de los participantes de la presente tesis. Así mismo, agradezco a las personas involucradas en la realización del estudio madre, el Dr. Jorge Salmerón, M. en C. Leticia Torres, Dra. Andrea González, Dr. Galileo Vargas, Dr. Guillermo Arenas, Lic. Yahir Zavaleta y el Lic. Juan Carlos Rodríguez.

Al Dr. Carlos Jesús Conde González por estar siempre al pendiente del desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Antonia Herrera Ortiz por el apoyo para el procesamiento de las muestras.

Finalmente, agradezco al CONACyT por hacer posible la realización de esta tesis, a través del apoyo económico que recibí durante la maestría.

---

## I. Índice

	Página
II. Introducción.	4
III. Marco teórico.	6
III.1 Virus del papiloma humano.	6
III.2 Infección por VPH.	7
III.3 Epidemiología.	9
III.4 Factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer.	12
-Coinfección por VIH.	12
-Persistencia de la infección por VPH.	13
-Respuesta inmune frente al VPH.	13
-Carga viral.	14
IV. Planteamiento del problema.	15
V. Hipótesis	15
VI. Justificación.	15
VII. Objetivo general.	16
VIII. Objetivos específicos.	16
IX. Materiales y Métodos.	17
IX.1 Población de estudio.	17
IX.2 Detección de VPH.	19
IX.3 Preparación de la muestra.	20
IX.4 Amplificación de VPH 16 y VPH 18.	20
IX.5 Detección.	21
IX.6 Cuantificación viral de VPH.	22
IX.7 Definición de variables.	23
IX.8 Análisis estadístico.	23
-Análisis de la cuantificación viral de VPH 16 VPH 18.	23
-Análisis de datos.	25
X. Resultados.	27
X.1 Prevalencia de VPH entre HSH.	27

---

X.2	Cuantificación viral.	28
X.3	Análisis descriptivo de la población.	34
X.4	Análisis bivariado.	36
X.5	Análisis multivariado.	41
XI	Discusión.	43
XII.	Conclusión.	51
XIII.	Perspectivas.	51
XIV.	Referencias.	52

---

## II. Introducción.

El virus del papiloma humano (VPH), pertenece a la familia *Papillomaviridae* tiene un genoma de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases (pb), infecta células epiteliales mediante contacto primario piel-piel a través de heridas del epitelio estratificado<sup>1-3</sup>. Estos virus se han clasificado en dos grupos, el grupo de bajo riesgo o no oncogénico asociados con el desarrollo de verrugas o papilomas, y el grupo de alto riesgo u oncogénicos causantes de cáncer cervical, anal, vaginal, vulvar o de pene<sup>4</sup> (entre los más comunes VPH 16 y 18).

En la mayoría de los individuos, las infecciones por VPH son transitorias y asintomáticas con la eliminación del virus en el 90% de los casos dentro de 1 o 2 años; el otro 10% puede presentar una infección persistente y un riesgo mayor de desarrollar cáncer<sup>2,5</sup>.

La replicación del virus se lleva a cabo a través de la diferenciación de los queratinocitos de la piel, bajo la expresión de proteínas del virus y del hospedero, generando infecciones de tipo latente o productivas<sup>1-3</sup>. La infección de tipo latente, ocurre predominantemente en células inmaduras (células basales o células metaplásicas) del epitelio escamoso, en esta etapa el ADN viral permanece dentro de la célula en forma circular o episomal sin replicarse, y la expresión de los genes E1 y E2 es mayor<sup>1,2</sup>. En las infecciones productivas o activas, la replicación viral se lleva a cabo principalmente en células escamosas ya diferenciadas, esto es, en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso, en donde ocurre una intensa actividad de replicación del ADN viral y una expresión mayor de los genes tardíos L1 y L2, y el gen temprano E4<sup>1,2,6</sup>.

La progresión a cáncer está asociada con la integración del genoma del VPH al genoma del hospedero, con pérdida o ruptura de E2, y la expresión de los oncogenes E6 y E7<sup>6</sup>, quienes promueven la desorganización del control del ciclo celular uniéndose a supresores de tumores como p53 y pRb<sup>2</sup>.

Las infecciones por VPH se han asociado al 99% de casos de cáncer cervicouterino, por otra parte, se ha observado un aumento en infecciones por VPH causantes de

---

enfermedades anales, como verrugas genitales y cáncer de células escamosas de ano<sup>7</sup>. El desarrollo de la infección en la región anal es parecido a la infección en el epitelio cervical, debido a la presencia de una zona de epitelio de transición similar a la zona de transformación del cérvix, sitio preferente de la infección por VPH<sup>8,9</sup>.

Los grupos de población que representan un mayor riesgo de contagio por VPH en la región anal, y por lo tanto de desarrollar lesiones precursoras a cáncer, son individuos que tienen contacto sexual ano-receptivo y que además tienen un sistema inmune debilitado, como los pacientes que recibieron un trasplante o personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>9</sup>.

Actualmente a nivel global se estima que la incidencia de cáncer anal es de 35 casos por 100,000 HSH (hombres que tienen sexo con hombres) VIH negativos, y que en HSH que son VIH positivos la incidencia es del doble (70 casos por 100,000)<sup>10</sup>; además, con la introducción de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARA), la incidencia de cáncer anal ha ido aumentando, posiblemente debido al incremento de las expectativas de vida de la población que vive con VIH<sup>9</sup>. La infección por VPH representa la principal causa de cáncer anal en HSH y que viven con VIH, sin embargo al igual que con el cáncer cervicouterino, existen otros factores que contribuyen al desarrollo de cáncer anal, tal como la infección por VIH, la carga viral de VPH, la evasión del sistema inmune y la infección persistente con tipos oncogénicos de VPH.

El objetivo del estudio fue determinar la carga viral de VPH 16 y 18 en muestras anales de una cohorte de HSH y que viven con VIH, e identificar su relación con la persistencia. Para ello se utilizó información y muestras del canal intra-anal, basales y de seguimiento, de HSH y que viven con VIH reclutados en un estudio de cohorte en la Clínica Condesa de la Ciudad de México. Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, fueron identificados los VPH tipo 16 y 18, y se cuantificó la carga viral. Finalmente, mediante análisis multivariado se identificó la asociación entre la persistencia y/o eliminación de la infección por VPH y datos clínicos de cada participante.

---

### III. Marco teórico.

#### III.1. Virus del papiloma humano (VPH).

El VPH es un virus de ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases, que pertenece a la familia *Papillomaviridae*<sup>1</sup>. Los papilomavirus son pequeños virus no envueltos que miden de 45-55 nm de diámetro, con una cápside icosaédrica de proteína formada en 95% por la proteína L1 y en un 5% por la proteína L2<sup>1,11</sup>.

El genoma del virus está dividido en tres regiones, una región temprana E (*Early*), la cual codifica para las proteínas virales E1, E2, E4, E5, E6 y E7, necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular; una región tardía L (*Late*), que codifica para proteínas estructurales de la cápside viral, L1 y L2; y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (*Long Control Region*), cuyas secuencias se encargan de la regulación de la expresión de sus genes, tanto de la región temprana como de la tardía<sup>1,12</sup>. Los productos de los genes E6 y E7 han sido los más estudiados, a causa de su interacción con los genes supresores de tumores p53 y pRb y su papel en la transformación celular, se denominan oncogenes o genes transformantes (Figura 1)<sup>1</sup>.

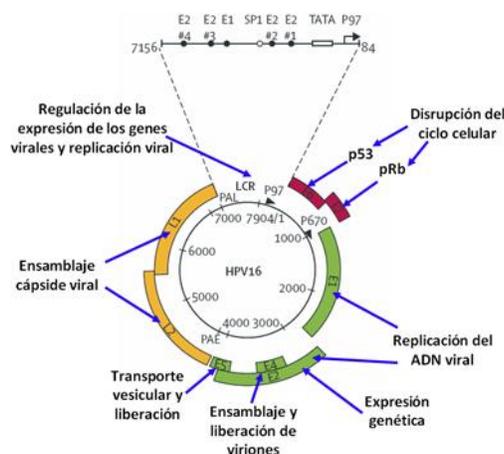


Figura 1. Genoma del virus del papiloma humano<sup>13</sup>.

---

Más de 100 tipos de VPH han sido identificados, de los cuales más de 40 tipos infectan el revestimiento epitelial del tracto genital y otras áreas mucosas<sup>5</sup>, y han sido clasificados en dos grupos, de bajo riesgo y de alto riesgo u oncogénicos, de acuerdo a su potencial para causar oncogénesis basado en una infección persistente<sup>2</sup>. El grupo de VPH de alto riesgo que incluye a los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82 y probablemente a los tipos 26, 53 y 66 son causantes de cáncer cervicouterino y otros tipos de cáncer como anal, vaginal, vulvar y de pene; mientras que el grupo de VPH de bajo riesgo asociados a ser causantes de verrugas o papilomas incluye a los tipos 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 66, 67, 70, 72, 73, 81, 82, 83, 84 y CP6108<sup>4</sup>.

### **III.2 Infección por VPH.**

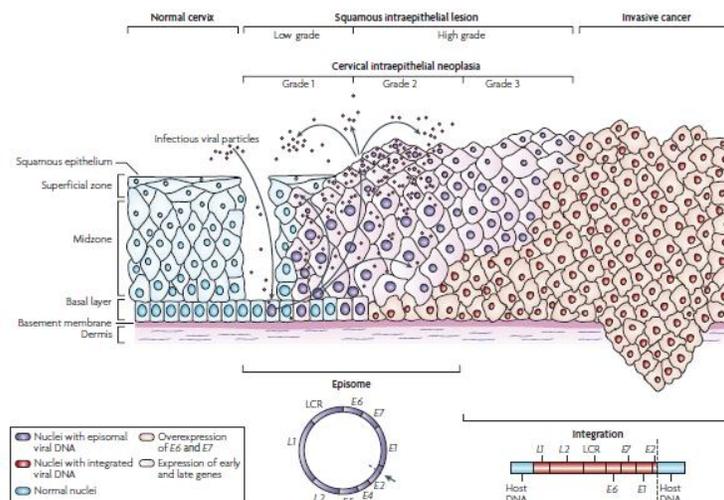
En la mayoría de los individuos las infecciones por VPH son transitorias y asintomáticas, con eliminación del virus en el 90% de ellos dentro de 1 o 2 años; el otro 10% tendrá una infección persistente y un riesgo mayor de desarrollar cáncer<sup>2,5</sup>. La infección por papilomavirus requiere que las partículas virales ingresen a la capa del epitelio basal y entren a los queratinocitos de la piel o mucosa, a través de heridas del epitelio estratificado. A medida que los queratinocitos infectados se diferencian, se produce la síntesis de ADN viral bajo el control de proteínas del hospedero y del virus<sup>2,3</sup>. Se pueden presentar dos tipos de infecciones: latentes o productivas<sup>1</sup>.

La infección de tipo latente ocurre predominantemente en células inmaduras (células basales o células metaplásicas) del epitelio escamoso. El ADN viral permanece dentro de la célula en forma circular o episomal sin replicarse. No hay cambios morfológicos en la citología (identificadas como displasias tempranas y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, LIEs), por lo que la detección viral en esta etapa sólo puede hacerse por métodos moleculares<sup>1,2</sup>. Para el mantenimiento del genoma viral episomal, se requiere la expresión de las proteínas E1 y E2; en células

basales, E2 es necesaria para iniciar la replicación del ADN viral y la segregación del genoma, su unión al ADN viral en la región no codificante es necesaria para el reclutamiento de la helicasa E1 al origen viral, la cual a su vez se une a las proteínas celulares que se necesitan para la replicación del ADN.

Al parecer el genoma viral se replica en las células basales con el ADN celular durante la fase S o de síntesis, por ello el papel de E2 en el anclaje de episomas virales a los cromosomas mitóticos es fundamental para la segregación correcta. En niveles bajos, E2 actúa como un activador transcripcional del promotor temprano viral (p97 en VPH 16; p99 en VPH31); mientras que en niveles altos reprime la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 mediante el desplazamiento del activador transcripcional SP1 de un sitio adyacente al promotor temprano<sup>3</sup>.

La actividad del gen E5 se observa en la infección temprana; su función es estimular el crecimiento celular formando un complejo con el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el receptor tipo 1 del factor estimulante de colonias, además de prevenir la apoptosis derivada del daño al ADN. Cuando el ADN viral episomal se integra al ADN de la célula hospedera en lesiones que progresan a cáncer, parte del genoma (incluida la secuencia codificante de E5) es eliminado, por lo que el gen E5 no es necesario en eventos tardíos de carcinogénesis mediada por VPH (Figura 2)<sup>14</sup>.



**Figura 2.** Progresión a cáncer cervicouterino mediado por VPH<sup>14</sup>.

---

En las infecciones productivas o activas, la replicación viral se lleva a cabo principalmente en células escamosas ya diferenciadas, esto es, en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso, en donde ocurre una intensa actividad de replicación del ADN viral, con producción de proteínas de la cápside y ensamblaje de nuevos viriones, los cuales producen cambios celulares característicos sobre las células infectadas (lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado).

L1 y L2 encapsulan el genoma viral para formar viriones en el núcleo, de este modo los virus liberados inician una nueva infección<sup>1,2,6</sup>. La progresión de lesiones no tratadas a cáncer microinvasivo e invasivo, está asociada con la integración del genoma del VPH a los cromosomas del hospedero, con pérdida o ruptura de E2, y una sobrerregulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7<sup>6</sup>.

El oncogen E6 se une con p53 induciendo la degradación de este gen supresor de tumores y de la proteína pro-apoptótica BAK, lo que resulta en resistencia a la apoptosis y un incremento en la inestabilidad de los cromosomas.

Por otro lado, E7 interactúa con pRb liberando el factor de transcripción E2F, lo que desencadena la transactivación de algunas proteínas celulares requeridas para la replicación del ADN viral tales como las ciclinas A y E, además de asociarse con otras proteínas involucradas en la proliferación celular, incluidas deacetilasas de histonas, componentes del complejo de transcripción AP1 y los inhibidores dependientes de ciclinas p21 y p27<sup>2,3,14</sup>.

Las proteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo tienen actividad transformante que resulta en la inmortalización de manera independiente o sinérgica de la célula<sup>2</sup>.

---

### III.3 Epidemiología.

La infección por VPH es la causa del 99% de los casos de cáncer cervicouterino, con una tasa de incidencia ajustada por edad a la población mundial (ASR (W)) de 14 casos por 100,000 mujeres a nivel mundial, tan solo por debajo del cáncer de mama (primera causa de muerte entre mujeres adultas)<sup>15,16</sup>. Sin embargo, al igual que en el cérvix, el VPH está relacionado con 2 enfermedades anales: los condilomas acuminados o verrugas genitales y el cáncer de células escamosas de ano<sup>7</sup>.

La infección por VPH en la región anal está implicada en el desarrollo de cáncer debido a la similitud biológica entre el cérvix y el ano con respecto a la localización preferida de la infección por VPH. La región anal presenta una zona de epitelio de transición similar a la zona de transformación del cérvix, además, la historia natural de la infección es semejante al cáncer cervicouterino el cual es precedido por una neoplasia intraepitelial cervical (grado $\geq$ 2), así como la neoplasia intraepitelial anal (grado $\geq$ 2) antecedente al cáncer anal<sup>8,9</sup>.

Los grupos de población que representan un mayor riesgo de contagio por VPH en la región anal, y por lo tanto de desarrollar lesiones precursoras a cáncer, son individuos que tienen contacto sexual ano-receptivo y que además tienen un sistema inmune debilitado, como los pacientes que recibieron un trasplante o personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>9</sup>.

Antes de la epidemia del VIH en el año 1981, se sabía que el carcinoma anal era más común en hombres que tenían sexo con hombres (HSH) que en la población general. Actualmente se estima que la incidencia de cáncer anal a nivel global es de 35 casos por 100,000 entre HSH que son VIH negativos, y que en HSH que son VIH positivos la incidencia es del doble (70 casos por 100,000)<sup>10</sup>.

