

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

**DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES CLÍNICOS Y
SOCIODEMOGRÁFICOS ASOCIADOS A LA
DISEMINACION ANAL Y GENITAL DEL VIRUS DEL
HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN HOMBRES QUE TIENEN
SEXO CON HOMBRES Y QUE VIVEN CON VIH.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

P R E S E N T A

IBT. DAYANA NICTÉ VERGARA ORTEGA

COMITÉ DE TESIS:

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ ALEMÁN
ASESOR: DR. EDGAR ENRIQUE SEVILLA REYES

CUERNAVACA, MORELOS AGOSTO 2014

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 7 |
| MARCO TEÓRICO | |
| Generalidades. | 10 |
| Epidemiología. | 11 |
| Estructura del Virus del Herpes Simplex tipo 2. | 13 |
| Ciclo de replicación viral. | 14 |
| Propiedades biológicas del Virus del Herpes Simplex tipo 2. | 16 |
| Características de la infección. | 17 |
| Diagnóstico. | 19 |
| Tratamiento para las infecciones por VHS-2. | 20 |
| JUSTIFICACIÓN | 22 |
| OBJETIVO GENERAL | 23 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| OBJETIVOS METODOLÓGICOS | 23 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL | 24 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | |
| Estudio madre. | 25 |
| Consideraciones éticas y de bioseguridad. | 27 |
| Selección de la población de estudio. | 28 |
| Determinación de la seroprevalencia de VHS-2. | 29 |

| | |
|---|---------|
| Extracción de DNA a partir de muestras de citología anal y de hisopados genitales. |29 |
| Detección de un fragmento de β -globina humana. |29 |
| Detección de un fragmento del VHS-2 por PCR punto final. Montaje de la técnica. |30 |
| Electroforesis en gel de agarosa. |32 |
| Fundamento del PCR tiempo real. |33 |
| Estandarización del PCR tiempo real para la detección de DNA de β -globina humana y DNA de VHS-2. |39 |
| Diseño bioinformático de oligonucleótidos para PCR en tiempo real. |42 |
| Análisis estadístico-epidemiológico. |46 |

RESULTADOS

| | |
|---|---------|
| Detección de DNA de VHS-2 en muestras de citología anal y de hisopados genitales por PCR punto final. |48 |
| Estandarización de la técnica de PCR tiempo real. |50 |
| Cuantificación relativa de muestras de hisopados genitales y de citología anal positivas a VHS-2. |56 |
| Análisis estadístico-epidemiológico. |63 |

DISCUSIÓN69

CONCLUSIONES84

LIMITACIONES DEL ESTUDIO86

| | |
|--|----------|
| PERSPECTIVAS |87 |
| ANEXO-1. Extracción de DNA por cromatografía de intercambio iónico, estuche comercial AmpliLute Liquid Media Extraction Kit de ROCHE. |89 |
| ANEXO-2. PCR punto final para la amplificación de un fragmento de 391pb del VHS-2. |90 |
| ANEXO-3. Electroforesis en gel de agarosa (porcentaje variable). |91 |
| ANEXO-4. PCR tiempo real para la amplificación y cuantificación de β -globina humana y VHS-2. |92 |
| ANEXO-5. Aprobación de ética del estudio madre. |94 |
| ANEXO-6. Consentimiento informado del estudio madre. |95 |
| ANEXO-7. Carta de autorización para el uso de muestras biológicas y base de datos del estudio madre. |98 |
| ANEXO-8. Recodificación de variables para el análisis estadístico-epidemiológico. |99 |
| ANEXO-9. Cascada de infecciones y procesos cancerosos que se desarrollan ante una depresión del Sistema Inmune. |100 |
| REFERENCIAS |101 |

INTRODUCCIÓN.

El Virus del Herpes Simplex tipo 2 (VHS-2) es un virus de DNA que pertenece a la familia *Herpesviridae*, la cual comprende un grupo de más de 120 virus que infectan a distintas especies animales, de los cuales, al menos 9 infectan al humano (Dockrell, 2003).

Para el año 2003, la prevalencia mundial estimada para el VHS-2 fue de 535.5 millones de infectados (16.2% de la población mundial), con una incidencia anual de 23.6 millones de casos, los dos datos anteriores entre personas de 15 a 49 años (McClelland et al., 2002; Tronstein et al., 2011).

El VHS-2 causa úlceras genitales, las cuales están asociadas con el incremento en la susceptibilidad a la infección por VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) hasta, 3 veces más en comparación con las personas no infectadas por VHS-2 (Patel et al., 2012). Además, los individuos infectados por VIH presentan más recurrencias de úlceras herpéticas con respecto a aquellos individuos no infectados (McClelland et al., 2002). Aún en ausencia de úlceras, la diseminación del VHS-2 en el tracto genital y anal está altamente relacionada con infecciones por VIH. Entonces, si la diseminación del VHS-2 está asociada con la transmisión del VIH, la supresión del primero podría proveer un medio importante para disminuir la diseminación del VIH (McClelland et al., 2002; Patel et al., 2012).

El VHS-2 establece una infección latente en las neuronas de los ganglios sacros sensoriales, sin embargo el virus puede replicarse en muchos tejidos humanos principalmente la piel, las mucosas y el tejido nervioso. De manera periódica, aquellas infecciones latentes presentan algunas reactivaciones del virus que se manifiestan con la aparición de úlceras. A pesar de que las úlceras provocadas por VHS-2 están acompañadas de dolor y picazón, hasta el 90% de las infecciones son asintomáticas y pasan desapercibidas. La diseminación del VHS-2 puede presentarse tanto en individuos sintomáticos como en asintomáticos. Una de las consecuencias de las infecciones asintomáticas, es que, aún cuando las

terapias para el VHS-2 podrían tener un impacto en el control y decremento de la diseminación del VIH, muchos individuos ignoran que están infectados con alguno o con ambos virus (Van de Perre et al., 2008; Patel et al., 2012; Schiffer et al., 2009).

La evidencia epidemiológica existente sugiere una alta probabilidad de coinfección del VHS-2 con el VIH, debido a que las dos infecciones comparten rutas de transmisión. La sinergia negativa entre VHS-2 y VIH, podría ser un factor primordial en las transmisión del VIH; además, esta sinergia tiene una relevancia particular para algunos grupos de riesgo como los trabajadores del sexo comercial, la población de África sub-Sahariana y los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), grupos en los cuales se estima un porcentaje de coinfección de entre el 50-90% (Patel et al., 2012; Rebbapragada et al., 2007).

Algunos estudios han sugerido que la infección por VHS-2, además de facilitar la adquisición de VIH, en aquellos individuos coinfectados puede acelerar la progresión a Sida. La historia natural del VHS-2 también se ve afectada, la duración de las úlceras superan los 5 días promedio normales, y la frecuencia de las lesiones se ve incrementada (Van de Perre et al., 2008).

Desde la primera descripción del Sida en la década de los 80's, muchas infecciones mucocutáneas causadas por el VHS-2 han sido tomadas como parte de la presentación clínica del mismo, incluso han sido incluidas en la lista de infecciones oportunistas asociadas con el Sida (Van de Perre et al., 2008).

En este trabajo se pretende determinar los factores clínicos y sociodemográficos asociados a la diseminación anal y genital del VHS-2, en una población de hombres que tienen sexo con hombres y que viven con VIH.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Los estudios realizados por Tronstein y colaboradores sobre diseminación del VHS-2, definen a la diseminación genital como la detección de VHS-2 en el área genital. La definición no diferencia entre la detección del virus cuando se presentan úlceras y cuando no se presentan, de tal manera que la diseminación del VHS-2 es un problema que atañe a los individuos infectados con VHS-2 sintomáticos y asintomáticos (Tronstein et al., 2011).

De acuerdo con la clasificación de la transmisibilidad de las enfermedades infecciosas, el VHS-2 se agrupa en las infecciones virales de transmisión directa. La transmisión directa del VHS-2 se da cuando el individuo infectado excreta partículas virales a través de sus secreciones, la piel o las membranas mucosas. La transmisión del VHS-2 se ve afectada por el proceso de diseminación viral. La diseminación de un virus se entiende como la presencia de este en algún tejido o fluido corporal, que tenga alta probabilidad de entrar en contacto con otro individuo. En el caso del VHS-2, la diseminación se da cuando el virus deja su estado de latencia en el tejido neuronal y se alberga en las mucosas, piel y fluidos del individuo infectado. Una agravante para este proceso, es que puede darse durante periodos asintomáticos. A su vez el VHS-2 crea lesiones microscópicas que representan una entrada/salida directa del cuerpo lo que puede desencadenar en su transmisión y la de muchos otros virus, entre ellos el VIH. Al resultado de la transmisión de más de un virus a un solo huésped se le conoce como coinfección; siendo una de las más comunes la que se da entre VHS-2 y VIH (Tronstein et al., 2011; Schiffer et al., 2009). Por lo tanto, la diseminación del VHS-2 en el tracto genital, anal o alguna otra mucosa, permite y favorece que el virus se ponga en contacto con la piel, mucosas o heridas de otra persona, lo que mantiene un proceso de transmisión del virus (Schiffer et al., 2009).

Así como la transmisión permanente del VHS-2 constituye un problema de salud pública por sí solo, esta infección forma parte de las infecciones “oportunistas” que afectan a los individuos que viven con VIH. Cuando una persona está infectada

con VIH, su sistema inmunológico se ve afectado, debido a una notable disminución en las cuentas de linfocitos T CD4⁺. En ese momento, el sistema inmune se encuentra disminuido, diversos microorganismos son capaces de producir infecciones bacterianas, por parásitos, por virus y hongos, además de algunos tipos de neoplasias (Ramírez Pineda et al., 2007).

En la primoinfección por el VHS-2, éste se replica en células epiteliales de la piel y mucosas, causando lisis celular y contagio a células vecinas, desencadenando una reacción inflamatoria. Si la replicación viral continúa, puede ocurrir una diseminación a través del torrente sanguíneo, afectando diferentes órganos. En el caso de los pacientes inmunosuprimidos hay un compromiso sistémico y afección de órganos profundos. Además, estudios epidemiológicos sugieren que la presencia de lesiones causadas por VHS-2 facilita la transmisión del VIH (Stamm, Wasserheit and Corey, 2007; Corona-Oregón, Conde-González, Barrón and Sánchez-Alemán, 2010). En las personas inmunocompetentes, el brote herpético dura habitualmente unas pocas semanas. En las personas con el sistema inmunológico debilitado, incluyendo aquellas con VIH/Sida, las recurrencias pueden durar más de un mes. Los brotes herpéticos severos pueden ser increíblemente dolorosos. En un número pequeño de casos, el VHS-2 puede diseminarse a otros órganos, incluyendo ojos, garganta, pulmones y cerebro (Álvarez-Yañez I. et al., 2011).

La coinfección VHS-2/VIH, está asociada con el incremento de los niveles virales de VIH en plasma y tejido genital, mientras que, la diseminación del VHS-2 ocurre en el 30% de los días en personas infectadas con VIH, de manera frecuente en asintomáticos (Celum et al., 2010).

Existen evidencias que demuestran que la diseminación genital y anal del VHS-2 está ampliamente relacionada con la transmisión del VIH. Algunos estudios sugieren que en aquellos individuos coinfectados, las lesiones ulcerosas aumentan en su frecuencia de presentación y en su duración. Además de que se

presentan en lugares difusos como la cara, la espalda y los glúteos (Schacker et al., 1998).

En el año 2008, Nagot y colaboradores reportaron que en el 91.8% de los individuos analizados, fue posible detectar VHS-2 en genitales sin la presencia de úlceras. Esto último sugiere que la transmisión del VHS-2 en asintomáticos podría alcanzar e incluso rebasar el porcentaje de transmisión entre individuos con sintomatología (Nagot et al., 2008).

Algunos grupos poblacionales como los trabajadores del sexo comercial y los HSH, constituyen los principales grupos de riesgo para padecer la coinfección VHS-2/VIH. Los estudios realizados por Patel y colaboradores en individuos estadounidenses, reportan que la seroprevalencia del VHS-2 es 3 veces más alta en HSH y que viven con VIH, en comparación con individuos sanos. Este hallazgo sugiere que la sinergia negativa VHS-2/VIH, en HSH, representa el ciclo que mantiene la transmisión y progresión de ambas infecciones (Patel et al., 2012). Sin embargo, no hay evidencia que nos indique la proporción de diseminación genital y anal de VHS-2 entre HSH mexicanos, lo que apoyaría en la determinación de la magnitud del problema, y permitirá impactar en el tratamiento de ambas infecciones.