---

Con la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA), la incidencia de cáncer anal ha ido aumentando, posiblemente debido al incremento de las expectativas de vida de la población que vive con VIH<sup>9</sup>.

La infección con múltiples tipos de VPH se ha encontrado en el 73% de hombres VIH positivos y en el 23% de hombres VIH negativos<sup>2</sup>. A nivel mundial, mediante una revisión sistemática de la literatura, se observó que la prevalencia de VPH en el cáncer anal invasivo fue de 71%; entre los infectados por VPH, el 85% de los pacientes fueron positivos para el VPH 16 y el 7% fueron positivos para el VPH 18. Otros tipos de VPH aislados incluyeron al VPH 31, 33 y 45. Los tipos de VPH 53, 58, 61 y 70 han sido aislados de muestras anales, pero han sido reportados raramente en muestras del cérvix<sup>2</sup>.

Se ha reportado que la prevalencia de VPH en cáncer anal invasivo fue más alto en Europa (80%), seguida de América del Norte (77%) y Asia (57%)<sup>10</sup>. En Estados Unidos, durante el periodo del 2004 al 2007, el cáncer de ano y recto en mujeres se asoció a VPH 16 y 18 en el 93.5% de dichos cánceres debido a infección por VPH; mientras que en hombres, se observó que en el 94% de los casos anuales se asociaba a VPH<sup>2</sup>.

En México, pocos han sido los estudios realizados para la detección de VPH en HSH y que son VIH positivos. En el año 2002 Villanueva *et al.* detectaron, mediante citología, que el 38.7% de un total de 31 HSH VIH positivos tenía infección por VPH, en comparación con una prevalencia de infección por VPH de bajo y alto riesgo en el 74.2% (23 fueron positivos para algún tipo de VPH), lo cual se identificó mediante la prueba de captura de híbridos<sup>17</sup>.

---

Por otro lado, mediante un estudio longitudinal de VPH en hombres durante el periodo del 2005-2009, se comparó la prevalencia de VPH anal y factores de riesgo en hombres VIH negativos que tienen sexo con hombres (HSH) y en hombres que tienen sexo con mujeres (HSM). En este estudio los individuos fueron reclutados de Brasil, México y EU; se detectó VPH en el canal anal en el 16% de los hombres incluidos, siendo de 4-10 veces mayor en HSH que HSM; el 33% de HSH presentó infección por múltiples tipos de VPH y en HSM se encontró infección múltiple en el 3.2%. La prevalencia de VPH 16 entre HSH fue dos veces mayor que en HSM (6.2% y 2.3%, respectivamente); los tipos más comunes de VPH en HSM fueron 16, 6 y 5, mientras que en HSH los tipos más comunes fueron 6, 16, 53 y 84.

Por análisis multivariado, se encontró que los factores de riesgo asociados con la detección de cualquier tipo de VPH y de cualquier tipo de VPH oncogénico en HSM, eran el número de parejas sexuales femeninas (0 o 2 parejas), la duración de relación con una pareja sexual primaria (1 o 10 años) y la historia de un diagnóstico de hepatitis B. Con respecto a los HSH, la edad (18-30 años y 45-70 años) fue inversamente asociado con la detección de cualquier tipo de VPH y cualquier tipo de VPH oncogénico; un mayor número de parejas sexuales anales (en comparación con 0 parejas) se asoció con la detección de tipos de VPH oncogénico y no oncogénicos<sup>18</sup>.

Finalmente, en otro estudio realizado en hombres VIH positivos y negativos con antecedentes de relaciones sexuales ano-receptivas reclutados en el Hospital General de México, se identificó una prevalencia de infección por VPH del 68% en un total de 44 pacientes. Se encontró que la infección por VIH representaba un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado. Se detectó un mayor número de lesiones de alto y bajo grado en pacientes VIH positivos (80% comparado con 65%)<sup>19</sup>.

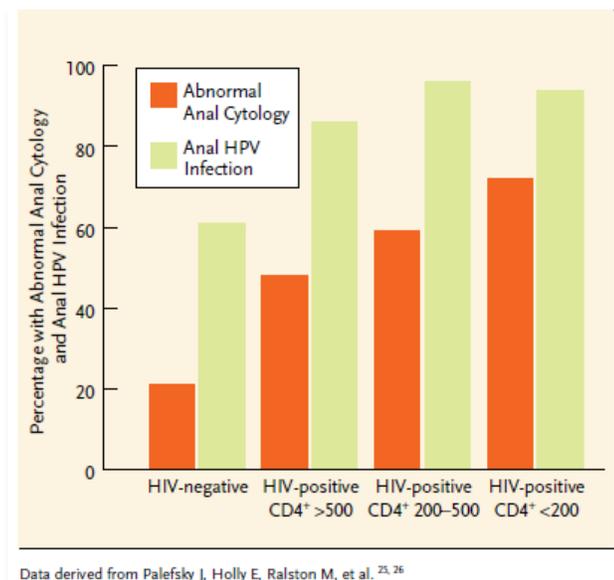
---

### III.4 Factores de riesgo asociados con el desarrollo a cáncer.

La infección por VPH representa la principal causa de cáncer anal en HSH y que viven con VIH, sin embargo al igual que con el cáncer cervicouterino, otros factores como la carga viral de VPH, la evasión del sistema inmune, la persistencia con tipos oncogénicos de VPH y la propia coinfección con el VIH contribuyen al desarrollo de cáncer anal.

- **Coinfección por VIH.**

En los pacientes con inmunosupresión debido al VIH, el riesgo de desarrollar neoplasias anogenitales de bajo y alto grado, se incrementa al disminuir el conteo de células CD4+ (Figura 3)<sup>8</sup>. Con el uso de antirretrovirales se aumentan las cifras de CD4+ y se favorece la reconstitución del estado inmunológico, sin embargo, parece que la reconstitución del estado inmunológico tiene un pobre efecto en la inmunidad específica contra el VPH, es decir, la regresión de las displasias de alto grado causadas por la infección por VPH y la progresión hacia cáncer, parecen no estar asociadas con el estado inmunitario<sup>7</sup>.



**Figura 3.** Porcentaje de HSH VIH positivos y HSH VIH negativos con infección anal y citología anal anormal<sup>8</sup>.

---

- **Persistencia de la infección por VPH.**

Una infección persistente de VPH oncogénico es considerada la causa de cáncer anal. Se define como persistencia a la detección del mismo genotipo de VPH en muestras consecutivas obtenidas en intervalos de 3 a 6 meses, sin embargo, cuando el genotipo de VPH involucrado en la población de estudio es prevalente, la reinfección con el mismo genotipo podría ocurrir simulando una infección persistente.

Esta detección del mismo genotipo podría resultar en una clasificación errónea de infecciones transitorias de VPH consecutivas como una infección persistente<sup>20</sup>. Aunque no se tienen datos sobre persistencia de VPH en cáncer anal, se podría considerar que es similar a la persistencia en infección del cérvix (10%), debido a la similitud en el desarrollo de la infección por VPH en ambos epitelios<sup>2</sup>. En una población de HSH de México, Brasil y EU, se encontró que la infección persistente por VPH 16 era de 5.1% del total de HSH incluidos<sup>21</sup>.

- **Respuesta inmune frente al VPH.**

La respuesta del sistema inmune frente a las proteínas virales tempranas que median la proliferación celular, está involucrada en la eliminación de infecciones por VPH, sin embargo, una supresión selectiva permite el desarrollo de neoplasias, tanto por predisposición a la infección con virus oncogénicos, como por el escape de las células neoplásicas a los mecanismos reguladores del huésped<sup>1,2</sup>.

Algunos estudios han demostrado que las células T citotóxicas podrían ser importantes para los oncogenes E6 y E7 del VPH. Las concentraciones de las células del sistema inmune (como células T CD4+, macrófagos, neutrófilos y *natural killer*) y la expresión de interferón-gamma, disminuyen en mujeres positivas a VIH que presentan neoplasias intraepiteliales cervicales, comparadas con mujeres VIH negativas<sup>22</sup>.

En infecciones persistentes por VPH, han evolucionado una serie de mecanismos para limitar la detección por el sistema inmune; entre ellos se encuentra la regulación

---

de la expresión de E-cadherina y la regulación de la concentración de células de Langerhans por E6, la interferencia de E5 con la presentación de antígenos por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y la interferencia con la función de la respuesta del interferón factor 3 por E7<sup>3</sup>. Además de tales regulaciones por los genes del virus, la evasión del sistema inmune se deriva del hecho de que el VPH no causa una infección lítica y no causa viremia, por lo que no hay inflamación ni activación del sistema inmune<sup>3</sup>.

- **Carga viral.**

Con respecto a la carga viral de VPH, se ha observado que en cáncer cervicouterino correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad, en donde las copias de ADN del VPH se encontraron en un intervalo de  $10^7$  copias por  $\mu\text{g}$  de ADN celular; el VPH tipo 16 presentó una carga viral mayor ( $10^8$  copias/ $\mu\text{g}$ ) incrementando con la severidad de anomalías epiteliales (de  $2.2 \cdot 10^7$  en pacientes con citología normal, a  $4.1 \cdot 10^7$  en neoplasias intraepiteliales cervicales grado I (NIC I) y  $1.3 \cdot 10^9$  copias/ $\mu\text{g}$  en pacientes con NIC III)<sup>23</sup>; sin embargo, existen datos que muestran una carga viral menor, de  $1.3 \cdot 10^3$  a  $4.5 \cdot 10^4$  copias de ADN de VPH/ng de  $\beta$ -globina en mujeres infectadas con VIH<sup>24,25</sup>.

En cáncer cervicouterino, varios estudios transversales han reportado un incremento en la carga viral al incrementarse la severidad de la enfermedad, por el contrario, otros estudios no encuentran asociación. La asociación entre una medida basal de la carga viral y la duración de la infección, la eliminación de la enfermedad y el subsecuente riesgo de adquisición o progresión de la enfermedad no ha sido determinada. Hay varias explicaciones que se sugieren para tales inconsistencias; mientras la prevalencia de la forma integrada de VPH incrementa al aumentar la severidad de la enfermedad, la integración es seguida por una disminución en la carga viral. Por último, se ha visto que la relación entre la carga viral y la enfermedad varía con el tipo de VPH, por ejemplo, en cáncer cervicouterino la carga viral de VPH 16 aumenta al incrementar la severidad de la enfermedad, mientras que para el VPH 18 no ocurre lo mismo<sup>6</sup>

---

#### **IV. Planteamiento del problema.**

El grupo mayormente afectado por el cáncer anal son personas que practican relaciones sexuales ano-receptivas, especialmente en HSH y que son VIH positivos, ya que la coinfección con este virus causa supresión de su sistema inmune. Aunque la prevalencia de cáncer anal, tanto a nivel global como en México es baja, se espera que incremente debido al uso de TARAA. La asociación que existe entre la carga viral de VPH en HSH y que son VIH positivos con respecto a la persistencia y/o eliminación de la infección, es un tema que ha adquirido interés debido al incremento de cáncer anal como consecuencia de infecciones por VPH de tipo oncogénico. Debido a esto, la pregunta de investigación del presente estudio es determinar si existe asociación entre la carga viral anal de VPH 16-18 y la persistencia de los genotipos en hombres que tienen sexo con hombres y que viven con VIH.

#### **V. Hipótesis.**

La carga viral elevada de VPH en la región anal es un factor de persistencia de la infección en comparación con aquellos que presentan una menor carga viral en una cohorte de HSH y que viven con VIH.

---

## VI. Justificación.

La incidencia de cáncer anal en HSH y que son VIH positivos, representa un problema de morbi-mortalidad a nivel global. En Estados Unidos, la causa de estos cánceres se asocia en un 90% a infecciones persistentes por VPH, a nivel global se estima que la prevalencia de VPH es de 71% en casos de cáncer anal<sup>2</sup>. En México, la prevalencia de VPH en el epitelio anal de HSH y que viven con VIH se ha encontrado en el 74.2% de los casos, por lo que estos individuos se encuentra en riesgo de desarrollar una lesión precancerosa o cáncer<sup>17</sup>.

Aproximadamente el 72% de los casos se debe a infecciones por VPH tipo 16 y 18, similar a los casos de cáncer cervicouterino<sup>10</sup>. Por otro lado, se ha visto que la carga viral de VPH en cáncer cervicouterino se relaciona directamente con la severidad de la enfermedad, sin embargo también hay datos que indican que VPH de alto riesgo son capaces de inducir tumores malignos aún con cargas virales bajas<sup>24</sup>.

Aunque la incidencia de cáncer anal entre hombres se encuentra en un intervalo de 0.1 a 2.8 casos por 100,000, en HSH y que viven con VIH, existe el doble de casos con respecto a HSH y que son VIH negativos (35 comparado con 70 casos por 100,000)<sup>17</sup>.

Antes de la epidemia de VIH, se estimó una incidencia de cáncer anal entre HSH de 12.5-36.9 casos por 100,000 hombres<sup>18</sup>. Sin embargo, con el uso de la TARAA de pacientes VIH positivos, el cual se ha observado que no confiere protección contra el desarrollo de cáncer anal, la incidencia de cáncer anal ha ido en aumento (de 11 a 128 casos por cada 100,000 persona<sup>2</sup>), debido quizá a que existe una mayor esperanza de vida.

Es por ello que la determinación de la asociación entre la carga viral y la persistencia del VPH en una cohorte de HSH que viven con VIH permitirá identificar un posible marcador asociado a la persistencia o eliminación de la infección por VPH.

---

## **VII. Objetivo general.**

Determinar la carga viral de VPH 16 y 18 en muestras anales de una cohorte de HSH y que viven con VIH e identificar su relación con la persistencia.

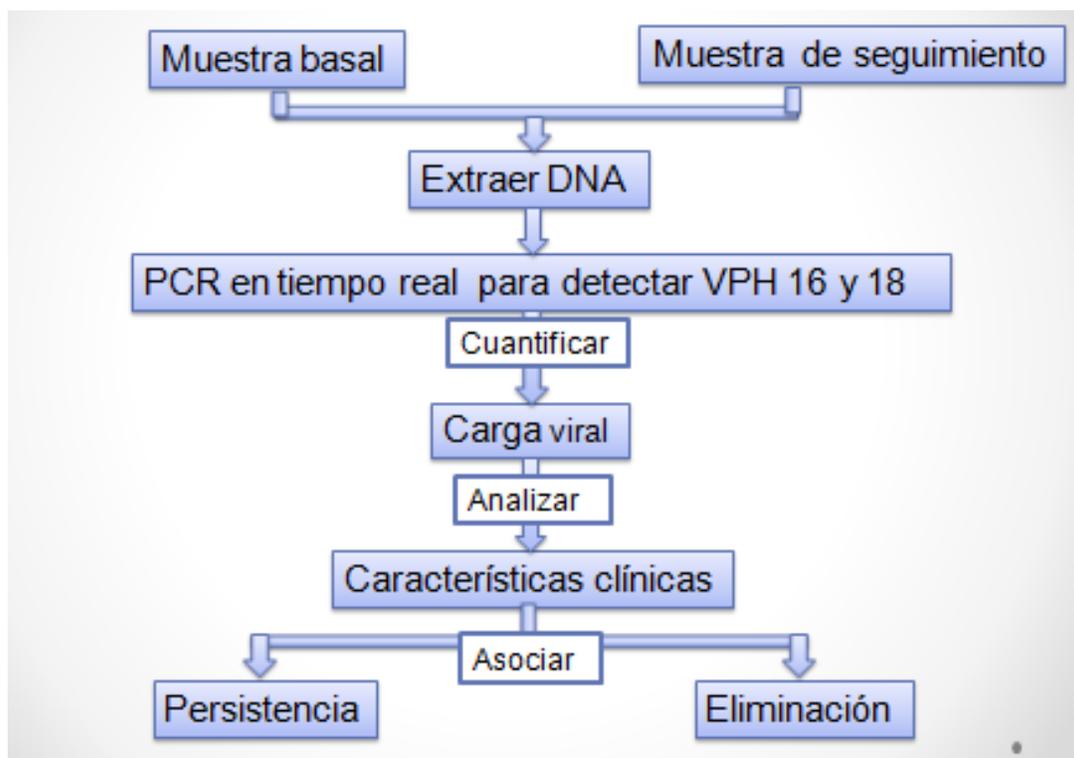
## **VIII. Objetivos específicos.**

1. Identificar el VPH 16 y/o 18 en muestras anales de HSH y que viven con VIH.
2. Determinar la carga viral anal de VPH 16 y 18 relativa a  $\beta$ -globina.
3. Asociar la carga viral de VPH 16 y 18 con la persistencia en muestras de HSH considerando factores como carga viral de VIH, cuenta de linfocitos CD4+ y presencia de otras ITS.

---

## IX. Materiales y Métodos.

En la figura 4 se muestra el diseño general del estudio, a continuación se detallan los componentes.



**Figura 4.** Diseño experimental del estudio.

### IX.1 Población de estudio.

Cohorte de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y que viven con VIH reclutados en la Clínica Condesa, ubicada en la Ciudad de México, la cual atiende a individuos que son VIH positivos. Las muestras y los datos utilizados en el presente estudio, fueron obtenidos del estudio original “Prevalencia, incidencia y persistencia de VPH en hombres que tienen sexo con hombres: un elevado riesgo de neoplasia intraepitelial anal.”

---

Todos los individuos que estuvieron de acuerdo en participar de manera voluntaria, firmaron un consentimiento informado, en el que se dio a conocer a cada uno sobre los procedimientos y lineamientos bajo los que se realizaría el estudio si decidían participar. En dicho documento se les proporcionó información sobre los objetivos del estudio, procedimientos, duración, tipos de muestra biológica por coleccionar, beneficios, riesgos potenciales y responsables del estudio con quienes comunicarse en caso de alguna duda. Para finalizar este documento, se requirió la firma del participante, así como de dos testigos.

Tanto el estudio madre como el protocolo de esta tesis, fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en Investigación, el Comité de Bioseguridad y la Comisión de Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) de Cuernavaca, México. Los participantes fueron elegidos de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

- Edad  $\geq 18$  años de edad.
- Haber tenido relaciones sexuales al menos una vez con otro hombre.
- Ser VIH positivo.
- Estar bajo tratamiento antirretroviral (TARAA) o en vigilancia que demostrara que aún no requerían del tratamiento.

Las características que se consideraron para que un individuo iniciara el tratamiento antirretroviral fueron: tener un conteo de células CD4+ menor a 350 células/ $\mu$ l, presentar enfermedad definida de Sida, presentar nefropatía asociada con VIH, o necesidad de tratamiento para el virus de la hepatitis B.

Los participantes fueron reclutados por el personal médico de la Clínica Condesa durante sus visitas de rutina. El periodo de reclutamiento empezó en Diciembre del 2009 y el seguimiento terminó en Diciembre del 2013, se esperaba que cada participante asistiera a tres visitas de seguimiento con intervalos de 6 meses.

Se calculó un tamaño de muestra de 500 individuos para obtener una muestra representativa de la población estudiada, sin embargo, durante el transcurso del estudio se incluyeron 95 individuos más, para obtener una N total de 595

---

participantes. Para nuestro estudio fueron elegidos todos los HSH que contaran con la muestra de la visita basal y al menos 2 muestras de seguimiento.

Así mismo, entrevistadores capacitados aplicaron de manera confidencial un cuestionario estandarizado a cada participante. El cuestionario recabó características socio-demográficas, de comportamiento sexual, métodos de prevención de infecciones de transmisión sexual (ITS), historia de ITS, tabaquismo y uso ilegal de drogas. También se colectó información del registro médico de cada paciente: años de diagnóstico de VIH, conteo de células CD4+ y carga viral de VIH (la medida que se tomó fue la más cercana al momento en que se tomó la muestra anogenital), el uso de TARAA y el régimen específico de medicamentos, así como los resultados de las exámenes anogenitales.

Antes de cada visita se les pidió no bañarse y abstenerse de tener relaciones sexuales por 24 horas antes de la colección de la muestra. De cada uno de los participantes se obtuvieron cuatro tipos de muestras que se enviaron semanalmente al INSP para su análisis.

*Muestra de orina:* Estas muestras fueron colectadas en recipientes estériles para el diagnóstico de gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*) y clamidia (*Chlamydia trachomatis*), con la prueba de COBAS AMPLICOR® CT/NG. Se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 2-8°C.

*Muestra de suero.* Una muestra de 10 ml de suero sin anticoagulante fue obtenida mediante venopunción del antebrazo del paciente, para la detección de anticuerpos contra sífilis y virus del herpes simplex tipo 2 (VHS-2) mediante métodos serológicos.

*Muestras genitales:* Mediante un hisopo se “raspó” la cabeza y cuerpo del pene, colocando el hisopo en un tubo con 1 ml de buffer, las muestras se mantuvieron a -20°C para la detección de VPH.

*Muestra del canal anal.* Esta muestra fue colectada insertando un hisopo de Dracon humedecido con solución salina de 3-4 cm dentro del canal anal rotando circularmente 360° y presionando contra la pared anal. Las muestras fueron puestas dentro de un vial de 20 ml de solución PreservCyt®, y se mantuvieron a temperatura ambiente.

---

Los resultados de las ITS detectadas, además de los resultados de citología en los que se detectó y genotipificó VPH, fueron entregados tanto a los individuos como a los médicos tratantes, siempre respetando la confidencialidad.

### **IX.2 Detección de VPH.**

La reacción de PCR en tiempo real para la detección de VPH 16 y 18, se realizó mediante un equipo automatizado de *Abbot RealTime High Risk HPV* a partir de la muestra obtenida del canal anal.

El equipo realiza una prueba cualitativa que utiliza la tecnología de la PCR en tiempo real para la detección de 14 tipos de VPH de alto riesgo, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 59, 66 y 68 en muestras clínicas. Se utilizó un control interno (CI) para identificar que la muestra se encuentra en buen estado (sin degradación) detectando una secuencia endógena de  $\beta$ -globina humana. Además, son incluidos dos controles, un positivo y un negativo en cada corrida para evaluar la validez de la PCR<sup>26</sup>.

La prueba puede diferenciar entre VPH 16, VPH 18 y los otros genotipos restantes de alto riesgo. Se utilizaron dos instrumentos: el Abbott *m2000sp* para la preparación de la muestra y el Abbott *m2000rt* para la amplificación y detección<sup>27</sup>.

### **IX.3 Preparación de la muestra.**

El propósito de la preparación de la muestra fue extraer, concentrar y purificar las moléculas de ADN blanco para la amplificación. Para la extracción de ADN se utilizó el kit Abbott *mSample Preparation SystemDNA* con el que es suficiente para realizar hasta 192 preparaciones de muestras del VPH por día. El ADN se lisó con sustancias caotrópicas y se capturó mediante la tecnología de partículas magnéticas.

---

Las partículas magnéticas tienen una superficie cuya carga se modifica con el pH, a pH bajo la carga de las partículas es positiva atrayendo a las moléculas de ADN las cuales tienen carga negativa. Con el lavado se eliminan proteínas y contaminantes que no se unieron a las partículas magnéticas, posteriormente mediante un buffer de elución se liberó el ADN unido para su posterior utilización en la reacción de PCR en tiempo real<sup>27,28</sup>.

Una vez obtenido el ADN, en el instrumento Abbott *m2000sp* se combinaron los componentes para la amplificación (enzimas Taq polimerasa, *primers*, magnesio) con el ADN de las muestras, en una placa de 96 pozos, la cual se transfiere al instrumento Abbott *m2000rt* donde se llevó a cabo la amplificación y detección.

#### **IX.4 Amplificación de VPH 16 y VPH 18.**

Una vez que se obtuvo el ADN purificado de cada una de las muestras anales, se procedió a la amplificación mediante PCR en tiempo real de la región L1 conservada del genoma del VPH en el instrumento *m2000rt*. Se utilizó una mezcla modificada de los *primers* de GP5+/GP6+, que consistió de 3 *primers forward* y 2 *primers reverse* diseñados para hibridar en una región de aproximadamente 150 pares de bases. Como control interno (CI), se amplificó una secuencia blanco de 136 pb del gen de la  $\beta$ -globina humana<sup>26,27</sup>.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 38 ciclos; durante la reacción, el ADN blanco es amplificado por la enzima *Amplitaq Gold polimerase* en presencia de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato) y de magnesio. La enzima sólo se activa a temperaturas donde ocurren interacciones específicas ADN-ADN.

Durante un ciclo, la enzima es activada a 92°C por 10 minutos, posteriormente a una temperatura alta se desnaturaliza el ADN de doble cadena, seguido por una temperatura baja donde los *primers* se alinean a sus blancos respectivos y se realiza

---

la extensión para generar productos de cadena doble de ADN. La amplificación exponencial de los productos de VPH y del CI se llevó a cabo en 38 ciclos, resultando en billones de secuencias blanco en la misma reacción<sup>27</sup>.

### **IX.5 Detección.**

La detección de los productos amplificados se realizó en el instrumento *m2000rt*. Durante los 38 ciclos, existe un paso adicional en el que la temperatura disminuye para permitir la detección de la fluorescencia de las sondas alineadas a los productos amplificados tanto del VPH como del CI (Tabla 1)<sup>26</sup>.

Estas sondas son oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla, modificados covalentemente con una fracción fluorescente a un extremo de la sonda y a una fracción inhibitoria por el otro extremo (quencher). En ausencia de secuencias blanco, las sondas adoptan una serie de conformaciones aleatorias, algunas de estas conformaciones ubican al inhibidor lo suficientemente cerca del fluoróforo excitado, para absorber su energía antes de que la fluorescencia sea emitida. Al unirse una sonda a su secuencia complementaria en el blanco, el fluoróforo y el quencher se separan, permitiendo la emisión de la fluorescencia.

Mediante las diferentes sondas se detectan señales de manera simultánea para VPH 16, VPH 18, otros tipos de VPH de alto riesgo, y el CI<sup>27</sup>.

**Tabla 1.** Marcaje por sondas.

<b>Marcador Fluorescente</b>	<b>Tipo específico de sonda</b>
VIC	16
NED	18
FAM	31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
Quasar	Control interno (B-globina humana)

---

## IX.6 Cuantificación viral de VPH.

La determinación de la carga viral de VPH 16 y de VPH 18 se realizó de manera relativa al gen de  $\beta$ -globina (control positivo interno utilizado en cada amplificación), obteniéndose una cuantificación relativa, es decir, el valor obtenido indica cuántas veces más se presenta el gen del virus con respecto al gen de  $\beta$ -globina. Para ello, se determinó el cambio del gen de interés con respecto al gen de referencia ( $\Delta$ Ct), restando el valor del Ct obtenido del gen de VPH detectado, del valor del Ct obtenido de  $\beta$ -globina y aplicando la fórmula  $2^{-\Delta$ Ct}.

Además de los controles de  $\beta$ -globina y los controles positivo y negativo de la técnica, en cada corrida de PCR en tiempo real se incluyeron muestras por duplicado del ADN de células SiHa y HeLa como control externo de la amplificación del virus. Se conoce que las células SiHa contienen de 1-2 copias de VPH 16 por célula, mientras que las células HeLa contienen de 20-40 copias de VPH 18<sup>29</sup>. Con el ADN de las células se realizaron dos curvas estándar, una para VPH 16 y otra para VPH 18, a partir de diluciones seriadas con concentraciones conocidas del blanco.

Como primer paso para la realización de las curvas estándar de SiHa y HeLa, se realizó la extracción de ADN de las células mediante un estuche de extracción de la marca Promega y posteriormente se procedió a cuantificar la concentración de ADN en el equipo NanoDrop. El siguiente paso fue determinar la concentración inicial a partir de las que se realizarían las diluciones seriadas del ADN de las células SiHa y HeLa, esto con la finalidad de que el Ct de las diluciones seriadas se encontrara dentro de un intervalo amplio de amplificación en la reacción de PCR en tiempo real. Se determinó usar una concentración inicial del ADN de células SiHa de 10 ng/ul y para el ADN de células HeLa la concentración inicial fue de 15 ng/ul, con diluciones seriadas de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80.

---

## **IX.7 Definición de variables.**

Para clasificar las muestras en las que se detectó VPH 16 y 18, en este estudio se tomaron en cuenta las siguientes definiciones de persistencia, incidencia, reinfección y eliminación:

- a) Persistencia: La persistencia se define como la presencia del mismo tipo de virus en dos muestras consecutivas del participante.
- b) Incidencia: Cuando en una muestra no se detecta el genotipo del virus y en la posterior muestra de seguimiento es posible detectarlo, se considerará como incidencia del virus.
- c) Eliminación: La eliminación es definida como la detección del virus en una de las muestras del participante y en la muestra subsecuente no se vuelve a detectar el mismo genotipo del virus.

## **IX.8 Análisis estadístico.**

- **Análisis de la cuantificación viral de VPH 16 y VPH 18.**

Para el análisis de las muestras se consideraron dos clasificaciones:

-La primera clasificación se realizó por cada una de las visitas de los participantes a la clínica, es decir, los datos se analizaron en la primera visita (basal) y las 3 visitas de seguimiento. Por cada visita se identificó el número de HSH que fueron positivos a VPH 16 o a VPH 18, y posteriormente se analizó la cuantificación relativa a  $\beta$ -globina.

-La otra clasificación para el análisis de las muestras se llevó a cabo mediante mediciones, estas fueron realizadas a partir de la comparación entre una visita previa y una visita posterior. Para los individuos que contaron con las 4 visitas, se realizaron 3 mediciones, mientras que con aquellos que tuvieron 3 visitas sólo se realizó la 1ª y 2ª medición; la primera medición se realizó entre la 1ª visita y la 2ª visita, la 2ª medición entre la 2ª y la 3ª visita, y la 3ª medición entre la 3ª y la 4ª visita; al

---

comparar entre una visita y otra, se identificaron los individuos que fueron incidentes, persistentes o de eliminación, para posteriormente realizar el análisis de la cuantificación viral en cada medición.

En la tabla 2, se muestra el posible resultado para un individuo, se observa que en la 1ª medición un resultado positivo a un tipo de VPH en la 1ª visita y un resultado positivo al mismo tipo de VPH en la 2ª visita se definiría como persistencia del virus; en la 2ª medición, un resultado positivo a un tipo de VPH en la 2ª visita y un resultado negativo al mismo tipo de VPH en la 3ª visita indicaría eliminación; y por último, en la 3ª medición, un resultado negativo a VPH en la 3ª visita y un resultado positivo en la 4ª visita se definiría como incidencia de ese tipo de VPH. En este caso el individuo contaría con 3 mediciones.

La persistencia, eliminación o incidencia en un individuo, podría ocurrir en cualquiera de las 3 mediciones, incluso, un individuo podría contar sólo con eventos de persistencia, eliminación o incidencia de VPH 16 o VPH 18 en las 3 mediciones; o podría ser negativo a cualquier tipo viral en una medición o en las 3 mediciones, si en dos visitas consecutivas el resultado es negativo a cualquier tipo de VPH.

**Tabla 2.** Ejemplo de resultados en un individuo.

	<b>1ª Visita</b>	<b>2ª Visita</b>	<b>3ª Visita</b>	<b>4ª Visita</b>
<b>1ª Medición</b>	<b>+</b>	<b>+</b>		
<b>2ª Medición</b>		<b>+</b>	<b>-</b>	
<b>3ª Medición</b>			<b>-</b>	<b>+</b>

---

Para analizar la cuantificación relativa a  $\beta$ -globina de VPH 16 y de VPH 18 en cada una de las visitas y en las 3 mediciones realizadas, se determinó si se usarían métodos paramétricos o métodos no paramétricos.