Por lo tanto, la pregunta de investigación del presente estudio es la siguiente:

¿Cuál es la frecuencia de diseminación anal y genital del VHS-2 en hombres que tienen sexo con hombres, que viven con VIH y asisten regularmente a la clínica de especialidades Condesa en el Distrito Federal?

MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES.

La familia *Herpesviridae* contiene varios de los patógenos humanos más frecuentes, de los cuales nueve son los más relevantes. Aun cuando la clasificación de esta familia es complicada, una división útil en subfamilias se basa en las propiedades biológicas de dichos agentes (TABLA 1).

| FAMILIA | HERPESVIRIDAE | | |
|----------------------|--|---|---|
| SUBFAMILIA | <i>Alfaherpesvirinae</i> | <i>Betaherpesvirinae</i> | <i>Gammaherpesvirinae</i> |
| TROPISMO CELULAR | Neurotrópicos | Linfotrópicos | Linfotrópicos |
| NOMBRE OFICIAL | HHV-1 HHV-2 HHV-3 | HHV-5 HHV-6 (A y B) HHV-7 | HHV-4 HHV-8 |
| NOMBRE COMÚN | Herpes labial Herpes genital Varicela-Zóster | Citomegalovirus Herpes tipo 6 Herpes tipo 7 | Virus Epstein-Barr Virus Sarcoma de Kaposi |
| CICLO DE CRECIMIENTO | Breve | Prolongado | Variable |
| INFECCIONES LATENTES | Neuronas | Glándulas Riñones Tejido Linfoide | Tejido Linfoide |

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS HERPESVIRUS (Ramírez Pineda et al., 2007).

Los alfa-herpesvirus son virus citolíticos de crecimiento rápido que tienden a establecer infecciones latentes en las neuronas y consta de tres integrantes: Virus del Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1), Virus del Herpes Simplex tipo 2 (VHS-2) y el Virus de la Varicela-Zóster. Los beta-herpesvirus presentan crecimiento lento y pueden ser de tipo citomegálicos, permanecen latentes en glándulas secretoras y riñones; tal es el caso del Citomegalovirus, el Herpesvirus Humano 6 y el Herpesvirus Humano 7. Finalmente los gamma-herpesvirus infectan células linfoides donde permanecen latentes, además este grupo de virus tienen capacidad oncogénica. A esta clasificación pertenecen el virus Epstein-Barr y el

herpesvirus relacionado al sarcoma de Kaposi (Stamm, Wasserheit and Corey, 2007; Ramírez Pineda et al., 2007). Dentro de los herpesvirus neurotrópicos, el VHS-1 y el 2 son los que comparten una mayor identidad nucleotídica (83%) (Stamm, Wasserheit and Corey, 2007; Dolan et al., 1998).

EPIDEMIOLOGÍA.

La infección por VHS-2 es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes en el mundo. Muchas de las infecciones genitales por VHS son causadas por el tipo 2; sin embargo un incremento en la proporción de dichas infecciones son atribuidas al VHS-1, esto debido en su mayoría a ciertas prácticas sexuales de riesgo. Las infecciones genitales provocadas por VHS-1 son menos severas y menos recurrentes que las causadas por el VHS-2 (Nahmias, Lee and Beckman-Nahmias, 1990).

Aproximadamente del 75 al 90% de las personas con VHS-2 no reconocen esta infección (son asintomáticas) (Wald et al., 2000). Como resultado de lo anterior, se estima que la prevalencia del VHS-2 va en aumento (Zamilpa-Mejía et al., 2003).

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que al ser el VHS-2 una enfermedad que causa lesiones ulcerativas en área genital, constituye una importante vía de entrada para el VIH y facilita su transmisión (Wald and Link, 2002; Mandell, 2009).

La seroprevalencia del VHS-2 aumenta de un 20-30% entre los 15 y 29 años a un 35-60% para los 60 años de edad. Esta prevalencia se ha incrementado de manera dramática desde la década de los ochentas (Schillinger et al., 2004; Nahmias, Lee and Beckman-Nahmias, 1990).

La adquisición de las infecciones tanto por VHS-1 como VHS-2, se ve afectada de manera directa por diversos factores, entre los cuales se encuentra el sexo (comúnmente se encuentra más en las mujeres), la raza (más frecuente en Afroamericanos), el estado marital (solteros, viudos y divorciados), el número de

parejas sexuales (2 o más), un debut sexual a edad temprana, antecedentes de ITS, estatus socioeconómico y el lugar de residencia (encontrándose en mayor cantidad en las ciudades). En general la prevalencia de anticuerpos contra VHS-2, es mayor entre las trabajadoras sexuales (75%) y los HSH (83%) (Wald et al., 2000; Roberts, Pfister and Spear, 2003).

Tanto las infecciones primarias como las recurrentes pueden ser asintomáticas, la recurrencia varía entre hombres y mujeres, ocurriendo de 2.7 y 1.9 veces por cada 100 días. En el caso de las mujeres, el VHS-2 se presenta con mayor frecuencia en comparación con los hombres (Wald et al., 1997).

Dos estudios realizados en la Ciudad de México para determinar la prevalencia del Virus del Papiloma Humano (VPH), muestran una seroprevalencia elevada para VHS-2 en la población femenina. Uno de estos estudios señala un 46.8% (para un grupo de 730 mujeres residentes de la Ciudad de México, infectadas con Virus de Papiloma Humano), el segundo muestra una seroprevalencia del 60.8% para VHS-2 en un grupo de mujeres dedicadas al sexo comercial. Los datos de prevalencia de VHS-2 en México son limitados, sin embargo la seroprevalencia de VHS-2 se ha incrementado en poblaciones de HSH y/o en aquellos infectados con VIH. Lo anterior debido a las prácticas sexuales de riesgo, al desconocimiento del estado de salud y a la falta de información sobre ITS (Conde-Glez et al., 1999).

Los factores asociados a las infecciones tanto por VHS-1 como VHS-2, convergen en la mayoría de los estudios existentes. Entre estos factores se encuentran: duración de la vida sexual activa, que en su mayoría se relacionan con grupos de mayor edad, estatus socioeconómico, múltiples parejas sexuales, un debut sexual a edad temprana, pertenecer al sexo femenino y antecedentes de ITS (Roberts, Pfister and Spear, 2003).

ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 2.

El VHS-2 tiene una cadena larga de DNA bicatenario de 152 kpb. El virión de VHS-2 (aproximadamente 150nm de diámetro) tiene una arquitectura compuesta por las siguientes estructuras: nucleocápside icosaédrica que contiene el DNA viral, un tegumento (capa amorfa de proteínas que rodean la nucleocápside) y una envoltura lipídica (FIGURA 1).

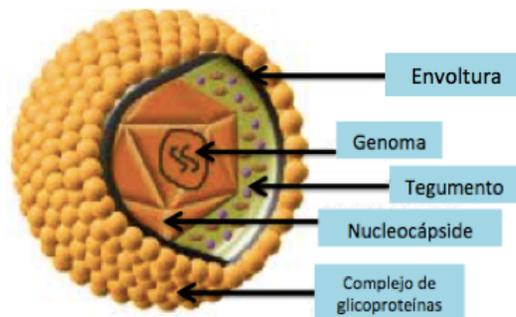


FIGURA 1. ESTRUCTURA CARACTERÍSTICA DE LOS VIRUS HERPES
(Ramírez Pineda et al., 2007).

La secuencia genómica completa de la cepa HG52 del VHS-2, revela que el DNA está organizado en dos únicas regiones de DNA bicatenario, una región única larga (U_L) de 126kpb y una región única corta (U_S) de 26kpb. Cada una de estas regiones está delimitada por un par de elementos invertidos y repetidos, quedando de tal manera las regiones $TRL-IRL$ y la $IRS-TRS$ y cada región posee su propio origen de replicación. La secuencia completa tiene una extensión total de 154 746 pb (FIGURA 2) (Dolan et al., 1998).

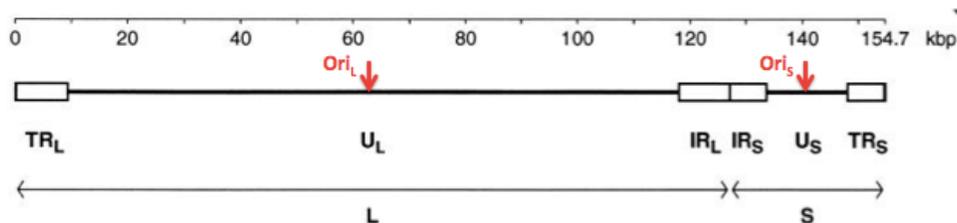


FIGURA 2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VHS-2 (Dolan et al., 1998).

Los VHS-1 y 2 codifican por lo menos para 84 polipéptidos, y cada uno de ellos al tener múltiples funciones dan como resultado la codificación de por lo menos 100 proteínas funcionales. Al menos 47 de los 84 polipéptidos conocidos en los virus herpes no son necesarios para la replicación viral (Ward and Roizman, 1994).

CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL.

Al inicio de la infección el VHS-2 se une a receptores de la superficie celular (principalmente el proteoglicano heparán sulfato) (Herrera-Martínez et al., 2005). La envoltura se fusiona con la membrana, entonces la nucleocápside es trasladada al citoplasma, para posteriormente ser transportada hacia los poros nucleares, y es a través de estos como el DNA viral entra al núcleo (Whitley and Roizman, 2001).

Los VHS son replicados por 3 rondas de transcripción con diferente temporalidad. Las proteínas alfa (α) tempranas inmediatas que principalmente regulan a replicación viral, las proteínas tempranas o beta (β) que se encargan de sintetizar el paquete de DNA y finalmente las proteínas tardías también conocidas como gamma (γ), muchas de las cuales son proteínas de los viriones (FIGURA 3) (Ward and Roizman, 1994; Stamm, Wasserheit and Corey, 2007).

Casi cualquier tipo de célula humana puede ser infectada por este virus. En muchas células, como las epiteliales y fibroblastos, la infección es lítica a diferencia de las neuronas que generalmente soportan una infección latente (característica primordial de los herpesvirus) (Schiffer et al., 2009).

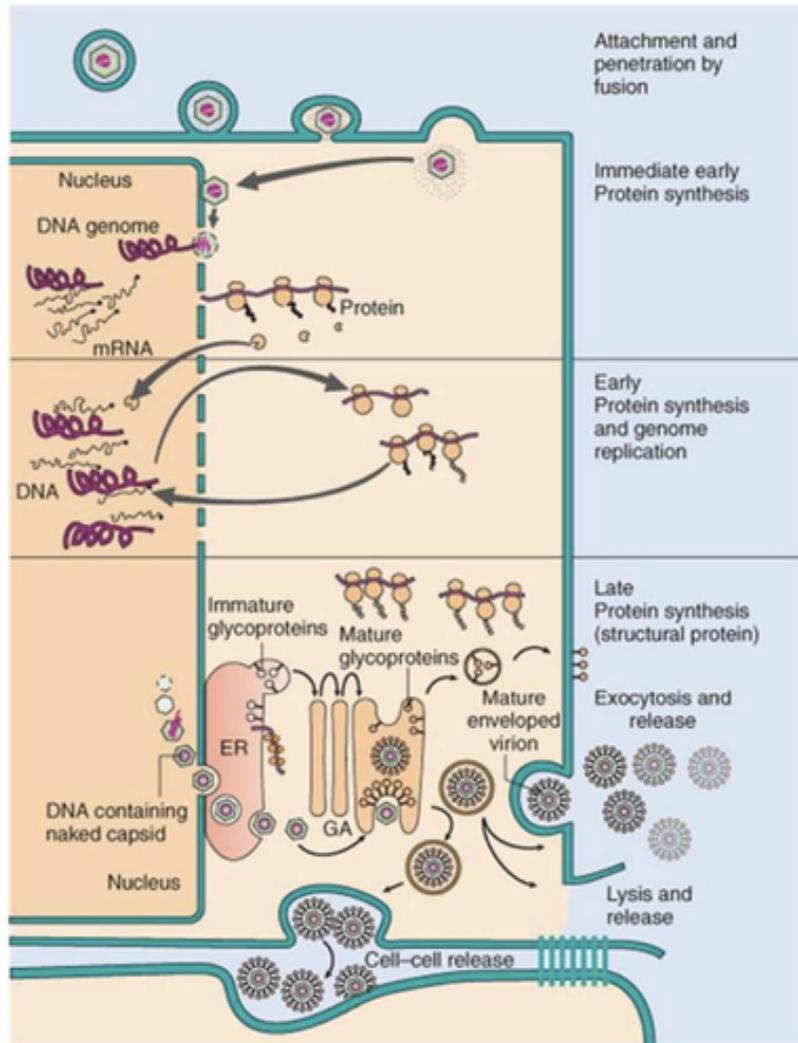


FIGURA 3. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 2 (Quizlet, 2014).