Para ello, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se verificó si los datos cumplían con la curva normal, ya que el valor de  $p$  fue menor a 0.5 ( $p < 0.5$ ), se concluyó que los datos no se distribuían de manera normal, por lo que se usaron métodos no paramétricos. Los resultados de la cuantificación relativa a  $\beta$ -globina, son presentados con la mediana (Me) como medida de tendencia central, tomando como medida de la dispersión de los datos el intervalo intercuartil (IIQ).

- **Análisis de datos.**

Se realizó un análisis de frecuencias simples con las características demográficas, clínicas y de comportamiento sexual de la población de estudio, con la finalidad de describir a los HSH que participaron en la detección de VPH 16 y VPH 18.

Posteriormente, mediante análisis bivariado, se relacionaron las características demográficas, clínicas y de comportamiento sexual de los HSH que presentaron persistencia o eliminación de VPH 16 y/o VPH 18. Debido a que se tienen 3 mediciones de cada individuo que pudieron ser negativo, incidente, persistente o eliminación de VPH, para el análisis bivariado se clasificaron como HSH con persistencia o eliminación a aquellos que presentaron en alguna de las 3 mediciones persistencia o eliminación del virus, si presentaban ambas condiciones, se clasificó de acuerdo a la primera medición.

Mediante la prueba de  $\chi$ -cuadrada se buscaron posibles factores de riesgo que estuvieran asociados con la persistencia o eliminación del virus, tomando como valor significativo de la asociación una  $p \leq 0.05$  y un IC del 95%.

---

Por último, mediante regresión lineal multivariada se consideraron las medias de las características demográficas, clínicas y de comportamiento sexual que podrían estar asociadas de manera simultánea con la persistencia o eliminación de la infección por VPH en HSH y que viven con VIH, entre las que se encuentra la carga viral de VIH, la edad, el tiempo de terapia antirretroviral, el tiempo de diagnóstico de la infección por VIH, el conteo de CD4+ y la infección con otras ITS. A partir de la medición para clasificar al individuo con persistencia o eliminación de VPH, se tomó en cuenta la carga viral relativa de VPH 16 o 18 de la visita previa.

Para este análisis, se obtuvieron diversos modelos de regresión lineal múltiple que relacionaron la carga viral relativa de VPH de los individuos con persistencia o eliminación, con todas las variables que en el análisis bivariado tuvieron un valor de  $p < 0.200$  o que potencialmente tuvieran importancia biológica como tiempo de diagnóstico de VIH, conteo de células CD4+, carga viral de VIH y tiempo de tratamiento antirretroviral.

Los modelos de regresión lineal múltiple que se eligieron se compararon con un modelo en el que sólo se relacionó la cuantificación viral relativa de VPH 16 o VPH 18 (variable dependiente) con la persistencia o eliminación (variable independiente). El modelo elegido para VPH 16 o para VPH 18 debía tener variables con valores de significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ).

El análisis de la cuantificación viral relativa de VPH así como los análisis de características demográficas, clínicas y de comportamiento sexual fueron realizados mediante el programa SPSS versión 15.0.

---

## **X. Resultados.**

### **X.1 Prevalencia de VPH entre HSH.**

A partir de la población total de estudio (n=595 HSH), se realizó la PCR en tiempo real a las muestras de 154 individuos. Cada uno de los participantes elegidos contó con una muestra basal tomada al inicio del estudio y al menos 2 muestras de seguimiento que fueron tomadas aproximadamente cada 6 meses durante el periodo de reclutamiento (Diciembre 2009-Diciembre 2013).

En total se procesaron 590 muestras; 154 muestras correspondientes a la primera visita (muestra basal), 154 muestras de la segunda, 152 muestras de la tercera y 130 muestras de la cuarta visita.

Se detectó VPH tipo 16 y/o 18 en el 42.2% de los HSH (65 de 154) en algún momento del estudio, de los cuales el 1.3% presentó infección sólo por VPH 16, mientras que no se detectó ningún caso de infección sólo por VPH 18.

La mayoría de los casos en los que se detectó VPH se presentaron como coinfecciones; en el 20.8% se observó coinfección por VPH 16 y otro tipo de alto riesgo (AR), la coinfección de VPH 18 y otro tipo de VPH de AR se detectó en el 8.4%, mientras que en el 11.7% se detectó coinfección de VPH 16, VPH 18 y otro tipo de VPH de AR.

En el 44.2% de los participantes se detectó sólo otro tipo de VPH de AR y en el 13.6% no se detectó el virus (Tabla 3).

**Tabla 3.** Porcentaje de HSH a los que se detectó VPH de alto riesgo (16, 18 y Otros) mediante PCR en tiempo real, en algún momento del estudio.

<b>Tipo de VPH</b>	<b>n (%)</b>
<b>VPH 16</b>	<b>52 (33.8)</b>
VPH 16	2 (1.3)
VPH 16/Otro	32 (20.8)
VPH 16/18/Otro	18 (11.7)
<b>VPH 18</b>	<b>31 (20.1)</b>
VPH 18	-----
VPH 18/Otro	13 (8.4)
VPH 16/18/Otro	18 (11.7)
<b>Otros</b>	<b>68 (44.2)</b>
<b>Negativo</b>	<b>21 (13.6)</b>

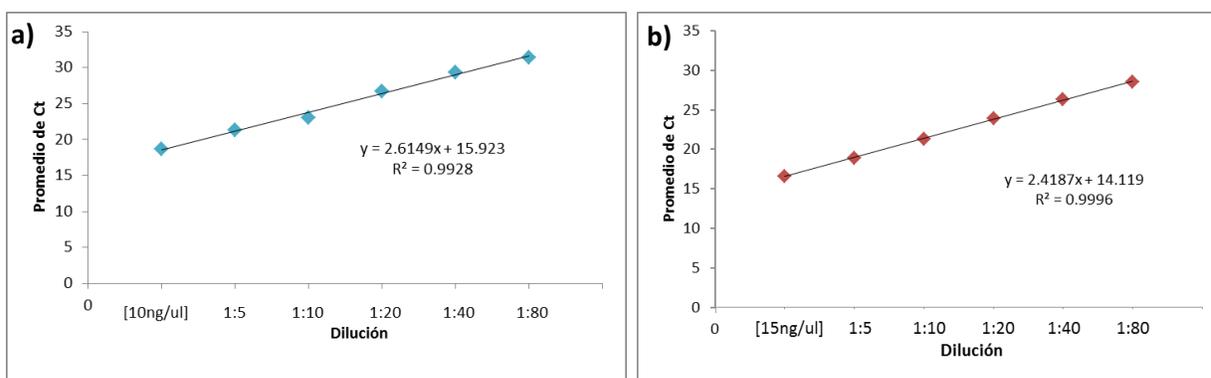
---

## x.2 Cuantificación viral.

Con el promedio de los valores de Ct obtenidos para las muestras de células SiHa y HeLa en cada una de las corridas, se obtuvieron dos rectas de calibración, con estas fue posible deducir que la amplificación de los productos de PCR en cada una de las corridas se dio de manera lineal, conforme disminuyó la concentración de ADN y que además funcionaban como un control externo a los utilizados por el equipo automatizado.

En la curva estándar de células SiHa observamos que por cada disminución en la concentración de ADN (con un factor de dilución de 2), hay un incremento de 2.6 ciclos, relación que ocurre de manera lineal con un coeficiente de correlación de 0.99.

Con respecto a la curva estándar de células HeLa, al disminuir la concentración de ADN, existe un incremento de 2.4 ciclos, con un coeficiente de correlación de 0.99 (Figura 5).



**Figura 5.** Curva estándar de células SiHa (a). Curva estándar de células HeLa (b).

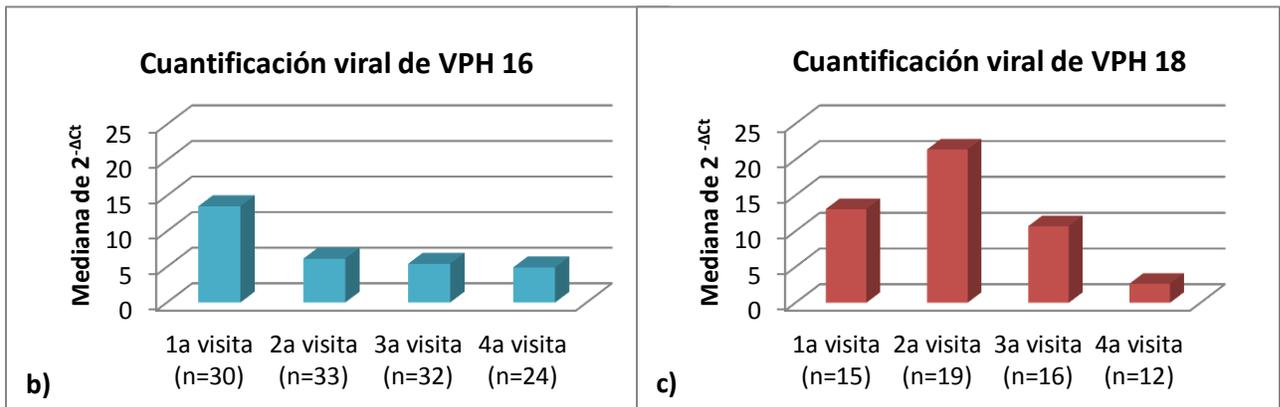
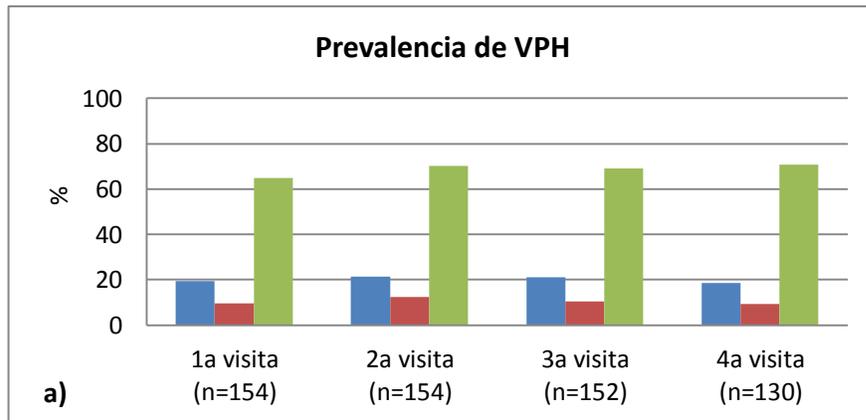
---

En la 1ª visita, se detectaron 30 muestras positivas a VPH 16 (19.5%), 15 muestras positivas a VPH 18 (9.7%) y 100 positivas a Otros (64.9%) de 154 muestras, con una mediana de cuantificación viral de 13.3 (IIQ 3.7-97.9) en las muestras positivas a VPH 16 y de 13.1 (IIQ 1.6-47.2) en las muestras positivas a VPH 18.

En la 2ª visita, se analizaron 154 muestras de las cuales 33 fueron positivas a VPH 16 (21.4%), 18 fueron positivas a VPH 18 (12.3%) y 108 fueron positivas a Otros (70.1%), la mediana de la cuantificación viral en las muestras positivas a VPH 16 fue de 6.2 (IIQ 0.9-27.0) y de 21.4 (IIQ 5.5-44.4) en las muestras positivas a VPH 18.

En la 3ª visita, 32 muestras fueron positivas a VPH 16 (21.0%), 16 fueron positivas a VPH 18 (10.5%) y 105 fueron positivas a Otros (69.1%) de 152 muestras analizadas, con una mediana en la cuantificación viral de 5.4 (IIQ 0.4-15.0) en las muestras positivas a VPH 16 y una mediana de 10.7 (IIQ 0.6-62.8) en muestras positivas a VPH 18.

Por último, en la cuarta visita se analizaron 130 muestras, de las cuales 24 fueron positivas a VPH 16 (18.5%) con una cuantificación viral de 4.9 (IIQ 1.0-25.4); 12 fueron positivas a VPH 18 (9.2%) con una mediana de 2.7 (IIQ 0.6-62.8) veces más del virus con respecto a  $\beta$ -globina y 92 fueron positivas a Otros (70.8 %) (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Prevalencia de VPH 16, 18 y Otros en HSH (a); Cuantificación viral de VPH 16 (b) y VPH 18 (c) en la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª visita.

Por otro lado, a partir de la comparación entre dos visitas (una previa y una posterior) se realizaron 436 mediciones; 154 mediciones correspondientes a la 1ª visita y la 2ª visita, 152 mediciones de la 2ª visita y la 3ª visita, y 130 mediciones obtenidas entre la 3ª y la 4ª visita.

Del total de las mediciones, se detectó VPH 16 en 90 de ellas, de las cuales en 62 se observó persistencia, de estas mediciones se determinó que el 50% de las muestras tuvieron una cuantificación de VPH 16 entre 3.5 y 38.5 veces más que de  $\beta$ -globina (Me=13.1), mientras que en las 28 que eliminaron el virus, el 50% de las muestras presentaron una cuantificación viral entre 0.5 y 14.7 veces más que de  $\beta$ -globina (Me=2.5).

En las mediciones en las que se detectó VPH 18 (Me=46), 29 fueron persistentes con una cuantificación viral entre 5.3 y 78.3 veces más que de  $\beta$ -globina (Me=14.6) en el 50% de las muestras, mientras que en las 17 mediciones que eliminaron el virus, el 50% de las muestras presentaron entre 3.9 y 37.7 veces más de VPH 18 que de  $\beta$ -globina (Me=14.4) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cuantificación viral de VPH 16 y VPH 18 en mediciones persistentes y de eliminación en el total de mediciones (n=436).

<b>PERSISTENCIA</b>	<b>N</b>	<b>Mediana (IIQ)</b>	<b>p</b>
VPH 16	62	13.1 (3.5-38.5)	0.423
VPH 18	29	14.6 (5.3-78.3)	

<b>ELIMINACIÓN</b>	<b>N</b>	<b>Mediana (IIQ)</b>	<b>p</b>
VPH 16	28	2.5 (0.5-14.7)	0.101
VPH 18	17	14.4 (3.9-37.7)	

Tomando por separado la primera, segunda y tercera medición, se calculó la cuantificación viral para las mediciones persistentes y de eliminación de VPH 16 y de VPH 18 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Cuantificación viral de VPH 16 y 18 para las muestras de incidencia, persistencia y eliminación durante las 3 mediciones.