Muchas fases del ciclo de replicación viral, y muchas de las proteínas que de ello resultan, son de gran relevancia para el estudio de las infecciones por herpesvirus en humanos y para el desarrollo de terapias antivirales. Un ejemplo de esto, son las glicoproteínas de la superficie viral, que son moléculas mediadoras para la unión y entrada del virus a la célula hospedera, provocando una respuesta inmune. A la fecha, se reconocen 16 glicoproteínas virales, de las cuales la glicoproteína gD es un marcador específico del VHS-2 (Dolan et al., 1998; Stamm, Wasserheit and Corey, 2007).

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 2.

La ventaja más grande de los VHS, es que controlan el curso de la infección en el hospedero, esto se debe a tres características biológicas principales:

- Neuroinvasivos, es decir que tienen la capacidad de invadir el sistema nervioso.
- Neurotóxicos, son capaces de destruir y multiplicarse en el cerebro y sistema nervioso central.
- Latencia, su capacidad de permanecer en una forma de no replicación en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y el sistema nervioso autónomo.

Aunque la capacidad de neuroinvasión y la de neurotoxicidad parecen ser distintas, la supresión de casi cualquier gen del virus, afecta a una o en la mayoría de los casos a ambas propiedades. Sin embargo, la capacidad para establecerse como un virus latente nunca se ve afectada (Whitley and Roizman, 2001).

Los VHS-1 y 2, son transportados por un flujo retrógrado a lo largo de los axones que conectan el punto de entrada al cuerpo con los núcleos de las neuronas sensoriales, entonces, el genoma viral puede permanecer latente por toda la vida del hospedero (FIGURA 4). La latencia puede atribuirse a muchos eventos protagonizados tanto por el hospedero como por el VHS-2. Por ejemplo cuando el hospedero se encuentra en estado de inmunosupresión y el virus es capaz de desarrollar varias técnicas para mantenerse. Entre ellas, es que permanece de forma episomal en las neuronas sensoriales, establece ciclos lisogénicos, expresa antígenos similares a algunas moléculas del hospedero y transcribe enzimas que le permiten incrementar la reserva de nucleótidos, lo que le permite mantenerse inactivo por periodos prolongados. La latencia del VHS-2 se puede interrumpir por muchos eventos que llevan a la reactivación viral, por ejemplo el estrés físico o emocional, la fiebre, la luz ultravioleta y el daño a los tejidos (Stevens and Cook, 1971; Schiffer et al., 2009).

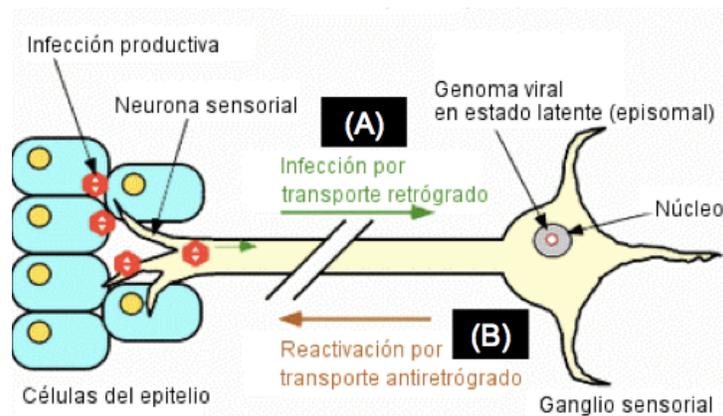


FIGURA 4. LATENCIA DEL VHS-2 Y SUS MECANISMOS DE TRANSPORTE A LOS GANGLIOS SENSORIALES

(modificada de <http://www.tecnologiahechapalabra.com/salud/especialidades/articulo.asp?i=1920>).

CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN.

Una infección primaria, se da cuando el individuo es negativo a VHS-1 y adquiere VHS-2, por otro lado, se considera infección no primaria, cuando un individuo es positivo a VHS-1 y se adquiere VHS-2. Una infección genital no primaria, causa síntomas más leves que la primo-infección (menos lesiones, menos dolor y menos complicaciones). Además, se sabe que la presencia de anticuerpos contra VHS-1, reducen la severidad de la infección y por lo tanto los síntomas de las infecciones por VHS-2 (Whitley and Roizman, 2001).

Las infecciones por herpesvirus, atacan de manera más común la piel y las mucosas, independientemente del tipo de virus que la provoque, sin embargo el tipo de infección resultante está en función del estado inmunológico del hospedero. El VHS-2 tiene un periodo de incubación promedio de 4 días (intervalo de 2-12 días), y un periodo de latencia de hasta 23 días después de los cuales se lleva a cabo la excreción del virus (Whitley and Roizman, 2001).

La primoinfección genital por VHS-2, aparece como máculas y pápulas, seguidas de vesículas, pústulas y úlceras (Corey, 1982; Corey, Adams, Brown and Holmes, 1983), aunque como se ha mencionado antes, debido a que puede presentarse de manera asintomática, la mayoría de las personas no detecta la infección.

Las complicaciones en hombres son raras, sin embargo en mujeres es común encontrar meningitis y retención urogenital. Otras complicaciones, tanto en hombres como en mujeres, incluyen parestesias y disestesias de las piernas y el perineo, disuria y malestar.

El herpes genital puede transmitirse a las parejas sexuales aún en ausencia de síntomas o lesiones. Usualmente, la transmisión ocurre durante la diseminación del virus en personas asintomáticas (Mertz et al., 1992).

La infección genital por VHS-2 raramente es transmitida de madre a feto durante el embarazo, cuando esto sucede, se genera un daño a múltiples sitios anatómicos del feto y puede causar hepatitis necrosante con o sin trombocitopenia, coagulopatía intravascular diseminada y encefalitis. La infección primaria de la madre, se puede transmitir hasta en un 50% de los casos, durante su paso por el canal de parto. Este porcentaje es mucho más alto que el que se presenta en las infecciones recurrentes (3% o menos). El paso transplacental de anticuerpos de madre a hijo, posiblemente reduce la severidad de la infección, si no es que previene la transmisión y por último, un riesgo de infección incrementado por una ruptura de membranas que dure más de 6 horas. Las infecciones en neonatos, pueden ocurrir *in útero* (5%), durante el parto (alrededor de 50%) o de manera postnatal (Brown et al., 1995).

DIAGNÓSTICO.

La presencia del VHS-2 puede confirmarse mediante un cultivo celular, la detección de anticuerpos contra VHS-2 y por la detección directa de un fragmento del genoma viral por PCR (DNA o RNAm). Una ventaja de los cultivos celulares es que pueden proveer de virus aislados potenciales para una subsecuente tipificación y estudios de resistencia (Lakeman and Whitley, 1995).

El manejo de las muestras para diagnóstico por cultivo o molecular, inicia desde la toma de la muestra (en este caso puede ser tomada de cualquier úlcera o vesícula dérmica), su transferencia y transporte en el medio o buffer adecuado, hasta su procesamiento. En el caso del diagnóstico serológico, el manejo de las muestras inicia desde la toma de la muestra de sangre periférica, la separación del suero y su transporte para el procesamiento subsecuente. El diagnóstico serológico de las infecciones por herpesvirus, es solamente para determinar una exposición al agente etiológico, pero no arroja datos de si es una infección reciente o antigua, si esta activa o no; por lo tanto los resultados de técnicas serológicas no pueden avalar al 100% las decisiones terapéuticas, a excepción de los estudios de avidéz (Whitley and Roizman, 2001).

Entre los métodos más comunes para la detección de VHS-2, se encuentran los ensayos inmunológicos (tipo ELISA indirecta) y los de detección directa del DNA viral (PCR punto final o tiempo real).

Los ensayos inmunológicos para la detección de VHS-2, se encuentran disponibles en el mercado en estuches de distintas casas comerciales, cada una con sensibilidad y especificidad diferente, aunque con el mismo fundamento. De la misma manera, en la literatura se encuentran reportados algunos protocolos que detallan las condiciones de PCR para la detección de VHS-2 (Lakeman and Whitley, 1995; Brown et al., 1995; Herrera-Martínez et al., 2005).

TRATAMIENTO PARA LAS INFECCIONES POR VHS-2.

Hasta el momento no existe un tratamiento para eliminar la infección por VHS-2, se provee un tratamiento farmacéutico para controlar las recurrencias e información acerca de su condición para disminuir la transmisión (Brugha, Keersmaekers, Renton and Meheus, 1997).

La *Food and Drug Administration* (FDA) de EUA ha autorizado solamente tres medicamentos para el tratamiento del VHS-2: aciclovir, valaciclovir y famciclovir, los cuales tienen mecanismos de acción e indicaciones semejantes para su uso terapéutico. El aciclovir es el más estudiado y por tanto el más común, el más recomendado y el único disponible en aplicación intravenosa (Katzung Bertram G. and Masters Susan B., 2010).

Los fármacos ya mencionados, penetran en las células infectadas actuando como análogos de los nucleósidos y se unen a la timidina cinasa viral, resultando en su fosforilación. Posteriormente, los antivirales son fosforilados de nuevo por enzimas celulares y compiten con los nucleósidos para unirse a la ADN polimerasa viral, provocando una inactivación de la enzima y una reducción de la replicación viral (Martín, Villalón and Jordá, 2009).

El aciclovir (9-((2-hidroxi) metil)-9H-guanina) se usa para controlar infecciones de herpes en piel, labios y genitales, así como para herpes zóster y varicela. No cura las infecciones que producen herpes, pero reduce el dolor y la picazón, además favorece que las lesiones curen más rápido al detener la replicación viral. Las vías de administración del aciclovir son: oral, intravenosa, tópica y oftálmica (Corona-Oregón et al., 2010).

El tipo de vía utilizada es en función del grado de la infección del virus y la manera en que debe de combatir al mismo, tomando en cuenta las características fisiológicas del paciente. Por otra parte este fármaco es utilizado como profiláctico en pacientes inmunocomprometidos (Katzung Bertram G. and Masters Susan B., 2010). La principal limitación del aciclovir es su baja biodisponibilidad (15-20%),

por lo que es necesario administrarlo en dosis frecuentes a lo largo del día (generalmente repartido en 5 tomas). Los efectos secundarios del aciclovir son raros e incluyen cefaleas, náuseas, diarreas y toxicidad renal, por lo que en pacientes con insuficiencia renal hay que reajustar las dosis. Excepcionalmente también se han descrito manifestaciones neuropsiquiátricas como desorientación, temblores, delirio o alteraciones del habla (Martín, Villalón and Jordá, 2009).

El valaciclovir es un profármaco del aciclovir con mucha mayor biodisponibilidad por vía oral (65%), que consigue niveles en sangre comparables a los del aciclovir intravenoso. Los efectos adversos son similares a los del aciclovir (Martín, Villalón and Jordá, 2009).

El famciclovir es un profármaco que tiene como metabolito activo el penciclovir, que es un análogo acíclico de la guanosina. Sufre un proceso de fosforilación similar al aciclovir y también inhibe la DNA polimerasa viral, bloqueando la síntesis y la replicación viral. El penciclovir trifosfato posee una vida media intracelular mucho más prolongada que el aciclovir trifosfato, ya que persiste de 10 a 20 horas en las células infectadas por el virus. El famciclovir tiene también una biodisponibilidad mayor que el aciclovir y el valaciclovir (77%), y una tolerancia y efectos adversos similares al aciclovir. En vista de la historia natural de las infecciones por el VHS, de la elevada biodisponibilidad del famciclovir y de su prolongada vida media, este fármaco instaurado de forma precoz puede resultar de gran ayuda en el manejo de las recurrencias de infecciones herpéticas (Martín, Villalón and Jordá, 2009).