<b>VPH 16</b>			
	1ª Medición/Me <sup>a</sup> (IIQ <sup>b</sup> )	2ª Medición /Me (IIQ)	3ª Medición/Me (IIQ)
<b>Persistencia</b>	15.6 (4.5-84.5)	9.5 (2.2-27.7)	14.5 (5.3-55.0)
<b>Eliminación</b>	6.4 (2.0-111.2)	1.8 (0.8-25.3)	0.6 (0.3-7.9)

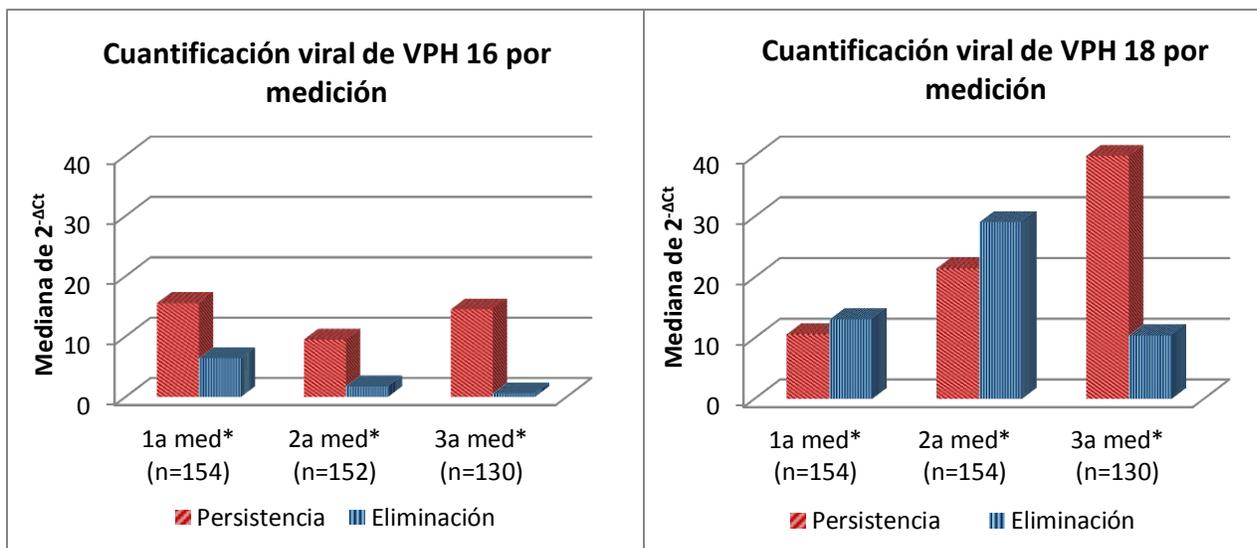
<b>VPH 18</b>			
	1ª Medición/Me (IIQ)	2ª Medición /Me (IIQ)	3ª Medición/Me (IIQ)
<b>Persistencia</b>	10.6 (1.4-102.4)	21.5 (9.3-58.8)	77.7 (77.7-340.1)
<b>Eliminación</b>	13.0 (3.2-40.5)	29.1 (4.9-53.4)	10.4 (0.1-16.0)

<sup>a</sup>Mediana, <sup>b</sup>Intervalo intercuartil.

Para VPH 16, la mediana de la cuantificación viral en las muestras persistentes fue mayor que la mediana de la cuantificación viral en las muestras de eliminación.

Para VPH 18, la mediana de la cuantificación viral en las muestras de persistencia fue mayor con respecto a la mediana de la cuantificación viral en las muestras de persistencia de VPH 16, sin embargo, no hubo gran diferencia con la mediana de la cuantificación viral en las muestras de eliminación de VPH 18. Se observó entre las muestras persistentes que la cuantificación viral aumentó de la 1ª a la 3ª medición.

Los IIQ de las muestras de persistencia de VPH 18 fueron mayores que los IIQ de las muestras de persistencia de VPH 16 durante las tres mediciones (Gráfica 2).

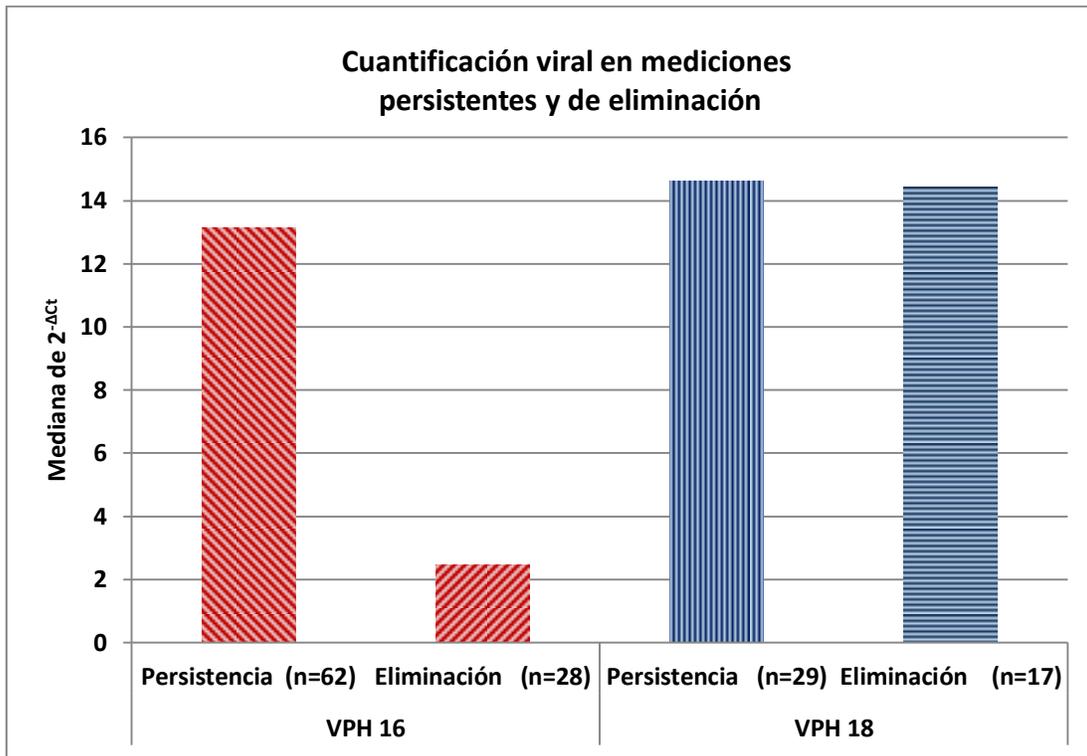


**Gráfica 2.** Cuantificación viral en mediciones de persistencia y de eliminación de VPH 16 (a) y VPH 18 (b) en la comparación realizada entre una visita previa y una visita posterior (\*medición).

Entre las muestras persistentes y de eliminación tanto de VPH 16 como de VPH 18, se analizó el comportamiento de la cuantificación viral con la finalidad de comparar si el cambio en estas mediciones de persistencia y de eliminación era significativo.

Se encontró que el cambio en la cuantificación viral de las mediciones persistentes de VPH 16 con respecto a las mediciones de eliminación fue significativo ( $p=0.014$ ), es decir, que en mediciones persistentes la cuantificación viral de VPH 16 con respecto a  $\beta$ -globina, aumenta significativamente comparado con la cuantificación viral en las mediciones en donde se detecta eliminación del virus.

El comportamiento en la cuantificación viral en mediciones persistentes y de eliminación de VPH 18 no fue significativo al compararse entre sí ( $p=0.333$ ), por lo que un aumento o disminución en la cuantificación viral no determina si el virus persiste o se elimina (Gráfica 3).



**Gráfica 3.** Cuantificación viral de VPH 16 y VPH 18 en mediciones persistentes y de eliminación (VPH 16,  $p=0.014$ ; VPH 18,  $p=0.333$ ).

La infección por VPH16 y VPH18 se presentó en la mayoría de las mediciones como coinfecciones, en el 14.3% de las mediciones (17 de 119) la infección se dio sólo por VPH 16 con una cuantificación viral de 3.2 veces más que de  $\beta$ -globina (IIQ 0.8-12.0), y en el 85.7% de las mediciones se debió a coinfecciones por VPH 16/18/Otros con una cuantificación viral de 7.1 veces más que de  $\beta$ -globina (IIQ 1.6-29.7).

En las mediciones de VPH 18, en el 4.8% se detectó infección sólo por VPH 18, con una cuantificación viral 15.4 veces más que de  $\beta$ -globina, y en las mediciones en las que hubo coinfecciones por VPH 16/18/Otros (95.2%), la cuantificación viral fue 10.6 veces más que de  $\beta$ -globina (Tabla 6).

---

Al comparar las infecciones simples de VPH 16 con las coinfecciones, y las infecciones simples con las coinfecciones de VPH 18, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la cuantificación viral (VPH 16 vs coinfecciones,  $p=0.239$ ; VPH 18 vs coinfecciones,  $p=0.376$ ).

**Tabla 6.** Comparación de la cuantificación viral entre las infecciones por VPH 16 y VPH 18, mostradas como infecciones simples y coinfecciones.

<b>Infección por VPH</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Mediana (IIQ)</b>	<b>P</b>
VPH 16	17	14.3	3.2 (0.8-12.0)	0.239
Coinfección (16/18/Otros)	102	85.7	7.1 (1.6-29.7)	
VPH 18	3	4.8	15.4 (14.4-NC)	0.376
Coinfección (16/18/Otros)	59	95.2	10.6 (1.5-44.9)	

---

### **X.3 Análisis descriptivo de la población.**

El 36.4% de los individuos tenía entre 31 y 40 años, en relación al nivel educativo, el 41.6% cuenta con educación media superior, seguido por la educación básica con un 30.5% de los individuos y un 27.3% con educación superior.

El 48% de los HSH fumó en los últimos 6 meses, mientras que más del 70% dijo que nunca o de 1 a 2 veces por año consume alcohol y más del 48% consumieron algún tipo de drogas.

Con respecto a las características clínicas, al 37% de los individuos se le diagnosticó VIH desde hace 1.1-5 años, seguido de  $\geq 10.1$  años en el 22.7%, casi el 45% tuvo un conteo de CD4  $\geq 501$  células/ml y en el 53.2% se detectó carga viral de VIH, entre los cuales la media de la carga viral fue de  $3.01 \log_{10}$  (IC<sub>95%</sub> 2.66-3.35). Más del 35% de los HSH tenía de 1.1-5 años con tratamiento antirretroviral mientras que sólo el 12.3% no había iniciado con el tratamiento.

En cuanto a las características de comportamiento sexual, el 34.4% de los HSH iniciaron el sexo anal entre los 16 y 18 años; el 51.3% había tenido de 20-199 parejas sexuales hombres en toda su vida; por otro lado, sólo el 10% de los individuos mencionó no haber tenido parejas ocasionales y en los últimos 6 meses el 41.6% de los HSH tuvo de 0-1 pareja. En relación al uso de condón el 72.1% de los HSH lo empleó en la mitad o más de la mitad de las veces de sus relaciones sexuales, por último, el 67% de los HSH refirieron alguna ITS, incluido VPH o condilomas (Tabla 7).

**Tabla 7. Análisis descriptivo de la población**

Características demográficas y clínicas			Características de comportamiento sexual		
Variable	n	%	Variable	n	%
<b>Edad</b>			<b>Edad de inicio de sexo anal</b>		
18-30	48	31.2	≤15	49	31.8
31-40	56	36.4	16-18	53	34.4
≥41	49	31.8	≥19	51	33.1
Sin dato	1	0.6	Sin dato	1	0.6
<b>Escolaridad</b>			<b>Edad de la pareja de 1ª relación sexual</b>		
Básica	47	30.5	≤18	49	31.8
Media superior	64	41.6	19-29	52	33.8
Superior	42	27.3	≥30	52	33.8
Sin dato	1	0.6	Sin dato	1	0.6
<b>Fumar en últimos 6 meses</b>			<b>No. de parejas sexuales hombres en toda la vida</b>		
Si	74	48.1	≤19	34	22.1
No	38	24.7	20-199	79	51.3
Nunca he fumado	26	16.9	≥200	38	24.7
Sin dato	16	10.4	Sin dato	3	1.9
<b>Frecuencia para tomar ≥5 copas de alcohol</b>			<b>No. de parejas ocasionales</b>		
Diario/1-5 por semana	9	5.8	No ha tenido	15	9.7
1-4 al mes	31	20.1	≤10	37	24.0
Nunca/1-2 por año	113	73.4	11-150	66	42.9
Sin dato	1	0.6	≥151	32	20.8
<b>Consumo de drogas en últimos 6 meses</b>			Sin dato	4	2.6
Si	75	48.7	<b>No. de parejas en últimos 6 meses</b>		
No	63	40.9	0-1	64	41.6
Sin dato	16	10.4	2-5	47	30.5
<b>Tiempo con VIH (años)</b>			≥6	42	27.3
≤1	34	22.1	Sin dato	1	0.6
1.1-5	57	37.0	<b>Frecuencia de uso de condón</b>		
5.1-10	35	22.7	Nunca/<Mitad de veces	24	15.6
≥10.1	24	15.6	≥Mitad de veces	111	72.1
Sin dato	4	2.6	Siempre	18	11.7
<b>Conteo de CD4 (células/ml)</b>			Sin dato	1	0.6
0-350	49	31.8	<b>Diagnóstico de ITS</b>		
351-500	30	19.5	VPH o condilomas	42	27.3
≥501	69	44.8	Otra ITS	61	39.6
Sin dato	6	3.9	No tiene	50	32.5
<b>Estatus de CV de VIH</b>			Sin dato	1	0.6
Detectable ( $\mu=3.01$ , IC <sub>95%</sub> 2.66-3.35)	82	53.2			
Indetectable	64	41.6			
Sin dato	8	5.2			
Sin dato	6	3.9			
<b>Tiempo con TARAA (años)</b>					
No ha iniciado	19	12.3			
≤1	32	20.8			
1.1-1.5 años	55	35.7			
5.1-10	32	20.8			
≥10.1	10	6.5			
Sin dato	6	3.9			

---

#### **X.4 Análisis bivariado.**

El 18.2% (28/154) de los HSH presentaron persistencia de VPH 16 y el 10.4% (16/154) presentó eliminación, con una diferencia marginalmente significativa ( $p=0.070$ ), mientras que el 9.7% (15/154) presentó persistencia de VPH 18 y el 6.5% (10/154) eliminó VPH 18, sin diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.317$ ).

La diferencia de los HSH entre los que persistió VPH 16 y aquellos en los que persistió VPH 18, fue estadísticamente significativa ( $p=0.048$ ), por otro lado, entre los HSH que eliminaron VPH 16 y los HSH que eliminaron VPH 18, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.305$ ).

Los HSH infectados con VPH 16 que tenían entre 31-40 años mostraron una mayor persistencia (46.4%), al igual que aquellos con educación media superior (57.1%) y los que fumaron en los últimos 6 meses (42.9%).

La variable de consumo de alcohol y consumo de drogas se relacionaron de manera negativa con la persistencia de VPH 16, la persistencia fue mayor en los HSH que tomaron 1-2 veces por año o nunca lo hicieron. El consumir drogas parece ser un factor protector para la persistencia de VPH 16, ya que aquellos HSH que no consumieron drogas presentaron mayor persistencia que los que si consumieron, sin embargo este dato debe tomarse con cautela debido a que no es estadísticamente significativo.

De las variables clínicas, aunque sin significancia estadística, se observó que los HSH que tienen 5.1 años o más con VIH, tuvieron mayor persistencia de VPH 16, y que eliminan más los HSH que tenían de 1.1-5 años con VIH. Con respecto al número de células CD4, un conteo menor a 350 células/ml aumentó la persistencia de VPH 16 y un conteo mayor a 350 células/ml aumentó la eliminación de VPH 16; finalmente, una carga viral de VIH detectable entre HSH infectados con VPH 16 fue un indicador de la persistencia del virus.

---

En las características de comportamiento sexual, la persistencia de VPH 16 se relacionó con un mayor número de parejas sexuales hombres en toda la vida ( $\geq 20$ ), un mayor número de parejas ocasionales ( $\geq 11$ ) y un mayor número de parejas en los últimos 6 meses; sin embargo, la eliminación de VPH 16 también estuvo relacionada con un mayor número de parejas sexuales ( $\geq 200$ ), un mayor número de parejas ocasionales ( $\geq 11$ ) y un mayor número de parejas en los últimos 6 meses.

Aunque se observan algunas relaciones con algunas características demográficas, clínicas y de comportamiento sexual, para VPH 16 no se encontró ningún factor de riesgo estadísticamente significativo, en la comparación de persistencia con respecto a la eliminación del virus (Tabla 8).

Por otro lado, para VPH 18 se encontró que en los HSH de 31-40 años existe mayor persistencia del virus que a una edad menor, mientras que la eliminación del virus disminuye al aumentar la edad ( $p=0.025$ ). Con respecto al nivel educativo, entre el grupo con escolaridad media superior (53.3%) la persistencia y la eliminación de VPH 18 fue mayor que en los grupos con educación básica y superior.

Otra variable que se asoció de manera significativa con la persistencia o eliminación de VPH 18 fue la de “fumar en los últimos 6 meses”, ya que en aquellos HSH que fumaron en los últimos 6 meses, hubo un mayor porcentaje de persistentes que los que no fumaron o nunca habían fumado ( $p=0.065$ ), los HSH que fumaron en los últimos 6 meses eliminaron más el virus que los que no fumaron (40% vs 30%).

En el grupo de HSH que tomaron 1-2 veces por año o nunca lo hicieron y aquellos que dijeron haber consumido drogas, se observó una mayor persistencia, al comparar la eliminación del virus, esta también fue alta, ambas variables sin significancia estadística.

---

Con relación a las características clínicas, el grupo de HSH infectados con VPH 18 que tienen de 1.1-5 años con VIH, fue el que presentó mayor porcentaje de persistentes y aquellos con  $\leq 1$  año con VIH tuvieron mayor porcentaje de eliminación. La persistencia fue mayor en el grupo de HSH con un conteo menor a 350 células/ml, sin embargo un conteo mayor a 350 células/ml no se asoció con la eliminación de VPH 18; por último, una carga viral de VIH detectable entre HSH infectados con VPH 18 es un indicador de la persistencia del virus, mientras que una carga viral indetectable de VIH no mostró mayor eliminación del VPH 18.

En las características de comportamiento sexual, la persistencia de VPH 18 se asoció con un mayor número de parejas sexuales hombres en toda la vida, un mayor número de parejas ocasionales y un mayor número de parejas en los últimos 6 meses, por el contrario, entre los HSH en los que hay eliminación de VPH 18, el tener <199 parejas sexuales en toda la vida, no haber tenido parejas ocasionales y tener de 0-1 pareja en los últimos 6 meses se asoció con mayor eliminación, aunque sin significancia estadística.

Con respecto al uso de condón, la persistencia de VPH 18 fue mayor entre el grupo de HSH que utilizaron este método anticonceptivo en más de la mitad de sus relaciones sexuales, sin embargo entre este mismo grupo se encuentra la mayor eliminación del virus. Finalmente, entre los HSH que refirieron alguna ITS, no se encontró asociación estadísticamente significativa para la persistencia o eliminación de VPH 18 (Tabla 9).

**Tabla 8. Asociación de características de HSH infectados con VPH 16.**

Características demográficas y clínicas				Características de comportamiento sexual			
Variable	Persistencia	Eliminación	p	Variable	Persistencia	Eliminación	p
<b>Edad</b>				<b>Edad de inicio de sexo anal</b>			
18-30	8 (28.6)	6 (37.5)	0.801	≤15	12 (42.9)	7 (43.8)	0.546
31-40	13 (46.4)	6 (37.5)		16-18	7 (25)	6 (37.5)	
≥41	7 (25)	4 (25)		≥19	9 (32.1)	3 (18.8)	
<b>Escolaridad</b>				<b>Edad de la pareja de 1ª relación sexual</b>			
Básica	6 (21.4)	6 (35.7)	0.509	≤18	10 (35.7)	5 (31.3)	0.619
Media superior	16 (57.1)	7 (43.8)		19-29	8 (28.6)	3 (18.8)	
Superior	6 (21.43)	3 (18.8)		≥30	10 (35.7)	8 (50)	
<b>Fumar en últimos 6 meses</b>				<b>No. de parejas sexuales hombres en toda la vida</b>			
Si	12 (42.9)	9 (56.3)	0.213	≤19	4 (14.3)	4 (25)	0.309
No	6 (21.4)	3 (18.8)		20-199	12 (42.9)	3 (18.8)	
Nunca he fumado	6 (21.4)	0 (0)		≥200	11 (39.3)	9 (56.3)	
Sin dato	4 (14.3)	4 (25)		Sin dato	1 (3.6)	0 (0)	
<b>Frecuencia para tomar ≥5 copas de alcohol</b>				<b>No. de parejas ocasionales</b>			
Diario/1-5 por semana	2 (7.1)	1 (6.3)	0.770	No ha tenido	4 (14.3)	1 (6.3)	0.868
1-4 al mes	6 (21.4)	5 (31.3)		≤10	4 (14.3)	3 (18.8)	
Nunca/1-2 por año	20 (71.4)	10 (62.5)		11-150	10 (35.7)	6 (37.5)	
<b>Consumo de drogas en últimos 6 meses</b>				<b>No. de parejas en últimos 6 meses</b>			
Si	10 (35.7)	6 (37.5)	0.606	≥151	11(39.3)		
No	14 (50)	6 (37.5)		0-1	7 (25.0)	6 (37.5)	0.244
Sin dato	4 (14.3)	4 (25)		2-5	10(35.7)	2 (12.5)	
<b>Tiempo con VIH (años)</b>				<b>Frecuencia de uso de condón</b>			
≤1	8 (28.6)	4 (25)	0.337	≥6	11 (39.3)	8 (50)	
1.1-5	7 (25)	8 (50)		<b>Diagnóstico de ITS</b>			
≥5.1	12 (42.9)	4 (25)		Nunca/<Mitad de veces	3 (10.7)	3 (18.8)	0.332
Sin dato	1 (3.6)	0 (0)	≥Mitad de veces	22 (78.6)	13(81.3)		
<b>Conteo de CD4 (células/ml)</b>				<b>Siempre</b>			
0-350	11 (39.3)	5 (31.3)	0.795	Siempre	3 (10.7)	0 (0)	
351-500	5 (17.9)	3 (18.8)		VPH o condilomas	7 (25.0)	1 (6.3)	0.296
≥501	11 (39.3)	8 (50)		Otra ITS	12 (42.9)	9 (56.3)	
Sin dato	1 (3.6)	0 (0)		No tiene	9 (32.1)	6 (37.5)	
<b>Estatus de CV</b>							
Detectable ( $\mu=3.01$ , IC <sub>95%</sub> 2.66-3.35)	16 (57.1)	8 (50.0)	0.418				
Indetectable	10 (35.7)	8 (50)					
Sin dato	2 (7.1)	0 (0)					
<b>Tiempo con TARA (años)</b>							
No ha iniciado	4 (14.3)	2 (12.5)	0.707				
≤1	6 (21.4)	6 (37.5)					
>=1.1-10	13 (46.4)	7 (43.8)					
≥10.1	4 (14.3)	1 (6.3)					
Sin dato	1 (3.6)	0 (0)					

**Tabla 9. Asociación de características de HSH infectados con VPH 18**

Características demográficas y clínicas				Características de comportamiento sexual			
Variable	Persistencia	Eliminación	p	Variable	Persistencia	Eliminación	p
<b>Edad</b>				<b>Edad de inicio de sexo anal</b>			
18-30	3 (20)	6 (60.0)	<b>0.025</b>	≤15	4 (26.7)	4 (40.0)	0.318
31-40	5 (33.3)	4 (40.0)		16-18	9 (60.0)	3 (30.0)	
≥41	7 (46.7)	0 (0)		≥19	2 (13.3)	3 (30.0)	
<b>Escolaridad</b>				<b>Edad de la pareja de 1ª relación sexual</b>			
Básica	2 (13.3)	3 (30.0)	0.584	≤18	7 (46.7)	2 (20.0)	0.227
Media superior	8 (53.3)	4 (40.0)		19-29	4 (26.7)	6 (60.0)	
Superior	5 (33.3)	3 (30.0)		≥30	4 (26.7)	2 (20.0)	
<b>Fumar en últimos 6 meses</b>				<b>No. de parejas sexuales hombres en toda la vida</b>			
Si	9 (60.0)	4 (40.0)	<b>0.065</b>	≤19	1 (6.7)	4 (40.0)	0.101
No	1 (6.7)	3 (30.0)		20-199	7 (46.7)	4 (40.0)	
Nunca he fumado	4 (26.7)	0 (0)		≥200	7 (46.7)	2 (20.0)	
Sin dato	1 (6.7)	3 (30.0)		Sin dato			
<b>Frecuencia para tomar ≥5 copas de alcohol</b>				<b>No. de parejas ocasionales</b>			
Diario/1-5 por semana	1 (6.7)	1 (10.0)	0.955	No ha tenido	0 (0)	2 (20.0)	0.121
1-4 al mes	3 (20.0)	2 (20.0)		≤10	2 (13.3)	3 (30.0)	
Nunca/1-2 por año	11 (73.3)	7 (70.0)		11-150	7 (46.7)	4 (40.0)	
<b>Consumo de drogas en últimos 6 meses</b>				≥151	10 (35.7)	6 (37.5)	
Si	8 (53.3)	6 (60.0)	0.134	<b>No. de parejas en últimos 6 meses</b>			
No	6 (40.0)	1 (10.0)		0-1	4 (26.7)	5 (50.0)	0.488
Sin dato	1 (6.7)	3 (30.0)		2-5	4 (26.7)	2 (20.0)	
<b>Tiempo con VIH (años)</b>				≥6	11 (39.3)	8 (59)	
≤1	5 (33.3)	5 (50.0)	0.535	<b>Frecuencia de uso de condón</b>			
1.1-5	6 (40.0)	4 (40.0)		Nunca/<Mitad de veces	5 (33.3)	1 (10.0)	0.405
≥5.1	4 (26.7)	1 (10.0)		≥Mitad de veces	8 (53.3)	7 (70.0)	
Sin dato				Siempre	2 (13.3)	2 (20.0)	
<b>Conteo de CD4 (células/ml)</b>				<b>Diagnóstico de ITS</b>			
0-350	7 (46.7)	7 (70.0)	0.195	VPH o condilomas	3 (20.0)	4 (40.0)	0.551
351-500	4 (26.7)	0 (0)		Otra ITS	8 (53.3)	4 (40.0)	
≥501	4 (26.7)	3 (30.0)		No tiene	4 (26.7)	2 (20.0)	
Sin dato							
<b>Estatus de CV</b>							
Detectable ( $\mu=3.01$ , IC <sub>95%</sub> 2.66-3.35)	8 (53.3)	7 (70.0)	0.574				
Indetectable	6 (40.0)	2 (20.0)					
Sin dato	1 (6.7)	1 (10.0)					
<b>Tiempo con Tarv (años)</b>							
No ha iniciado	3 (20.0)	2 (20.0)	0.323				
≤1	3 (20.0)	4 (40.0)					
≥1.1-10	9 (60.0)	3 (30.0)					
≥10.1	0 (0)	1 (10.0)					
Sin dato							

---

#### X.4 Análisis multivariado.

Se realizaron dos modelos multivariados a partir de los resultados del análisis bivariado. En el modelo de VPH 16 se observa que las variables “fumar en los últimos 6 meses”, “número de parejas sexuales hombres en toda la vida”, “número de parejas sexuales en los últimos 6 meses”, “frecuencia de uso de condón”, “conteo de CD4” y “carga viral de VIH” expresada en logaritmo base 10, influyen de manera simultánea sobre la carga viral relativa de VPH 16, con diferencias marginales y estadísticamente significantes.

De acuerdo al modelo, si todas las variables se mantienen constantes, al cambio de una muestra de eliminación a una muestra de persistencia le corresponde un incremento en la cuantificación viral de VPH 16 de 4.08 veces, con una diferencia marginalmente significativa ( $p=0.065$ ).

Con respecto a la variable de fumar, se observó que la cuantificación viral de VPH incrementa 2.4 veces del grupo de HSH que nunca han fumado a los HSH que no fuman, y este aumento se mantiene entre los HSH que no fuman con respecto a los HSH que fuman, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.034$ ).

Del comportamiento sexual, mediante el modelo de regresión lineal multivariado, se encontró que por cada aumento de una pareja sexual en los últimos 6 meses entre los HSH, hay un incremento de 1.03 veces en la cuantificación viral de VPH 16 ( $p=0.037$ ).

En cuanto a las variables clínicas, la carga viral de VIH se relacionó de manera negativa con la carga viral relativa de VPH 16, ya que esta disminuye 2 veces la cuantificación viral cuando aumenta un logaritmo en la carga viral de VIH, con un valor estadísticamente significativo ( $p=0.003$ ), y finalmente, se observó que un aumento en el número de células CD4/ml, disminuye 1 vez la cuantificación viral de VPH 16, aunque sin un valor de significancia estadística (Tabla 10).

**Tabla 10.** Modelo de regresión multivariada de VPH 16.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Sig.
	B	10 <sup>x</sup>	Error Std.
1 Constante	1.198	.752	.120
Persistencia vs eliminación	<b>.611</b>	<b>4.08</b>	<b>.065</b>
Fumar	.381	<b>2.4</b>	<b>.034</b>
Parejas en toda la vida	.000	1.0	.153
Parejas en últimos 6 meses	.011	<b>1.0</b>	<b>.037</b>
Frecuencia de uso de condón	.524	3.3	.165
Conteo de células CD4	-.001	1.0	.096
Carga viral de VIH (log <sub>10</sub> )	-.300	<b>2.0</b>	<b>.003</b>

Variable dependiente: logaritmo de la cuantificación viral de VPH 16; 10<sup>x</sup>: antilogaritmo de B, representando el número de veces que aumenta la cuantificación viral de VPH 16.

En el modelo elegido para VPH 18, se observó que no existen otras variables que de manera simultánea modifiquen la cuantificación viral de VPH.

Se observaron dos variables que fueron estadísticamente significativas en el modelo, sin embargo, estas contribuyen para que la relación de la cuantificación viral con la persistencia o eliminación de VPH 18 sea nula (B=-0.075), además de que no sea estadísticamente significativa (p=0.853) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Modelo de regresión multivariada de VPH 18.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Sig.
	B	10 <sup>x</sup>	Error Std.
1 Constante	.563	0.645	.394
Persistencia vs Eliminación	-.075	-1.2	.853
Edad	.026	1.0	.212
Fumar en últimos 6 meses	.366	2.3	.080
Consumo de drogas	-.800	-2.0	.017
Tiempo de tratamiento ARV	.000	1	.217

Variable dependiente: logaritmo de cuantificación viral de VPH 18; 10<sup>x</sup>: antilogaritmo de B, representando el número de veces que aumenta la cuantificación viral de VPH 18.

---

## **XI. Discusión.**

La prevalencia de VPH de alto riesgo y la persistencia de estos tipos oncogénicos han sido detectados en pacientes con cáncer anal entre un 70% y un 100%, dependiendo del origen, la localización, la orientación sexual y el estatus de VIH<sup>30</sup>; aunque el cáncer anal es poco común entre hombres en general, hombres que tienen sexo con hombres que practican relaciones anales receptivas, parecen estar en mayor riesgo para esta neoplasia<sup>31</sup>. En esta población, la prevalencia de VPH ha sido mayor en aquellos HSH coinfectados con el VIH, encontrándose una prevalencia de más del 80%<sup>17,31-34</sup>, mientras que entre HSH VIH negativos, la prevalencia de VPH es casi del 70%<sup>19,31,35</sup>.

La prevalencia de VPH de alto riesgo encontrada en nuestro estudio de más del 86%, es similar a las prevalencias encontradas entre HSH VIH positivos. Posiblemente, la alta prevalencia encontrada en esta población se deba a comportamientos sexuales de riesgo, tal como las relaciones sexuales ano-receptivas; ya que al compararse con hombres que no tienen sexo con hombres la prevalencia de VPH es menor; por ejemplo, entre jóvenes universitarios de Cuernavaca, Morelos la prevalencia de VPH fue del 17.4%<sup>36</sup> y entre usuarios de drogas inyectadas se encontró una prevalencia del 46%<sup>37</sup>.

La mayoría de las infecciones anales de VPH se han asociado a infecciones múltiples, las prevalencias observadas oscilan entre un 60 y un 90% en HSH VIH positivos<sup>32,34,37</sup>, la prevalencia entre los individuos de nuestro estudio debido a infecciones por más de un tipo de VPH, se encontró dentro de tal intervalo (85.1%). Entre los tipos de VPH mayormente detectados en HSH VIH positivos, se encuentra el VPH 16 y VPH 18<sup>31,33,37</sup>, del mismo modo que en nuestro estudio, encontrándose el VPH 16 con una prevalencia mayor que el VPH 18 (22% vs 8.4%).