JUSTIFICACIÓN

La presencia de VHS-2 en personas infectadas con VIH, modifica la historia natural de ambos padecimientos, pudiendo originar una mayor diseminación de VIH en úlceras y genitales de personas coinfectadas.

Este trabajo tiene como base coadyuvar al reforzamiento de la detección de VHS-2 en una población de HSH asintomáticos que acuden regularmente a la clínica; por medio de la detección y cuantificación de VHS-2 en muestras de citología anal y muestras de hisopados genitales.

La finalidad es generar información que apoye en la toma de decisiones en el diseño y aumento de las medidas de prevención en HSH coinfectados VIH/VHS-2, y la posterior implementación de la terapia de supresión para VHS-2 como medida de control para la epidemia de VIH.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores clínicos y sociodemográficos asociados a la diseminación anal y genital del VHS-2, en una población de HSH, que viven con VIH y que acuden regularmente a la clínica de especialidades Condesa en el Distrito Federal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de VHS-2 en muestras de citología anal y de hisopados genitales.
- Cuantificar la carga viral de VHS-2 en muestras de citología anal y de hisopados genitales, de la medición basal del estudio madre.
- Realizar una descripción de los factores clínicos y sociodemográficos de la población de estudio.

OBJETIVOS METODOLÓGICOS

Estandarizar las condiciones de:

- PCR punto final para la detección del VHS-2.
- PCR tiempo real para la detección del gen constitutivo β -globina y el diseño de oligonucleótidos.
- PCR tiempo real para la detección de un fragmento del genoma de VHS-2 y el diseño de oligonucleótidos.

DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

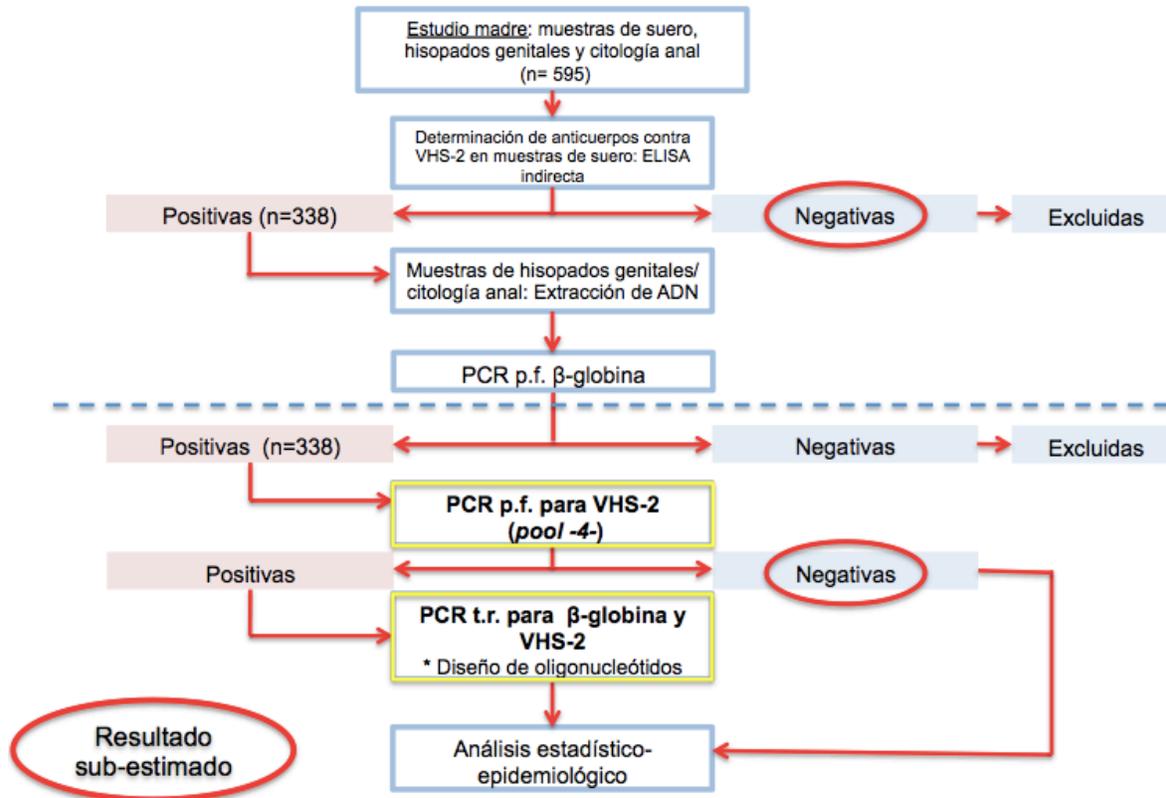


FIGURA 5. MAPA CONCEPTUAL DEL ESTUDIO.

El presente estudio se inició tomando como base los resultados obtenidos del estudio madre descrito más adelante. Una vez con las muestras seropositivas a VHS-2, y con la certeza de que estas contenían DNA, se inició el proceso de estandarización de las técnicas de PCR punto final y PCR tiempo real, para llegar a la cuantificación de VHS-2 y al análisis estadístico-epidemiológico. En el mapa conceptual anterior, se muestran a partir de la línea punteada los procedimientos que forman parte del presente estudio transversal.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESTUDIO MADRE (Torres-Ibarra L. and Salmerón J., n.d.).

El estudio madre del que se obtuvieron las muestras lleva por título: “Prevalencia, incidencia y persistencia de VPH en hombres que tienen sexo con hombres: un elevado riesgo de neoplasia intraepitelial anal”, el cual se realizó en colaboración con el del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del INSP, El Centro de Investigación en Salud Poblacional del INSP y la clínica de especialidades Condesa en el Distrito Federal.

El objetivo de este estudio fue describir la prevalencia de tipos específicos de VPH en la población HSH PVV (personas que viven VIH). El estudio se realizó con un énfasis particular en la determinación de los factores asociados con las infecciones por VPH 16 y 18 en el canal anal.

El estudio VPH en PVV, se basó en una cohorte de HSH que viven con VIH, y que fueron reclutados de la clínica de especialidades Condesa en el Distrito Federal. Los hombres que fueron elegidos para el estudio, debieron cumplir con algunos criterios de inclusión, entre ellos: tener 18 años o más, haber tenido alguna vez algún tipo de relación sexual con otro hombre, ser personas que viven con VIH (PVV), estar bajo terapia antirretroviral de alto impacto o haber demostrado que aún no la requieren.

Para dicho estudio, previo consentimiento informado, se tomaron muestras de sangre (suero), hisopados genitales, de citología anal y de orina. La duración del estudio fue de 4 años (diciembre 2009 a diciembre 2013) y las muestras se tomaron cada 6 meses incluyendo una muestra cero al inicio del mismo. Los participantes del estudio fueron instruidos para no bañarse y abstenerse de tener relaciones sexuales al menos 24 horas antes de la toma de muestras.

Adicionalmente a la determinación del VPH en muestras de hisopados genitales y de citología anal, las muestras de suero fueron utilizadas para detectar anticuerpos contra *Treponema pallidum* y VHS-2, las de orina para determinar la presencia de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, y las muestras de hisopados genitales y de citología anal para detectar VHS-2.

Las muestras de sangre fueron tomadas por el personal de la Clínica Condesa a través de venopunción. Las muestras de hisopados genitales fueron tomadas por personal médico utilizando hisopos de dacrón, los cuales se conservaron en un tubo con buffer SST hasta su procesamiento. Las muestras de citología anal fueron colectadas por personal médico, insertando y rotando 360° un hisopo de dacrón en el canal anal; estas muestras fueron almacenadas en viales con buffer *PreservCYT* a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron colectadas por personal del Instituto Nacional de Salud Pública, y transportadas al CISEI a temperatura de refrigeración (4°C). Posterior a su llegada, se constató que las muestras se hubieran mantenido congeladas durante su transporte. Después de esto, las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento (excepto las muestras de citología anal, que se mantuvieron a temperatura ambiente).

Los participantes del estudio, a su vez, fueron entrevistados personal y confidencialmente para responder un cuestionario estandarizado. El cuestionario incluía características sociodemográficas del individuo, comportamiento sexual, uso de métodos de prevención de ITS (como el preservativo), historia de ITS, tabaquismo y uso ilegal de drogas, etcétera. De manera adicional, fueron colectados algunos datos clínicos de cada participante, entre ellos los años desde el diagnóstico de VIH, el conteo de linfocitos T CD4⁺ y carga viral de VIH.

Uno de los resultados del estudio madre, que sirve como precedente para la utilización de las muestras del mismo, es que en dichas muestras se encontró un porcentaje de seroprevalencia de VHS-2 igual al 67.88% (Torres-Ibarra L. and Salmerón J., n.d.).

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD.

Las muestras y los datos utilizadas 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.”

En dicho estudio, se informó a cada uno de los individuos sobre los procedimientos y lineamientos bajo los que se realizaría el estudio si decidieran participar; a través de un formato de consentimiento informado. En este 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 dar fe de la participación en el estudio, se requirió el nombre y la firma del participante, así como de nombre y firma de dos testigos.

Como parte de los procedimientos del estudio original, se incluyó la detección de algunas de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más comunes, sífilis, gonorrea, clamidiasis y herpes genital, dichos resultados ya han sido proporcionados tanto a los individuos como a los médicos tratantes, sin violar su confidencialidad.

En el presente trabajo se pretende detectar y cuantificar el Virus del Herpes Simplex tipo 2 (VHS-2), causante del herpes genital, basándose en las muestras previamente positivas.

Cabe destacar que, como parte del estudio original se realizó una prueba serológica para detectar anticuerpos contra VHS-2 en el total de los participantes. El resultado de la prueba se entregó a cada uno de los individuos sin violar su confidencialidad.

Se anexa en el presente documento, la carta de consentimiento informado utilizado en el estudio original, así como la autorización por el responsable del estudio para el uso de las muestras y datos de cada participante (ANEXO 7).

Número de aprobación del estudio madre: CI 782, No. 691.

En este trabajo se utilizaron muestras biológicas de hisopados genitales y citología anal. La manipulación de las muestras se realizó bajo las normas de bioseguridad, con el uso de equipo de protección personal. De acuerdo con el procedimiento de manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (R.P.B.I.), el material de desecho se dispone en bolsas rojas para su posterior manejo por una empresa externa al INSP.

Así mismo, algunos procedimientos que forman parte del estudio contemplan el uso de materiales peligrosos tipo C.R.E.T.I., principalmente bromuro de etidio. El desecho se dispone en frascos de vidrio oscuro debidamente etiquetados. Este residuo se pone a disposición del responsable de bioseguridad en el Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (C.I.S.E.I.).

SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

La población utilizada en este proyecto, constó de 595 HSH que viven con VIH. Estos individuos formaron parte del estudio madre antes descrito.

En el presente estudio, sólo se utilizaron las muestras basales (tiempo 0) de sangre (tomadas mediante venopunción y de las cuales se obtuvo el suero), hisopados genitales (muestra externa, tomada de piel de pene y perineo) y de citología anal (muestra interna, tomada de la mucosa del canal anal).

El diseño del estudio en curso es de tipo transversal de la muestra basal de una cohorte de HSH y que viven con VIH. El criterio de inclusión principal para elegir a los participantes, es que de cada individuo existieran los resultados de serología de VHS-2, físicamente las muestras de hisopado genital y de citología anal, y por último los resultados de su encuesta (de donde se tomarán los datos sociodemográficos, de comportamiento sexual y clínicos de cada uno).

A la fecha, ya fueron recolectadas en su totalidad las muestras de la primera toma del estudio madre, y con ellas se ha formó un banco que fue procesado en busca del Virus del Papiloma Humano (VPH). El proceso que se llevó a cabo permite la amplificación y detección de “37” tipos de VPH y del gen de la β -globina humana. Aquellas muestras positivas a alguno de los dos genes, fueron consideradas parte del estudio. El hecho de que sean positivas a VPH o a β -globina, nos asegura que el DNA ahí contenido es adecuado para realizar PCR; y por lo tanto nos indica que son muestras de calidad en las que se puede detectar VHS-2.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE VHS-2.