---

Por otro lado, ya que la mayoría de las infecciones anales debido a otros tipos de VPH de alto riesgo fueron en presencia de VPH 16 y VPH 18, sería importante determinar qué otros tipos de VPH de alto riesgo podrían estar asociados con infecciones anales, probablemente en mayor o igual proporción que el tipo 16 y 18, debido a que otros tipos de VPH como el 6, 39, 42, 45, 51, 52, 59 y 84 también han sido detectados entre HSH VIH positivos, con prevalencias de alrededor del 20%, tasas de eliminación de 6 casos por 1000 personas-meses y tasas de incidencia que van de 2-10 nuevos episodios por 1000 personas-meses<sup>13,38</sup>.

Con respecto a la carga viral de VPH, en mujeres se ha visto que ésta se relaciona con la progresión de la enfermedad a cáncer cervicouterino, y que infecciones persistentes con tipos oncogénicos de VPH, tal como VPH 16 y VPH 18, con cargas virales elevadas, son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer y son buenos predictores de la duración de la infección<sup>33,39-41</sup>; por comparación, una carga viral alta de VPH de alto riesgo podría ser un factor predictor para neoplasias intraepiteliales anales (NIA)<sup>33</sup>.

En nuestro estudio, encontramos que la carga viral de VPH 16 fue mayor en aquellos individuos que presentaron persistencia en comparación con los que lo eliminaron (Me=13.1 vs Me=2.5; p=0.014), tal relación no se observó para VPH 18 (Me 14.6 vs Me 14.4; p=0.333). En mujeres, infecciones persistentes de VPH 16 y de VPH 18, se han asociado en el 50% y 30% respectivamente<sup>42,43</sup> con la presencia de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y con el desarrollo de cáncer cervicouterino; en cáncer anal, tanto en hombres como en mujeres la prevalencia de VPH 16 es mayor que la prevalencia de VPH 18 (80-90% vs 2%)<sup>44,45</sup>, lo cual es mucho mayor que la prevalencia observada en cáncer cervicouterino.

Esta diferencia en las prevalencias podría sugerir que el no haber encontrado asociación entre la carga viral de VPH 18 y su persistencia, puede explicarse debido a que la prevalencia de este tipo viral es tan baja que no es posible encontrar la

---

asociación. Entre hombres heterosexuales VIH negativos y positivos, una mayor carga viral de VPH de alto riesgo detectada al inicio del estudio en muestras de pene, se asoció con una probabilidad mayor de persistir a los 6 y 12 meses, con una persistencia de largo plazo más frecuente entre hombres VIH positivos<sup>46</sup>.

La comparación de una carga viral alta o baja de VPH se ha dificultado, ya que la forma de cuantificar el ADN de VPH difiere de acuerdo a cada estudio realizado. En nuestro estudio utilizamos el método  $2^{-\Delta Ct}$ , una variación del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , mediante el cual obtuvimos valores de la presencia de un gen viral con respecto a la cantidad de un gen humano<sup>47</sup>.

A partir de este método se determinó la carga viral de VPH de manera relativa a  $\beta$ -globina, tomando en cuenta el valor del ciclo umbral del VPH detectado y el valor del ciclo umbral del gen de  $\beta$ -globina obtenido a partir de un equipo automatizado de PCR en tiempo real, así, mientras se detectaba si un individuo estaba infectado con VPH 16 o 18, se conocía cuantas veces más se expresaba el gen con respecto a un gen constitutivo sin necesidad de utilizar una técnica alterna para la determinación de la carga viral. Por otro lado, ya que en nuestro estudio no era factible determinar la cantidad específica de muestra biológica obtenida de cada individuo, debido a que se obtuvo a partir de un exudado anal y tal variable podría ser modificada de acuerdo a la manera de tomar la muestra, se decidió obtener la carga viral a partir de una cuantificación relativa, para comparar entre genes de un mismo individuo sin necesidad de comparar con curvas estándar obtenidas de muestras en las que se conoce el número de copias de VPH, tal como se hace mediante la cuantificación absoluta.

En otros estudios, la cuantificación viral se ha realizado determinando el número de copias de ADN de VPH/ng de ADN total de la muestra<sup>32</sup> mediante clonación de plásmidos que contienen el gen de VPH 16, VPH 18 y de un gen constitutivo<sup>33</sup>, para determinar las copias de ADN de VPH por copias del gen de  $\beta$ -globina<sup>48</sup>, o las copias de ADN de VPH por  $\mu$ l/copias de  $\beta$ -globina por  $\mu$ l<sup>31</sup>, y tomando como referencia células transformadas con VPH 16 o 18 para determinar el número de copias de

---

ADN de VPH/10<sup>6</sup> células<sup>49</sup>. Sin embargo, aunque la cuantificación viral es diferente, los estudios concuerdan en que la persistencia del virus se relaciona con una mayor carga viral y que esta persistencia, además de la presencia de VPH de tipo oncogénico, lleva al desarrollo de neoplasias intraepiteliales anales precursoras del cáncer anal.

En hombres que presentan infecciones por múltiples tipos de VPH han sido más comunes las lesiones intraepiteliales escamosas<sup>31</sup>. Aunque la diferencia de las cargas virales en coinfecciones entre HSH VIH positivos que encontramos no fue significativa, se observa una mayor carga viral en infecciones debido a múltiples tipos de VPH; en hombres universitarios que no tenían sexo con hombres, la carga viral también fue mayor en infecciones múltiples con respecto a infecciones simples, sin embargo esta diferencia no fue significativa<sup>36</sup>, además de que VPH 16 ya sea en infección simple o en coinfección presenta una carga viral más alta que otros tipos virales<sup>36</sup>, lo que podría determinar una mayor persistencia del virus tanto en mujeres como en HSH VIH positivos.

En mujeres, las cargas virales de VPH 16 y VPH 18 han sido mayores con coinfecciones de VPH en diferentes visitas secuenciales que con una coinfección reciente<sup>40</sup>. Aunque el VPH 16 y VPH 18 puede causar una proporción significativa de las NIA, el alto número de infecciones múltiples, y el tiempo de retención prolongado para la mayoría de los tipos de VPH indican que muchos genotipos diferentes de VPH 16 y VPH 18 también pueden estar implicados en la carcinogénesis anal<sup>38</sup>.

Al comparar las tasas de incidencia y eliminación de VPH 16 y VPH 18 entre los individuos de nuestro estudio con un trabajo realizado en una población similar por Pokomandy *et al.*<sup>38</sup>, se observaron diferencias; las tasas de incidencia fueron ligeramente mayores en nuestro estudio tanto para VPH 16 (12.9 vs 10.8 episodios detectados por 1000 personas/meses) como para VPH 18 (6.8 vs 4.4 episodios detectados por 1000 personas/meses); un comportamiento similar se observó en las tasas de eliminación de VPH 16 (35.08 vs 12.2 episodios detectados por 1000 personas/meses) y de VPH 18 (56.6 vs 20.4 episodios detectados por 1000

---

personas/meses), estas diferencias podrían estar asociadas a otros factores tal como la terapia antirretroviral o la carga viral de VIH al inicio y durante el seguimiento del estudio. En ambos estudios se observan mayores tasas de incidencia para VPH 16 con respecto a VPH 18, y tasas de eliminación más bajas para VPH 16.

Además de las infecciones con múltiples tipos de VPH, principalmente VPH de alto riesgo, la inmunosupresión causada por el VIH entre los HSH podría facilitar o acelerar las consecuencias patológicas de la infección por VPH en el ano, tal como se muestra en el cérvix, permitiendo la replicación del virus<sup>31</sup>; así, la infección por VPH anal puede comportarse tanto como una infección de transmisión sexual como una infección oportunista durante la enfermedad del VIH<sup>37</sup>. La infección por VIH no sólo incrementa la susceptibilidad a la persistencia de VPH sino que también incrementa la adquisición de nuevas infecciones por VPH y el riesgo de reactivación de infecciones latentes<sup>50</sup>.

Tanto VPH 16 como VPH 18 son clasificados como tipos de VPH de AR, en HSH VIH positivos no se han estudiado amplia y específicamente para asociar con la persistencia o eliminación en un individuo dentro de un periodo de tiempo, por lo que nuestros resultados son comparados con estudios en HSH VIH positivos dirigidos a infecciones con VPH de AR, incluidos VPH 16 y 18. La persistencia que encontramos de VPH 16 fue del 63.63% (28/44) y la persistencia de VPH 18 fue del 60% (15/25), con ello observamos que la persistencia de estos tipos de VPH es muy parecida a la tasa de persistencia que existe entre HSH VIH positivos con infecciones por diversos tipos de VPH de AR (71.4%, 10/14)<sup>50</sup>, sin embargo, esto podría deberse a que la mayoría de las infecciones encontradas por VPH 16 y VPH 18 se encuentran como coinfecciones con otros tipos de VPH de AR y por lo tanto estos tipos también estarían influyendo en la elevada tasa de persistencia de VPH 16 y VPH 18.

La mayoría de los estudios se han enfocado a buscar la prevalencia de VPH, principalmente de alto riesgo u oncogénico, en infecciones anales de HSH VIH positivos sin asociar con características socio-demográficas o con la persistencia y

---

eliminación específicamente de VPH 16 y VPH 18, Pokomandy *et al.*<sup>38</sup> y Villanueva *et al.*<sup>17</sup> son algunos grupos que han asociado la detección de VPH a características sociodemográficas entre este grupo de la población. Algunas características como la edad, el nivel de educación media superior y superior, así como fumar, el consumo de drogas y el comportamiento sexual son muy parecidas a las características de los HSH incluidos en nuestro estudio.

Por análisis bivariado, la edad estuvo asociada de manera significativa con la persistencia de VPH 18, mientras que para VPH 16 no fue significativo pero se observó el mismo comportamiento, otros estudios muestran una tendencia similar, una mayor edad entre HSH VIH positivos se ha asociado a un mayor número de infecciones por VPH de AR<sup>34</sup> y a un mayor riesgo de infección oncogénica entre HSH VIH negativos<sup>18</sup>, aunque sin asociación con la persistencia<sup>21</sup>. Mientras en mujeres el riesgo de infección por VPH disminuye con la edad, parece que los hombres tienen un riesgo estable de adquirir nuevas infecciones a lo largo de su vida<sup>51</sup>. Entre HSH VIH negativos, la eliminación de VPH oncogénico es más rápida al incrementar la edad mientras que el tiempo de eliminación de cualquier tipo de VPH es mayor en hombres de 18-30 años<sup>51</sup>.

Fumar se asoció de manera estadísticamente significativa por análisis bivariado a la persistencia de VPH 18 pero no de VPH 16, contrario a lo que se ha encontrado entre hombres VIH negativos, en donde la persistencia de cualquier tipo de VPH se asoció con tabaquismo<sup>21</sup>; aunque el porcentaje de HSH que eliminaron VPH 18 entre HSH VIH positivos es parecida al porcentaje de HSH en los que persistió del grupo que fumó en los últimos 6 meses, tal resultado podría estar afectado por el tamaño de muestra pequeño que se tiene de individuos que eliminaron VPH 18.

A partir del mismo análisis, se encontró que una alta frecuencia de consumo de alcohol y el consumo de drogas se relacionaban con la eliminación de VPH 16, resultado que mediante análisis bivariado entre hombres que tienen sexo con hombres y mujeres (HSHM) es contradictorio, ya que en ellos, el riesgo de infección

---

por VPH oncogénico es mayor entre los que consumieron alcohol en meses recientes, sin embargo, por análisis multivariado el consumo de alcohol con menor frecuencia aumentó el riesgo de infección por VPH<sup>18</sup>.

La infección por VPH oncogénico se ha asociado con el comportamiento sexual de los HSH, tanto para VIH positivos como para VIH negativos, principalmente asociándose con un mayor número de parejas sexuales<sup>34,51</sup>, en nuestro estudio, mediante análisis bivariado se observó la misma relación con un mayor número de parejas sexuales, ya que al aumentar el número de parejas la persistencia fue mayor y aquellos HSH que eliminaron tuvieron un menor número de parejas sexuales, esta relación se corroboró por análisis multivariado para VPH 16, con un valor estadísticamente significativo.

Por otro lado, en HSH VIH positivos una mayor carga viral de VIH y un número de células CD4 bajo, han sido factores de riesgo para la infección por VPH y predictores de la detección del virus<sup>17,31,34,50</sup>, en nuestro estudio se encontró la misma relación para la persistencia VPH 16, entre los HSH con una carga viral de VIH detectable y un conteo de células CD4 bajo se observó un mayor porcentaje de persistentes, mientras que con carga viral de VIH indetectable y un conteo de CD4 alto, se observó mayor eliminación del virus. Aunque esta asociación no fue estadísticamente significativa, tales variables son de importancia biológica por la relación que tienen con la respuesta del sistema inmune, ya que, por un lado, la reducción en la carga viral de VIH en la mucosa anal podría reducir la replicación de VPH y subsecuentemente favorecer la eliminación de VPH<sup>52</sup>, y por otro lado la importancia de las células CD4 que junto con las células CD8 son responsables de erradicar infecciones por VPH resultando en infecciones transitorias<sup>53</sup>.

La TARA no se asoció de manera estadísticamente significativa con la persistencia o eliminación de VPH en nuestro estudio, ya que no tiene ningún efecto directo sobre la infección por VPH, la persistencia de VPH o la incidencia de NIA; se ha observado que en HSH VIH positivos, tiene beneficios no sólo en la progresión de lesiones

---

anales pre-malignas sino también en la prevalencia de tales lesiones<sup>54</sup>. Estos beneficios, derivan del hecho de que al disminuir la carga viral de VIH debido a la TARAA en la mucosa anal podría reducir la replicación de VPH y como consecuencia, favorecer la eliminación del VPH debido al aumento de células CD4<sup>52</sup>.

En los resultados del análisis de la carga viral relativa de VPH 16 se encontró que esta se asocia con la persistencia, resultado que mediante el análisis de regresión lineal multivariada se corroboró. En este análisis, los coeficientes de cada variable no son independientes entre sí, sino que cada uno se ajusta teniendo en cuenta la presencia del resto de las variables independientes<sup>55</sup> que influyen sobre la variable dependiente (cuantificación viral de VPH), por ello aunque fumar no se asoció por análisis bivariado a la persistencia de VPH 16 mediante regresión lineal multivariada, se asoció a la cuantificación viral de VPH al igual que el conteo de CD4, el cual tiene la misma asociación entre HSH infectados con VPH de AR<sup>50</sup>.

Se confirmó también que un mayor número de parejas sexuales no sólo se relaciona por análisis bivariado a la persistencia VPH 16, sino que de manera simultánea a otras variables como fumar y la carga viral de VIH se asocian de manera estadísticamente significativa a la cuantificación viral de VPH y por lo tanto a la persistencia o eliminación del virus.

Con respecto a VPH 18, la cuantificación viral del virus no estuvo relacionada con la persistencia y al realizar el análisis de regresión lineal multivariada, tampoco se identificaron características demográficas, clínicas o de comportamiento sexual que pudieran asociarse a la persistencia de VPH 18, ya que la diferencia de la cuantificación viral entre los HSH que eliminaron y aquellos en los que persistió el virus fue demasiado pequeña.

La principal limitación del presente estudio, fue que no se tuvo el control del momento en el que se tomó la muestra de los HSH al inicio del mismo, ya que no se sabe si el individuo que en la primera visita fue positivo tenía una infección por VPH

---

reciente, si se trataba de una reinfección o si la infección estaba por eliminarse, lo que se vio reflejado durante el análisis de la cuantificación viral de VPH. El escenario ideal, era tomar sólo aquellos HSH que en la primera visita fueron negativos a VPH, sin embargo, si se eliminaban a los otros HSH, el tamaño de la muestra disminuiría y no se hubiera obtenido ninguna asociación estadísticamente significativa de las variables demográficas, clínicas o de comportamiento sexual con la persistencia de VPH.