La detección de anticuerpos anti-VHS-2 en las muestras de suero obtenidas del estudio madre se realizó previamente utilizando el estuche comercial HerpeSelect 2 ELISA IgG de FOCUS de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Vergara-Ortega D.N., 2012).

EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE CITOLOGÍA ANAL Y DE HISOPADOS GENITALES.

Las muestras de hisopados genitales y de citología anal fueron procesadas para extraer DNA por medio del estuche comercial AmpliLute Liquid Media Extraction Kit de Roche, para extracción de DNA. La técnica se basó en la cromatografía de intercambio iónico, mediante el uso de columnas con membranas cargadas positivamente.

Al tener cargas contrarias, estas interactúan con el DNA (carga negativa debido a los grupos fosfato), extrayéndolo así de la muestra. Las extracciones fueron realizadas de acuerdo con las indicaciones del fabricante (ANEXO 1).

DETECCIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA β -GLOBINA HUMANA.

La detección de un fragmento de la β -globina humana, constituye un control de calidad de una correcta toma de muestra, de una eficiente extracción de ácidos nucleicos y de que el DNA está en condiciones de amplificación.

En el presente estudio, para identificar el gen de la β -globina humana se amplificó un fragmento del mismo gen (*Homo sapiens* hemoglobin) que se ubica de la base 1856 a la base 2123 del cromosoma humano 11. Para ello se utilizaron los iniciadores GH20 (5'-3'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC) y PC04 (5'-3'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC), con las siguientes concentraciones de reactivos: amortiguador de reacción 1X, $MgCl_2$ 2mM, dNTP 0.2mM, Taq polimerasa (Amplitaq) 0.06U, iniciadores 0.015 μ M (c/u) y 5 μ L de la muestra en un volumen final de 25 μ L. Las condiciones del programa de PCR incluyen una temperatura de activación de 95°C por cinco minutos, posteriormente 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; finalmente, una extensión de 72°C por siete minutos (Madhavan, Priya and Bagyalakshmi, 2003). El fragmento amplificado tiene una longitud de 268 pb y como control positivo se utilizó DNA de células Caski.

DETECCIÓN DE UN FRAGMENTO DEL VHS-2 POR PCR PUNTO FINAL. MONTAJE DE LA TÉCNICA.

Para llevar a cabo la amplificación, las muestras seropositivas a VHS-2 y con un aislamiento adecuado de DNA, se procesaron para la detección del DNA de VHS-2 por medio de PCR punto final. El fragmento amplificado está ubicado de la base 64860 a la 65250 y pertenece al gen UL30 (extensión 63300-67061pb) que codifica para la DNA polimerasa tipo B de VHS-2 cepa HG52.

Las muestras seropositivas a VHS-2 fueron mezcladas en lo que llamamos “*pool*” (constituido por DNA proveniente de diferentes sujetos). La razón principal de trabajar con “*pools*”, es que permite optimizar la reacción, es decir se gasta menos material y tiempo de procesamiento. Los “*pools*” constituyen un tamiz rápido, por ejemplo si un “*pool*” resulta negativo quiere decir que las muestras unitarias que lo integran también lo son y por lo tanto fueron consideradas como negativas para el estudio. El caso contrario, cuando un “*pool*” resulta positivo, es más sencillo abrirlo y procesar por separado cada muestra que lo compone para saber cual o cuales son las positivas y eliminar las que no lo son.

Para que la realización de la prueba mediante los “pools” resulte más eficiente que las pruebas individuales, el número total de reacciones de PCR debe ser menor a los que se hubieran necesitado con pruebas individuales. Para ello, se estimó el tamaño óptimo del “pool” en términos de eficiencia y ajustarlo, considerando también la dilución máxima a la que la prueba puede detectar resultados (Sánchez-Alemán et al., 2005). Para estimar el tamaño óptimo del “pool” se utilizó la siguiente fórmula:

$$CM = \frac{CP}{TP} + [1 - (1 - \text{Prev})^{TP}] * CP$$

En donde CM es el costo por muestra analizada, CP es el costo del reactivo para cada determinación, TP es el tamaño del “pool” y Prev es la prevalencia esperada. El tamaño óptimo del “pool” es el que minimiza el costo por muestra. Esta fórmula no incluye el costo adicional de preparar las mezclas debido a que es mínimo. En el caso del presente estudio, se consideró una prevalencia esperada del 10% y el costo del reactivo como 1 (Behets et al., 1990). El tamaño óptimo estimado fue de 4 muestras por “pool”.

Una vez con las muestras dispuestas en “pools”, se llevó a cabo el PCR punto final. En este ensayo se utilizaron reactivos de la casa comercial Fermentas y un termociclador de la marca *GeneAmp PCR System 9700* de la casa comercial *Applied Biosystems*.

El protocolo para la amplificación de VHS-2 reportado en la literatura estaba diseñado para amplificar un fragmento de VHS-2 con una longitud de 391 pb (FIGURA 6) (Corona-Oregón et al., 2010; Herrera-Martínez et al., 2005; Madhavan, Priya and Bagyalakshmi, 2003).

Para identificar este fragmento, se utilizaron los iniciadores: HSV (5'-3'ATG GTG AAC ATC GAC ATG TAC GG) y HSV2 (5'-3'CCT CCT TGT CGA GGC CCC GAA

AC), con las siguientes concentraciones de reactivos: amortiguador de reacción 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTP 0.32mM, Taq polimerasa (Amplitaq) 1U, iniciador HSV 0.07pmol/μL, iniciador HSV2 0.08pmol/μL y 5μL de la muestra en un volumen final de 25μL. Las condiciones del programa de PCR incluyen una temperatura de activación de 94°C por dos minutos, posteriormente 45 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos; finalmente, una extensión de 72°C por siete minutos (Corona-Oregón et al., 2010; Madhavan, Priya and Bagyalakshmi, 2003; Herrera-Martínez et al., 2005).

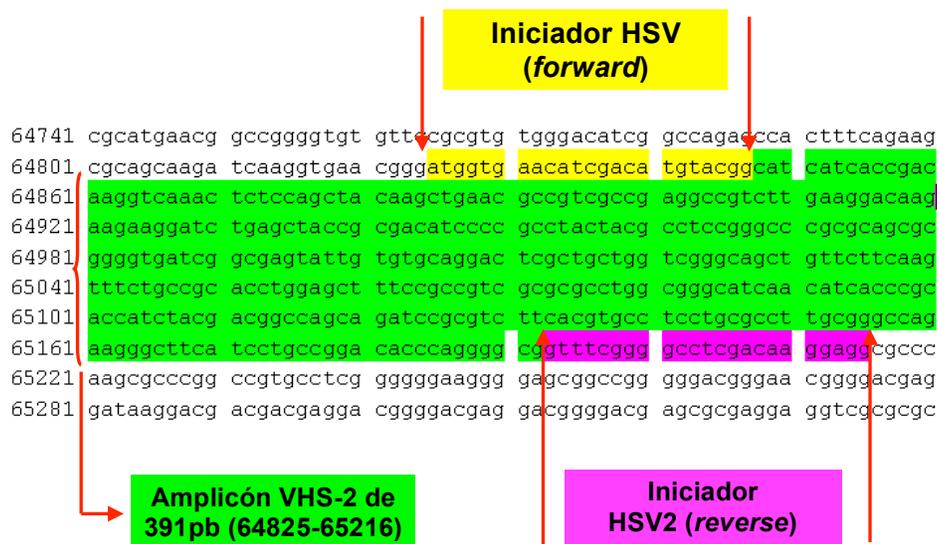


FIGURA 6. SECUENCIA Y POSICIÓN GENÓMICA DEL AMPLICÓN DE VHS-2.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA (Puerta C.J. and Urueña C.P., 2005).

Los productos obtenidos del PCR de β-globina humana y VHS-2, fueron separados y detectados en geles de agarosa a una concentración de 2%, en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, con una concentración final de 0.5μg/mL de bromuro de etidio.

La electroforesis se llevó a cabo a 75mV durante 30 minutos, para la posterior visualización de los geles en un transiluminador de luz UV.

FUNDAMENTO DEL PCR TIEMPO REAL.

El PCR en tiempo real es una técnica basada en la PCR y se usa para detectar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de DNA o cDNA específicas y así acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión o la cantidad del gen en cuestión (Life technologies, 2012).

El PCR tiempo real puede generar amplicones muy pequeños (desde 60pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como su cuantificación. En contraste con el PCR punto final, el PCR tiempo real es un método más sensible, que además arroja resultados cuantitativos. Durante la corrida de PCR tiempo real, los productos de amplificación se observan a medida que transcurre cada uno de los ciclos (Vinueza-Burgos, 2009).

Esta técnica se fundamenta en (Life technologies, 2012):

- La detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción.
- El empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.

La química de la detección está dada por (Vinueza-Burgos, 2009; Life technologies, 2012):

Agentes intercalantes fluorescentes (por ejemplo *SYBR Green*)

- Sondas de hidrólisis (TaqMan)
- Sondas de *loop* (*Molecular Beacons*, *Scorpions*)
- Sondas de hibridización

En este proyecto se utilizó un agente intercalante llamado *SYBR Green*, el cual se une al DNA bicatenario dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Es simple, económico, fácil de usar, sensible, versátil y no se necesitan sondas específicas. Sin embargo durante la reacción de PCR puede unirse a dímeros de primers y a otros productos inespecíficos (Life technologies, 2012).

Las reacciones son caracterizadas en el momento en el que la amplificación de un producto de PCR se detecta después de un número fijo de ciclos. Cuanto más alto es el número de copias del blanco, más pronto se observa el aumento significativo en la fluorescencia. Con el software adecuado, una corrida de PCR tiempo real muestra un diagrama de amplificación, donde los cambios de fluorescencia se grafican respecto al número de ciclos (FIGURA 7). En los ciclos iniciales de PCR, hay un pequeño cambio en señal de fluorescencia; esto define la línea de fondo para el diagrama de la amplificación. Un aumento en fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR (Life technologies, 2012b; Vinueza-Burgos, 2009).

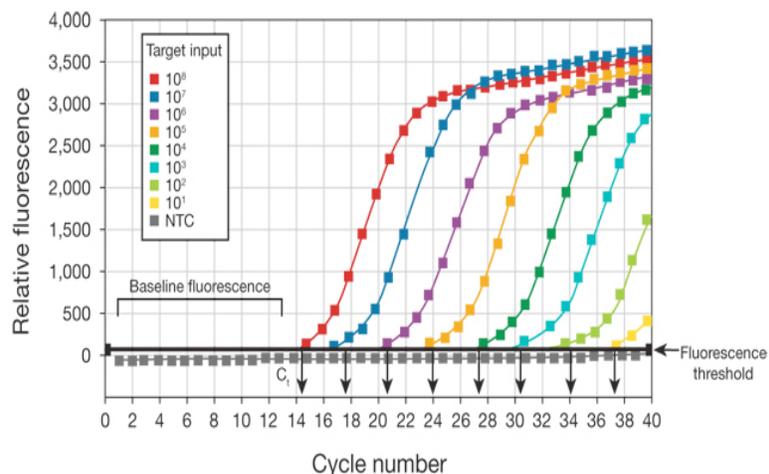


FIGURA 7. GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN.

Estas son creadas cuando la señal de fluorescencia de cada muestra es graficada contra el número de ciclo. Por lo tanto, esta gráfica representa la acumulación de producto durante la reacción de PCR tiempo real (Life technologies, 2012).

Los datos se adquieren en cada ciclo del PCR. El número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (*background*) se conoce como ciclo umbral (C_t : *threshold cycle* o C_q : *quantification cycle*). El C_t está determinado en la fase exponencial de la reacción y es más confiable que las mediciones en el punto final convencional. El C_t es inversamente proporcional al número de copias del DNA blanco: a mayor concentración de blanco, menor C_t medido (FIGURA 8) (Life technologies, 2012).

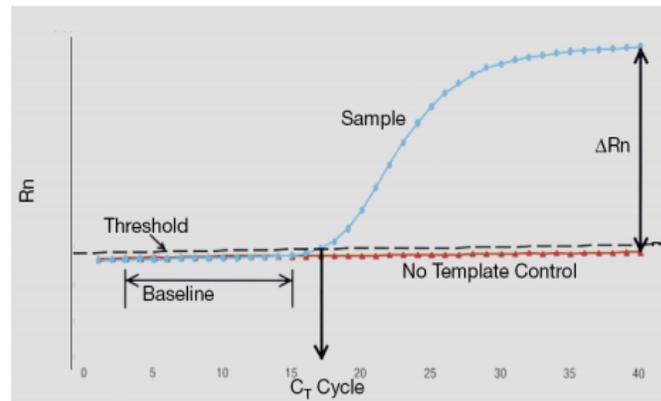


FIGURA 8. CICLO UMBRAL (*THRESHOLD CYCLE/C_t*) (Life technologies, 2014).

La gráfica del logaritmo del número inicial de copias del blanco para un sistema de estándares contra C_t es una línea recta. La cuantificación de la cantidad de blanco en muestras desconocidas es lograda midiendo C_t y usando la curva estándar para determinar el inicio del número de copias. Así mismo, las curvas estándar al ser generadas con diluciones seriadas de una concentración conocida de DNA base, son útiles para calcular la eficiencia de la reacción (FIGURA 9) (Life technologies, 2012). Al igual que en el PCR punto final, en las corridas de PCR tiempo real se deben añadir controles negativos (H_2O -*No template control NTC*- o DNA de cualquier otro organismo) y controles positivos en diferentes diluciones. Para obtener resultados más certeros, cada muestra se procesa por triplicado (Life technologies, 2014).

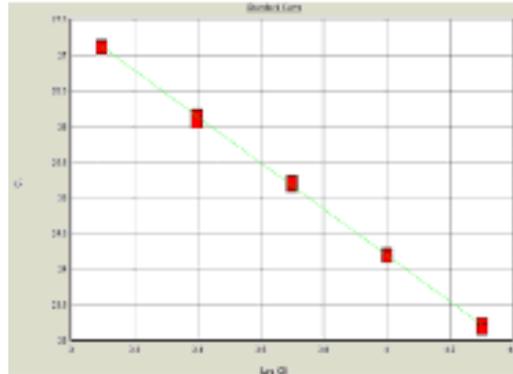


FIGURA 9. CURVA ESTÁNDAR (Life technologies, 2014).

A manera de sustitución de la electroforésis en gel, el equipo de PCR tiempo real independientemente y posterior de la reacción de PCR realiza un cambio lento de temperatura de la placa y continúa midiendo la fluorescencia, lo cual es graficado al final de la reacción de PCR: la curva de disociación. De acuerdo al tamaño y composición del amplicón en cuestión, la T_m (temperatura de fusión) de este se debe mantener constante y al realizar la primera derivada negativa, el dato de una única T_m debe representarse solo por un pico en el gráfico (FIGURA 10) (Life technologies, 2012; PrimeQ, 2008).

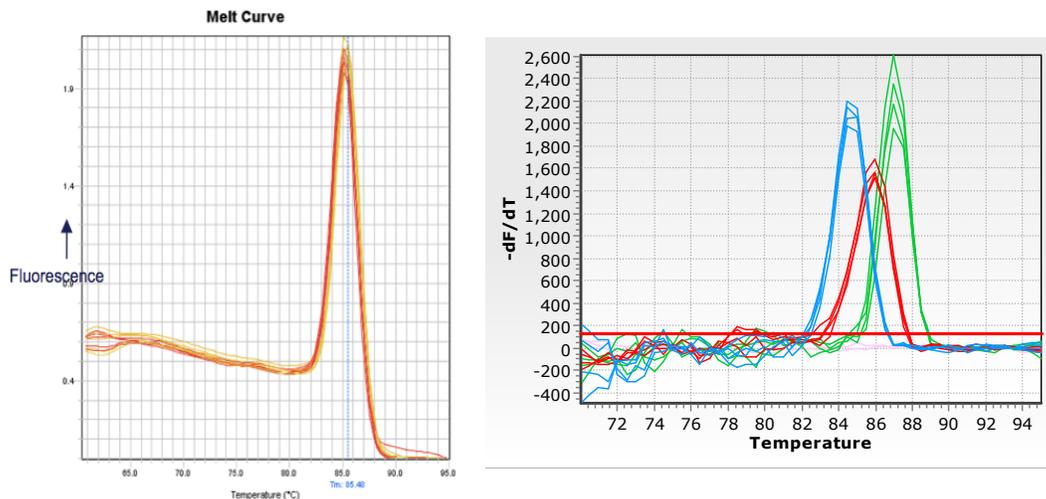


FIGURA 10. CURVAS DE DISOCIACIÓN.

Izquierda, la gráfica representa un único producto de la amplificación, un solo pico. Derecha, representa 3 distintos productos de amplificación en la misma gráfica. Estos productos se distinguen por sus correspondientes T_m y pico de fluorescencia (Life technologies, 2014; PrimeQ, 2008).

Algunos de los términos más utilizadas en PCR tiempo real, son los siguientes (Life technologies, 2012, 2014):

- Línea base (*Baseline*): nivel de señal durante los ciclos iniciales del PCR, se conoce como el fondo o ruido de la reacción.
- Umbral (*Threshold*): nivel de señal que refleja un incremento estadísticamente significativo sobre la señal de la línea base. Generalmente, los equipos de PCR ajustan este umbral a 10 veces la desviación estándar del valor de la línea base.
- Ciclo umbral o ciclo de cuantificación (C_t : *threshold cycle* o C_q : *quantification cycle*): es el número de ciclo al cual la señal de fluorescencia de la reacción cruza el umbral. Este número es usado para calcular el número inicial de copias de DNA, debido a que el valor de C_t es inversamente proporcional a la cantidad inicial de DNA blanco.
- Curva estándar (*Standard curve*): se realiza con una serie de diluciones de concentraciones de templado conocidas, para determinar la cantidad inicial de DNA blanco. Se gráfica con el logaritmo de cada concentración conocida en las diluciones (eje x) contra el valor de C_t para cada concentración (eje y). Como resultado de esta curva, se obtiene la ecuación de la misma, lo que es útil al momento de establecer los valores de [DNA] para las muestras problema.
- Coeficiente de correlación (R^2): es una medida de que tan bien se ajustan los datos reales a una curva estándar. Este valor refleja la linealidad de la curva e idealmente se prefieren valores muy cercanos a 1.
- Intersección con el eje Y (*Y-intercept*): corresponde al límite teórico de la detección de la reacción, o el valor de C_t resultante si el número de copias más bajo de moléculas de DNA blanco indicados en el eje x dio lugar a una amplificación estadísticamente significativa.



- Fase exponencial: fase del PCR durante la cual se cuantifican los datos para el PCR tiempo real, debido a que durante esta todos los reactivos se encuentran en exceso, la enzima es altamente eficiente y la amplificación del producto (que está en baja cantidad), no se ve afectada por dimerización de oligonucleótidos.
- Pendiente (*slope/m*): la pendiente de la fase exponencial del PCR que en una gráfica semilogarítmica aparece como lineal y es la medida de la eficiencia de reacción. Para obtener resultados reproducibles, la eficiencia se debe acercar lo más posible al 100%, lo que equivale a una pendiente de -3.32.
- Eficiencia: se calcula mediante la fórmula $E = [10^{(-1/m)} - 1] \times 100$. La eficiencia ideal debe ser del 100%, lo que significa que el DNA molde se duplica después de cada ciclo térmico durante la fase exponencial.
- Rango dinámico: intervalo en el cual un incremento en la cantidad inicial de DNA blanco, resulta en un correspondiente incremento en la amplificación del producto. Idealmente, el rango debe ser de 7 a 8 órdenes de magnitud para plásmidos y al menos 3 a 4 órdenes para DNA genómico.
- Cuantificación absoluta: describe un experimento de PCR tiempo real en el cual las muestras de concentración conocida son diluídas de forma seriada y amplificadas para generar una curva estándar. Las muestras problema son cuantificadas por su interpolación en esta curva.
- Cuantificación relativa: describe un experimento de PCR tiempo real en el cual la expresión de un gen de interés en una muestra (por ejemplo, tratada) es comparado con la expresión del mismo gen en otra muestra (no tratada). Los resultados se expresan como el cambio en número de veces que expresó uno con respecto del otro.
- Curva de disociación (*Melt curve*): una curva de disociación muestra el pico correspondiente al cambio en la fluorescencia observada cuando el DNA de doble cadena se encuentra con fluoróforos incorporados (elevación) y cuando se disocia o se funde en DNA de cadena sencilla (declive) por efecto de la temperatura (derivada del cambio en la fluorescencia contra

cambio en la temperatura). Para agentes intercalantes como el *SYBR Green*, el punto más elevado de la curva se denomina T_m (temperatura de fusión correspondiente al punto de fusión). Esto sucede con cada producto de la amplificación, de tal manera que cada pico en la gráfica corresponde a un distinto amplicón (Life technologies, 2012; PrimeQ, 2008).

ESTANDARIZACIÓN DEL PCR TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE DNA DE β -GLOBINA HUMANA Y DNA DE VHS-2 (Vinueza-Burgos, 2009).

El ensayo de estandarización se inició con un programa de PCR tiempo real similar en condiciones al PCR punto final para detección de VHS-2. Sin embargo, se añadió una fase previa de 2 minutos a 52°C para activar a la enzima Taq polimerasa. Así mismo, se incrementó el periodo de activación a 95°C durante 10 minutos y finalmente, se cambió la extensión final a 72°C por una etapa de disociación que nos permitió ver la cantidad de productos que se estaban generando.

La estandarización se llevó a cabo utilizando el equipo de PCR tiempo real de la marca *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System* con el software *StepOne* (Applied Biosystems, 2010). El proceso de estandarización de las muestras se inició con la mezcla *FastStart Mix SYBR Green* de ROCHE y los iniciadores HSV y HSV2 (descritos anteriormente). La mezcla de reacción se basó en las indicaciones de la casa comercial ROCHE para el uso de *SYBR Green* (agente intercalante) (ROCHE, 2007).

La mezcla *SYBR Green* (2X) contiene todo lo necesario para la reacción de PCR tiempo real, a excepción de la muestra y los iniciadores. Los componentes de la reacción que se describen a continuación, se encuentran en una solución amortiguadora de marca registrada ROCHE (ROCHE, 2007).

- Taq polimerasa (DNA Polimerasa rápida AmpliTaq): está diseñada para permitir un aumento de la temperatura instantáneo, minimizando la formación de productos no específicos.
- Colorante *SYBR Green I*: permite la detección de DNA de doble cadena.
- Desoxirribonucleótidos (dNTPs): componentes para sintetizar los productos de amplificación.
- Glicosilasa uracilo-DNA (UDG): diseñada para reducir la contaminación por arrastre.
- Un control de referencia pasiva basada en el colorante *ROX* (patentado): para incrementar la precisión del ensayo.

Cada uno de los ensayos, incluyó como control negativo: agua, y como control positivo: DNA de células SiHa y DNA de la cepa G de VHS-2 cultivado en células Vero (Herrera-Martínez et al., 2005). La mezcla de reacción inicial utilizada, de acuerdo a lo ya reportado es: *SYBR Green 2X*, 0.07pmol/ μ L del iniciador HSV, 0.08pmol/ μ L del iniciador HSV2, 4.1 μ L de agua y 1 μ L de DNA molde en un volumen final de 15 μ L (Legoff et al., 2006).

De la misma manera, se trabajó en la estandarización del ensayo de tiempo real para β -globina humana, usando las mismas condiciones de reacción que las referentes al PCR punto final. Se está utilizó el mismo equipo de PCR tiempo real ya descrito, y de manera inicial se utilizó la mezcla *FastStart Mix SYBR Green* de ROCHE y los iniciadores GH20 y PC04 (Madhavan, Priya and Bagyalakshmi, 2003).

Debido a que durante los primeros ensayos de estandarización del PCR tiempo real para β -globina humana y VHS-2 se presentaron algunos inconvenientes en la amplificación del producto esperado, se recurrió al diseño bioinformático de nuevos oligonucleótidos específicos para cada amplicón de interés; así como al cambio de mezcla de reacción y al uso de reactivos *Thermo Scientific*.