Por otro lado, la detección de VPH sólo se realizó de manera específica para VPH 16 y VPH 18, por ello, al realizar el análisis de la cuantificación viral no fue posible determinar cuáles eran los otros tipos de VPH de alto riesgo que influían sobre la persistencia del virus, no se determinó el número de tipos virales encontrados en un mismo individuo, y no fue posible detectar la proporción de otros tipos de VPH de alto riesgo entre la población de estudio.

Finalmente, los datos demográficos, clínicos y de comportamiento sexual obtenidos en la primera visita, pudieron haberse modificado durante el estudio de cohorte y por lo tanto influir sobre el cambio de la carga viral tanto de VPH 16 como de VPH 18, por lo que el análisis con datos de las 3 o 4 visitas realizadas por cada individuo, podría permitir mejores asociaciones con el cambio en la cuantificación viral de VPH en cada una de las visitas.

---

## **XII. Conclusión.**

- La prevalencia de la infección anal por VPH 16 fue mayor que la prevalencia de VPH 18 entre HSH y que viven con VIH; más del 80% de las infecciones son coinfecciones, tales datos son similares a otros estudios realizados en poblaciones similares.
- El equipo automatizado de PCR en tiempo real utilizado, fue muy accesible para realizar la cuantificación viral, ya que además de detectar los tipos de VPH 16 y 18, los valores de Ct obtenidos del gen de  $\beta$ -globina permitieron determinar la carga viral de VPH con respecto a este gen. Los datos de las cargas virales obtenidas, generaron resultados confiables y no hubo necesidad de comparar con otro método.
- Encontramos que la carga viral de VPH 16 entre HSH y que viven con VIH, se asoció con la persistencia del virus en el canal anal tal como se observa en el cérvix de mujeres, aunque para VPH 18 no se observó la misma relación.
- Entre las variables analizadas, el número de parejas sexuales, el tabaco y la edad fueron factores que se asociaron de manera estadísticamente significativa con la persistencia de VPH 16.
- En general, entre los HSH y que viven con VIH, las variables que se modifican por la presencia de VIH, como el conteo de células CD4, influyen sobre la respuesta del sistema inmune afectando la persistencia de VPH de alto riesgo, aunque en el presente análisis tal asociación no se pudo comprobar.

---

### **XIII. Perspectivas.**

- La mayoría de las infecciones son debido a la presencia de múltiples tipos de VPH de alto riesgo, por lo que sería importante determinar cuáles son los otros de tipos de VPH asociados con infecciones anales, para poder evaluar la carga viral de aquellos genotipos con una igual o mayor proporción que VPH 16 o VPH 18.
- Podría proponerse un punto de corte de la carga viral de VPH 16 como indicador de la persistencia entre HSH y que viven con VIH y evaluarlos en estudios de seguimiento.
- Analizar los datos clínicos de la cohorte.

---

#### XIV. Referencias

1. De la Fuente-Villarreal D., Guzmán-López S., Barboza-Quintana O., González-Ramírez A. Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria* **12**, 231–238 (2010).
2. Zandberg, DP., Bhargava, R., Badin, S., Cullen, KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA. Cancer J. Clin.* **63**, 57–81 (2013).
3. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **110**, 525–541 (2006).
4. Hoory, T., Monie, A., Gravitt, P., Wu, TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* **107**, 198–217 (2008).
5. Steben, M., Duarte-Franco, E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol. Oncol.* **107**, S2–5 (2007).
6. Woodman, CBJ., Collins, SI., Young, LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 11–22 (2007).
7. Sirera, G., Videla, S., Herranz, P., Corzo-Delgado, JE., AIDS Study Group (Grupo de Estudio del Sida [GeSIDA]). Human papillomavirus and HIV/AIDS. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* **24 Suppl 2**, 40–46 (2006).
8. Bratcher J., Palefsky J. Anogenital Human Papillomavirus Coinfection and Associated Neoplasia in HIV-positive Men and Women. *The PRN Notebook* **13**, (2008).
9. Sánchez-Alemán, MA., Miranda-García, L., Vargas-Guadarrama, G., González-Rodríguez, A., Conde-González, C. Concordancia de VPH oncogénico en regiones anal y genital en una muestra de hombres que viven con VIH. *Enf. Inf. Microbiol* **32**, 132–144 (2012).
10. Hoots, BE., Palefsky, JM., Pimenta, JM., Smith, JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **124**, 2375–2383 (2009).
11. Sanabria Negrín, JG. Virus del Papiloma humano. *Rev. Cienc. Médicas Pinar RÍo* **13**, 168–187 (2009).

- 
12. Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., Contreras-Paredes, A., Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología* **4**, 205–216 (2009).
  13. Schiffman, M., Castle, PE., Jeronimo, J., Rodriguez, AC., Wacholder, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* **370**, 890–907 (2007).
  14. Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342–350 (2002).
  15. OMS | El tamizaje sigue siendo «la mejor inversión» para afrontar el cáncer del cuello uterino. WHO, Consultado el 04 de Agosto del 2014, en <<http://www.who.int/bulletin/volumes/89/9/11-030911/es/>>.
  16. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Consultado el 04 de Agosto del 2014, en <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)>.
  17. Villanueva, P., Díaz, P., Guido, M., Rangel, A., Sotelo, R. Prevalencia de virus de papiloma humano de alto riesgo en el epitelio anal de hombres VIH positivos. *Bioquímica* **27**, 94–102 (2002).
  18. Nyitray, A., Carvalho R., Baggio, ML, Lu, B., Smith, D., Abrahamsen, M., Papenfuss, M., Villa, L., Lazcano-Ponce, E., Giuliano, A. Age-specific prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus (HPV) among men who have sex with women and men who have sex with men: the HPV in men (HIM) study. *J. Infect. Dis.* **203**, 49–57 (2011).
  19. Charúa-Guindic, L., Esquivel-Ocampo, EA., Jiménez-Bobadilla, B., Leal-Tamez, M., Avendaño-Espinosa, O., Anal intraepithelial neoplasia (NIA) and infection with human papillomavirus (HPV) in anoreceptive patients. *Rev. Gastroenterol. México* **74**, 195–201 (2009).
  20. Mayrand, MH., Coutlée, F., Hankins, C., Lapointe, N., Forest, P., de Ladurantaye, M., Roger, M. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3388–3393 (2000).
  21. Nyitray, AG., Carvalho, RJ., Baggio, ML., Smith, D., Abrahamsen, M., Papenfuss, M., Lin, HY., Quiterio, M., Salmerón, J., Lazcano-Ponce, E., Villa, LL., Giuliano,
-

- 
- AR. Six-month incidence, persistence, and factors associated with persistence of anal human papillomavirus in men: the HPV in men study. *J. Infect. Dis.* **204**, 1711–1722 (2011).
22. Palefsky, J. Biology of HPV in HIV infection. *Adv. Dent. Res.* **19**, 99–105 (2006).
23. Swan, DC., Tucker, RA., Tortolero-Luna, G., Mitchell, MF., Wideroff, L., Unger, ER., Nisenbaum, RA., Reeves, WC, Icenogle, JP. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1030–1034 (1999).
24. Zur Hausen, H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **111**, 581–587 (1999).
25. Lillo, FB., Lodini, S., Ferrari, D., Stayton, C., Taccagni, G., Galli, L., Lazzarin, A., Uberti-Foppa, C. Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **40**, 451–457 (2005).
26. Huang, S., Tang, N., Mak, WB., Ericjson, B., Salitura, John., Li, Y., Krumpe, E., Schneider, G., Yu, H., Robinson, J., Abravaya, K. Principles and analytical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **45 Suppl 1**, S13–17 (2009).
27. Abbot. Manual de Procedimientos de Abbot RealTime High Risk HPV. (2010).
28. Prácticas de Experimentación Bioquímica. Consultado el 04 de Agosto del 2014, en<[http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Metodologia\\_y\\_Experimentacion\\_Bioquimica/Cuestiones\\_exp\\_bioq.pdf](http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Metodologia_y_Experimentacion_Bioquimica/Cuestiones_exp_bioq.pdf)>.
29. Caballero, OL., Villa, LL., Simpson, AJ. Low stringency-PCR (LS-PCR) allows entirely internally standardized DNA quantitation. *Nucleic Acids Res.* **23**, 192–193 (1995).
30. Pereira, AC., Lacerda, HR., Barros, RC. Diagnostic methods for prevention of anal cancer and characteristics of anal lesions caused by HPV in men with HIV/AIDS. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* **12**, 293–299 (2008).
-

- 
31. Friedman, HB., Saah, AJ., Sherman, ME., Busseniers, AE., Blackwelder, AE., Kaslow, RA., Ghaffari, AM., Daniel, RW, Shah, KV. Human papillomavirus, anal squamous intraepithelial lesions, and human immunodeficiency virus in a cohort of gay men. *J. Infect. Dis.* **178**, 45–52 (1998).
  32. Pierangeli, A., Scagnolari, C., Degener, AM., Bucci, M., Ciardi, A., Riva, E., Indinnimeo, M., Mancini, G., D’Ettore, G., Vullo, V., Antonelli, G. Type-specific human papillomavirus-DNA load in anal infection in HIV-positive men. *AIDS Lond. Engl.* **22**, 1929–1935 (2008).
  33. Poizot-Martin, I., Henry, M., Benhaim, S., Obry-Roguet, V., Figarella, D., Tamalet, C. High level of HPV 16 and 18 DNA load in anal swabs from male and female HIV-1 infected patients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **44**, 314–317 (2009).
  34. Del Amo, J., González, C., Geskus, RB., Torres, M., Del Romero, J., Viciano, P., Masiá, M., Blanco, JR., Hernández-Novoa, B., Ortíz, M., CoRIS-HPV Study Group. What drives the number of high-risk human papillomavirus types in the anal canal in HIV-positive men who have sex with men? *J. Infect. Dis.* **207**, 1235–1241 (2013).
  35. Nyitray, AG., da Silva, RJ., Baggio, ML., Lu, B., Smith, D., Abrahamsen, M., Papenfuss, M., Quiterio, M., Villa, LL., Giuliano, AR. The prevalence of genital HPV and factors associated with oncogenic HPV among men having sex with men and men having sex with women and men: the HIM study. *Sex. Transm. Dis.* **38**, 932–940 (2011).
  36. Vera-Uehara, C., Sánchez-Alemán, MA., Uribe-Salas, FJ., Ramos-Castañeda, J., Olamendi-Portugal, ML., Conde-Glez, CJ. HPV infection, risk factors and viral load among Mexican male college students. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* **18**, 71–76 (2014).
  37. Piketty, C., Darragh, T., Da Costa, M., Bruneval, P., Heard, I., Kazatchkine, MD., Palefsky, J. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. *Ann. Intern. Med.* **138**, 453–459 (2003).
-

- 
38. De Pokomandy, A., Rouleau, D., Ghattas, G., Vézina, S., Coté, P., Macleod, J., Allaire, G., Franco, EL., Coutlée, F. Prevalence, clearance, and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *J. Infect. Dis.* **199**, 965–973 (2009).
  39. Flores, R., Beibei, L., Nielson, C., Abrahamsem, M., Wolf, K., Lee, JH., Harris, RB., Giuliano, AR. Correlates of human papillomavirus viral load with infection site in asymptomatic men. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **17**, 3573–3576 (2008).
  40. Ramanakumar, AV., Golcalves, O., Richardson, H., Tellier, P., Ferenczy, A., Coutlée, F., Franco, EL. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect. Dis.* **10**, 326 (2010).
  41. Xi, LF., Hughes, JP., Edelstein, ZR., Kiviat, NB., Koutsky, LA., Mao, C., Ho, J., Schiffman, M. Human Papillomavirus (HPV) type 16 and type 18 DNA Loads at Baseline and Persistence of Type-Specific Infection during a 2-year follow-up. *J. Infect. Dis.* **200**, 1789–1797 (2009).
  42. Smith, JS., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., Clifford, GM., Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer* **121**, 621–632 (2007).
  43. Pirog, EC., Lloveras, B., Molijn, A., Tous, S., Guimerá, N., Alejo, M., Clavero, O., Klaustermeier, J., Jenkins, D., Quint, W., Xavier-Bosch, F., Alemany, L., de Sanjosé, S. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. *Mod. Pathol.* (2014).
  44. Ouhoumane, N., Steben, M., Coutlée, F., Vuong, T., Forest, P., Rodier, C., Louchini, R., Duarte, E., Brassard, P. Squamous anal cancer: patient characteristics and HPV type distribution. *Cancer Epidemiol.* **37**, 807–812 (2013).
  45. Škamperle, M., Kocjan, B.J., Maver, P.J., Seme, K., Poljak, M. Human papillomavirus (HPV) prevalence and HPV type distribution in cervical, vulvar, and anal cancers in central and eastern Europe. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* **22**, 1–5 (2013).
-

- 
46. Grabowski, MK., Gray, RH., Serwadda, D., Kigozi, G., Gravitt, P., Nalugoda, F., Reynolds, S., Waver, M., Watya, S., Waver, M., Watya, S., Quinn, T., Tobian, A. High risk human papillomavirus viral load and persistence among heterosexual HIV-negative and HIV-positive men. *Sex. Transm. Infect.* **90**, 337–343 (2014).
  47. Castanera-Andrés R. Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de *Pleurotus ostreatus*. (2011).
  48. Kreuter, A., Wieland, U., Gambichler, T., Altmeyer, P., Pfister H., Tenner-Racz, K., Racz, P., Potthoff, A., Brockmeyer, NH. German Network of Competence HIV/AIDS, p16ink4a expression decreases during imiquimod treatment of anal intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-infected men and correlates with the decline of lesional high-risk human papillomavirus DNA load. *Br. J. Dermatol.* **157**, 523–530 (2007).
  49. Carcopino, X., Henry, M., Benoura, D., Fallabregues, AS., Richet, H., Boubli, L., Tamalet, C. Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J. Med. Virol.* **78**, 1131–1140 (2006).
  50. Parisi, SG., Cruciani, M., Scaggiante, R., Boldrin, C., Andreis, S., Dal Bello, F., Pagni, Silvana., Barelli, A., Sattin, A., Mengoli, C., Palú, G. Anal and oral human papillomavirus (HPV) infection in HIV-infected subjects in northern Italy: a longitudinal cohort study among men who have sex with men. *BMC Infect. Dis.* **11**, 150 (2011).
  51. Giuliano, AR., Lee, JH., Fulp, W., Villa, LL., Lazcano, E., Papenfuss, MR., Abrahamsen, M., Salmeron, J., Anic, GM., Rollison, DE., Smith, D. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet* **377**, 932–940 (2011).
  52. Hidalgo-Tenorio, C., Rivero-Rodríguez, M., Gil-Anguita, C., Lopez De Hierro, M., Palma, P., Ramírez-Taboada, J., Esquivias, J., López-Ruz, MA., Javier-Martínez, R., Pasquau-Liaño, J. Antiretroviral therapy as a factor protective against anal dysplasia in HIV-infected males who have sex with males. *PloS One* **9**, e92376 (2014).
-

- 
53. Kim, KH., Greenfield, WW., Cannon, MJ., Coleman, HN., Spencer, HJ., Nakagawa, M. CD4+ T-cell response against human papillomavirus type 16 E6 protein is associated with a favorable clinical trend. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **61**, 63–70 (2012).
54. Van der Snoek, EM., Van der Ende, ME., den Hollander, JC., Schutten, M., Neumann, HAM., van Doornum, GJJ. Use of Highly Active Antiretroviral Therapy Is Associated With Lower Prevalence of Anal Intraepithelial Neoplastic Lesions and Lower Prevalence of Human Papillomavirus in HIV-Infected Men Who Have Sex With Men: *Sex. Transm. Dis.* **39**, 495–500 (2012).
55. Consultado el 04 de agosto del 2014, en:  
<[http://pendientedemigracion.ucm.es/info/socivmyt/paginas/D\\_departamento/materiales/analisis\\_datosyMultivariable/18reglin\\_SPSS.pdf](http://pendientedemigracion.ucm.es/info/socivmyt/paginas/D_departamento/materiales/analisis_datosyMultivariable/18reglin_SPSS.pdf)>.