Al igual que la mezcla *SYBR Green* de ROCHE, el *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* contiene la Taq Polimerasa *Maxima "Hot Start"*, un amortiguador de reacción (*Maxima SYBR Green qPCR buffer*) que incluye KCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el colorante intercalante fluorescente *SYBR Green I*, el colorante de referencia pasiva *ROX* y dUTP (Thermo Scientific., 2011).

Durante el nuevo proceso de estandarización del PCR tiempo real, se utilizaron las condiciones de PCR y la mezcla de reacción propuesta por el fabricante. De manera similar a los ensayos anteriores, se utilizó como control negativo agua, y como control positivo DNA de la cepa G de VHS-2 cultivado en células Vero (Herrera-Martínez et al., 2005), como DNA de células SiHa para la estandarización de los ensayos referentes a β -globina humana.

Algunos de los principales cambios en el nuevo proceso de estandarización, estuvieron relacionados con el cambio de temperatura de alineación de cada ciclo de PCR (específico para β -globina humana y VHS-2). Adicionalmente, se hicieron algunas modificaciones en la temperatura de activación de la Taq polimerasa y en las temperaturas y tiempos de la curva de disociación.

Los ensayos de PCR tiempo real tanto para β -globina humana como para VHS-2, incluyeron la realización de curvas estándar para ambos; así como el procesamiento de las muestras positivas a VHS-2 en PCR punto final.

El objetivo de la curva estándar asociada a una gráfica de regresión lineal logarítmica, fue el de determinar el rango lineal dinámico de cada estandarización: la de β -globina humana y la de VHS-2.

Con los resultados (C_t) de cada muestra, se realizó una cuantificación relativa de VHS-2 de cada muestra (tomando como base la amplificación de β -globina humana). Los resultados se interpretaron como las veces que se expresó VHS-2 con respecto a β -globina humana.

Una vez con los C_t correspondientes a β -globina humana y VHS-2 para cada muestra, se realizó una extrapolación de estos en las curvas estándar obtenidas mediante el uso del programa xmgrace.

DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR EN TIEMPO REAL.

Con el objetivo de lograr una amplificación más certera y correcta del producto de interés, fueron diseñados un par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de la β -globina humana y otro para amplificar VHS-2.

El diseño bioinformático se basó en generar oligonucleótidos que cumplieran con las características mínimas de calidad (por ejemplo, porcentaje de GC, tamaño, T_m , etcétera), pero sobre todo, en diseñar un par de oligonucleótidos que no tuvieran interacciones de tipo homodimérico ni heterodimérico. Para esto, se utilizó el programa *PrimerQuest* de *IDT Tools* (disponible en: <http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>), en la opción de PCR tiempo real para agentes intercalantes (por ejemplo, *SYBR Green*).

Con la finalidad de maximizar el rendimiento de la reacción de PCR tiempo real, los oligonucleótidos diseñados, amplifican una región de interés más pequeña que se encuentra interna en el amplicón original que se detectó en PCR punto final. Es decir, mientras el amplicón original para β -globina humana tenía un tamaño de 268pb, el nuevo amplicón (dentro del original) tiene una extensión de 140pb. La misma metodología se siguió para VHS-2, donde el amplicón original constaba de 391pb y el nuevo amplicón tiene una extensión de 151pb (FIGURAS 11 Y 12).

```

atatatctta gaggagggc tgagggtttg aagtccaact cctaagccag tcccagaaga
gccaaggaca ggtacggtg tcatactta gacctcacc tqtggagcca caccctaggg
ttggccaatc tactcccagg agcagggagg gcaggaacca gggctgggca taaaagtcag
ggcagagcca tctattgctt acatttgctt ctgaca caac tqtgttctact agcaacctca
aacagacacc atggtgcac tgactcctga ggagaagtct gccgttactg ccctgtgggg
caagggtgaac gtggatgaa ttggtggtga gccctgggc aggttggtat caaggttaca

```

FIGURA 11. AMPLICÓN PARA β -GLOBINA HUMANA.

En la figura se observa el amplicón original (268pb) flanqueado por su par de oligonucleótidos GH20 y PC04 (en azul) y en la zona interna en negritas el nuevo amplicón (140pb), delimitado también por sus oligonucleótidos nuevos F2qBETA y R2qBETA (en rosa).

```

atggtgaaca tcgacatgta cggcatc accgacaagg tcaaactctc cagctacaag
ctgaacgccg tcgccgaggc cgtcttgaag gacaagaaga aggatctgag ctaccgcgac
atcccgcct actacgcctc cggcccgcg cagcgcggg tgatcgccga gtattgtgtg
caggactcgc tcttggtcgg gcagctgttc ttcaagtctc tcccgcacct ggagctttcc
gccgtcgcgc gcttggcggg catcaacatc accgcacca tctacgacgg ccagcagatc
cgcgtcttca cgtgcctcct gcgccttgcg ggccagaagg gcttcatcct gccggacacc
cagggggcgt ttcggggcct cgacaaggag g

```

FIGURA 12. AMPLICÓN PARA VHS-2.

En la figura se observa el amplicón original (391pb) flanqueado por su par de oligonucleótidos HSV y HSV2 (en azul) y en la zona interna en negritas el nuevo amplicón (151pb), delimitado también por sus oligonucleótidos nuevos F1qVHS2 y R2qVHS2 (en rosa).

Además del tamaño y posición del amplicón, se buscó que los nuevos oligonucleótidos tuvieran las siguientes características: T_m no mayor de 5°C entre cada uno, un porcentaje de GC de entre 50-60%; y en cuanto a la formación de horquillas (*hairpins*), homodímeros y heterodímeros (con su correspondiente *forward* o *reverse*), se prefirió que estas interacciones fueran de baja importancia >-5Kcal/mol. De manera conjunta, se realizó un alineamiento del amplicón generado en la base de datos del NCBI, mediante la herramienta BLAST. Esto último para comprobar que solo se amplificará el producto de interés.

Una vez diseñados los oligonucleótidos, estos fueron analizados con el programa *OligoAnalyzer* 3.1 de *IDT Tools* (disponible en: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) para tener la certeza de que se cumpliera con los parámetros establecidos, y además el análisis de los oligonucleótidos originales y los nuevos (TABLAS 2-5).

| CARACTERÍSTICAS | GH20 | PC04 |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Secuencia (5'-3') | GAAGAGCCAAGGACAGGTAC | CAACTTCATCCACGTTCCACC |
| Tamaño (pb) | 20 | 20 |
| T _m | 55°C | 50°C |
| GC | 55% | 53.9% |
| Hairpin | > 0.25 kcal.mol ⁻¹ | > 1.03 kcal.mol ⁻¹ |
| Homodímeros | > -3.65 kcal/mol | -6.3 kcal/mol |
| Heterodímeros | -5.12 kcal/mol | -5.12 kcal/mol |
| BLAST | Solo con β-globina. | |

TABLA 2. ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ORIGINALES PARA β-GLOBINA HUMANA. En negritas se resaltan aquellas características que no cumplen con los parámetros para el diseño de oligonucleótidos.

| CARACTERÍSTICAS | F2qBETA | R2qBETA |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Secuencia (5'-3') | GGGCTGTCATCACTTAGACC TCAC | CCGCTGTCAGAAGCAAATG TAAGCAATAG |
| Tamaño (pb) | 24 | 29 |
| T _m | 59°C | 59.7°C |
| GC | 54.2% | 44.8% |
| Hairpin | -0.4 y 0.57 kcal.mol ⁻¹ | -0.53 kcal.mol ⁻¹ |
| Homodímeros | > -3.14 kcal/mol | > -4.74 kcal/mol |
| Heterodímeros | > -4.74 kcal/mol | > -4.74 kcal/mol |
| BLAST | Solo con β-globina. | |

TABLA 3. ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR β-GLOBINA HUMANA EN PCR TIEMPO REAL. En negritas se muestra una característica en el límite para considerar el diseño de buena calidad.

| CARACTERÍSTICAS | HSV | HSV2 |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Secuencia (5'-3') | ATGGTGAACATCGACATGTA CGG | CCTCCTTGTCGAGGCCCG AAAC |
| Tamaño (pb) | 23 | 23 |
| T _m | 57.1°C | 64°C |
| GC | 47.8% | 65.2% |
| Hairpin | > -0.93 kcal.mol ⁻¹ | > -1.1 kcal.mol ⁻¹ |
| Homodímeros | -8.07, -6.76 kcal/mol | -9.28, -6.76, -6.24 kcal/mol |
| Heterodímeros | -10.06, -6.68, -5.19 kcal/mol | -10.06, -6.68, -5.19 kcal/mol |
| BLAST | Solo con VHS-2. | |

TABLA 4. ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ORIGINALES PARA VHS-2. En negritas se resaltan aquellas características que no cumplen con los parámetros para el diseño de oligonucleótidos.

| CARACTERÍSTICAS | F1qVHS2 | R2qVHS2 |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Secuencia (5'-3') | TCACCGACAAGGTCAAACCTC | ACACAATACTCGCCGATCAC |
| Tamaño (pb) | 20 | 20 |
| T _m | 54.8°C | 54.9°C |
| GC | 50% | 50% |
| Hairpin | > -1.2 kcal.mol ⁻¹ | > -2.01 kcal.mol ⁻¹ |
| Homodímeros | > -4.41 kcal/mol | > -5.29 kcal/mol |
| Heterodímeros | -5.19 kcal/mol | -5.19 kcal/mol |
| BLAST | Solo con VHS-2. | |

TABLA 5. ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR VHS-2 EN PCR TIEMPO REAL.

Se resaltan en negritas aquellas características que se consideraron en el límite para considerar el diseño de buena calidad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO-EPIDEMIOLÓGICO.

Los datos obtenidos del cuestionario de cada participante en el estudio madre, fueron clasificados en 13 variables agrupadas en dos rubros. Las sociodemográficas que incluyeron edad, escolaridad, tabaquismo, alcohol y uso de drogas; y las de comportamiento sexual y clínicas donde se incluyeron ITS, sexo ocasional, uso de condón, número de hombres en los últimos 6 meses, tiempo de diagnóstico de VIH, cuenta de células T CD4⁺, carga viral de VIH y tiempo de terapia antirretroviral. Para el desarrollo del análisis estadístico, la prevalencia de VHS-2 en muestras de citología anal y de hisopados genitales se conjuntaron en una prevalencia general y el resultado conformó la variable proporción de VHS-2 anal y genital.

Las variables resultantes fueron recodificadas para el análisis tal y como se describe en el ANEXO 8, así mismo se incluyeron para cada variable los datos faltantes bajo la categoría “perdidos”. Para el análisis de los datos se utilizó el programa *IBM SPSS Statistics 20*.

Inicialmente, fueron realizadas tablas de frecuencias simples de cada variable, con la finalidad de describir a la población de estudio.

Posteriormente, entre las 13 variables independientes utilizadas en este análisis y la variable dependiente (proporción de VHS-2 anal y genital) se realizó un análisis bivariado mediante la generación de tablas de contingencia (tipo 2x2) donde se llevaron a cabo pruebas estadísticas χ^2 y cuando correspondió se llevó a cabo la prueba exacta de Fisher; esto con el objetivo de determinar posibles asociaciones estadísticamente significativas entre las variables independientes y la variable dependiente. Las variables estadísticamente significativas fueron aquellas con un valor de $p < 0.05$.

En aquellas variables que resultaron estadísticamente significativas se realizaron pruebas estadísticas χ^2 en combinaciones de 2 categorías de cada variable, con la finalidad de determinar que categoría o categorías dentro de las variables

estadísticamente significativas realmente tenían una asociación con la proporción de VHS-2 anal y genital (variable dependiente).

La proporción de VHS-2 anal y genital en las categorías de cada variable fueron reportadas en porcentaje, con el objetivo de corregir las diferencias de tamaño (n) entre las categorías analizadas.

Con el fin de establecer relaciones estadísticamente significativas entre las variables clínicas cuantitativas y la variable dependiente, se realizaron pruebas t de student (para comparación de medias con datos de distribución normal) y prueba U de Mann-Whitney (para comparación de medianas con datos que no cumplen con una distribución normal) con respecto a la variable proporción VHS-2 anal y genital.

RESULTADOS

DETECCIÓN DE DNA DE VHS-2 EN MUESTRAS DE CITOLOGÍA ANAL Y DE HISOPADOS GENITALES POR PCR PUNTO FINAL.

La determinación de anticuerpos contra VHS-2 se obtuvo de manera previa a este proyecto, y conjuntó un total de 338 muestras que resultaron positivas ($338/595=0.568 =56.8\%$ del total). Estas 338 muestras de citología anal fueron organizadas en *pools* de 4 que fueron procesados para detectar un fragmento de DNA de VHS-2 (391pb); de esta manera se obtuvieron 84 *pools* (considerando las muestras perdidas).

Aquellos *pools* que resultaron positivos en el PCR punto final, fueron separados en cada una de sus muestras individuales y procesados de nuevo por PCR punto final. Esto último con el objetivo de determinar cuáles muestras individuales eran verdaderamente positivas.

Para este grupo de muestras (citología anal) se obtuvieron 7 que amplificaron VHS-2 ($7/338= 0.0207 =2.07\%$ del total) y fueron consideradas como positivas (FIGURA 13). Cabe destacar, que estas muestras fueron tomadas de individuos sin lesiones típicas de VHS-2.

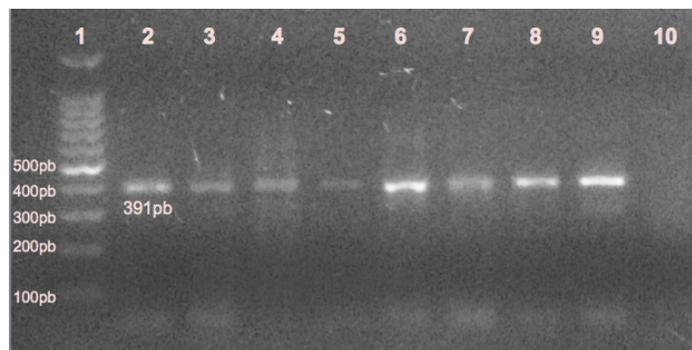


FIGURA 13. ELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS DE CITOLOGÍA ANAL.

Gel de agarosa al 2% donde se observan los productos de PCR hechos a partir de las muestras de citología anal positivas a VHS-2.

Carril 1→ marcador de peso molecular (donde se resaltan las bandas de 500-100pb).

Carril 2→ control positivo de DNA de VHS-2.

Carril 10→ control negativo (agua).

Carriles 3 a 9 → muestras positivas.

De las 338 muestras de suero que resultaron con anticuerpos contra VHS-2, se tenían también las muestras de hisopados genitales; al igual que las muestras de citología anal estas fueron organizadas en 84 *pools* que fueron procesados para amplificar un fragmento de VHS-2 por PCR punto final.

Los *pools* que resultaron positivos en el PCR punto final, fueron separados en cada una de sus muestras individuales y procesadas de nuevo por PCR punto final; esto último con el objetivo de determinar cuáles muestras individuales eran verdaderamente positivas.

En este grupo de muestras (hisopados genitales) se obtuvieron 13 que amplificaron VHS-2 ($13/338 = 0.0384 = 3.84\%$ del total) y fueron consideradas como positivas (FIGURA 14). Al igual que las muestras de citología anal, estas muestras pertenecen individuos que no tenían lesiones típicas del VHS-2.

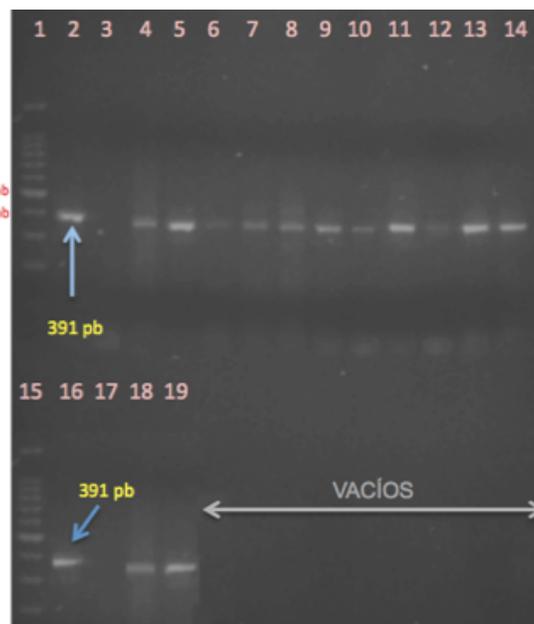


FIGURA 14. ELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS DE HISOPADOS GENITALES. Gel de agarosa al 2% donde se observan los productos de PCR hechos a partir de las muestras de hisopados genitales que amplificaron VHS-2. Carriles 1 y 15 → marcador de peso molecular (resaltadas las bandas de 500 y 400pb). Carriles 2 y 16 → control positivo de DNA de VHS-2. Carriles 3 y 17 → control negativo (agua). Carriles 4-14 y 18, 19 → muestras positivas.

De las 20 muestras positivas obtenidas por PCR punto final (7 de citología anal y 13 de hisopados genitales), se encontraron 2 muestras coincidentes, es decir que tanto la muestra de citología anal y la de hisopado genital del mismo individuo resultaron positivas (muestras ECO290 y ECO334). De esta manera el porcentaje total de VHS-2 encontrado en los 338 individuos analizados resultó de $18/338=5.32\%$.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR TIEMPO REAL.

Como parte inicial de la estandarización del PCR tiempo real, se llevó a cabo una validación de tamaño de los oligonucleótidos diseñados (F2qBETA, R2qBETA, F1qVHS2 y R2qVHS2). Para esto se realizó un PCR punto final usando dichos oligonucleótidos, y posteriormente las muestras resultantes se corrieron en un gel de agarosa LE al 3% a 75V por 30 minutos. El uso de marcador de peso molecular permitió determinar el tamaño de la banda obtenida y compararla con la referente al diseño, con lo cual se corroboró que el tamaño de las bandas correspondían a lo esperado, 140pb para β -globina humana y 151pb para VHS-2 (FIGURA 15).

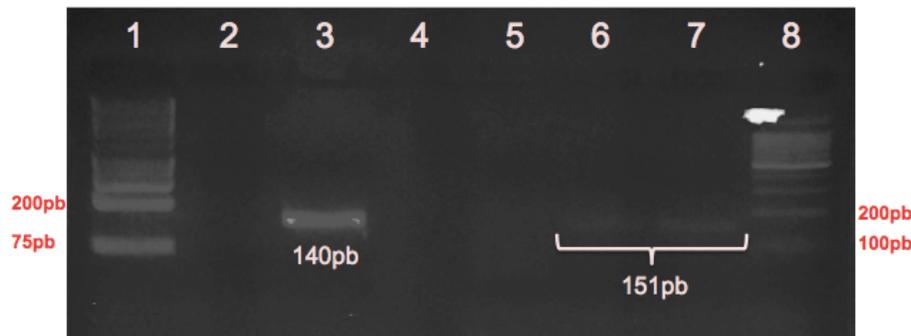


FIGURA 15. VALIDACIÓN DE TAMAÑO OLIGONUCLEÓTIDOS.

En la figura se muestra un gel de agarosa al 3%, donde se resalta en los carriles 1 y 8 el marcador de peso molecular de 1Kb y 100pb respectivamente. Así mismo, el carril 2 corresponde al control negativo del PCR de β -globina humana y en el carril 3 al control positivo (140pb). En el carril 5 se muestra el control negativo del PCR de VHS-2 y en los carriles 6 y 7 se resaltan los controles positivos de VHS-2 (151pb).

Con el uso de los reactivos *Thermo Scientific* y modificando algunas condiciones del ciclo de PCR tiempo real (eliminación de la extensión final, modificación de la temperatura de alineación de los oligonucleótidos, disminución de los tiempos de cada etapa durante la reacción y disminución del número de ciclos) se logró la estandarización del ciclo y mezcla de PCR específica para β -globina humana y VHS-2 (ANEXO 4).

Para sustentar la estandarización de los ensayos de tiempo real, se tomó como base la curva de disociación de cada ensayo, asegurándonos de que solo mostrara un pico (correspondiente a un solo producto de amplificación) (FIGURA 16).

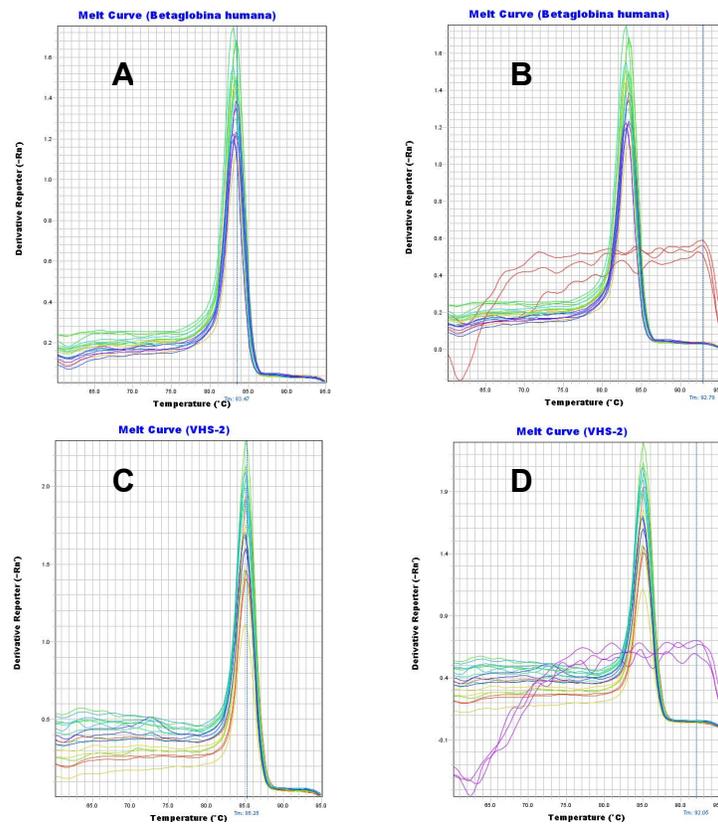


FIGURA 16. CURVAS DE DISOCIACIÓN, ENSAYO DE PCR TIEMPO REAL.

A) El panel A muestra la curva de disociación de β -globina humana solo de las muestras con DNA blanco, donde se reporta una T_m del amplicón 83.47°C. B) En la derecha superior el panel B, curva de disociación del panel A donde se muestra el NTC (líneas rojas). C) El panel C muestra la curva de disociación de VHS-2, solo de las muestras con DNA blanco, donde se reporta una T_m del amplicón 85.25°C. D) El panel D en la derecha inferior, curva de disociación del panel C donde se muestra el NTC (líneas violetas).

Una vez con la mezcla de reacción adecuada, el ciclo de PCR óptimo y la certeza de que se estaba amplificando un solo producto correspondiente al producto de interés (mediante curvas de disociación); se generaron diluciones seriadas (6 órdenes de magnitud) con un factor de dilución 10 de DNA blanco, tanto de β -globina humana (concentración inicial de DNA 3.3ng/ μ L) como de VHS-2 (concentración inicial de DNA 6ng/ μ L). Cada una de las diluciones fue procesada con 3 réplicas y se calculó de cada una su promedio, desviación estándar y coeficiente de variación; procurando que este último no sobrepasara del 3%).

La finalidad de dichos ensayos fue obtener curvas estándar para determinar el rango lineal de la reacción y realizar una posible interpolación de las muestras problema. Además, la generación de las curvas estándar para la reacción de PCR de β -globina humana y VHS-2, permitió calcular la pendiente y por tanto la eficiencia de cada reacción; las cuales resultaron dentro de los parámetros deseados E = 90-110% (TABLAS 6 Y 7; FIGURAS 17-22). Después de desarrollar múltiples ensayos resultaron las mejores curvas para cada gen (β -globina humana E= 95.668% y VHS-2 E= 102.792%); sin embargo, el rango dinámico de ambas resultó corto ya que los C_t de diluciones posteriores eran indistinguibles del NTC.

| BETA [1 μ L DNA] | 1:10 (3.3ng/ μ L) | 1:100 | 1:1000 | 1:10000 | 1:100000 | 1:1000000 | AGUA |
|-------------------------|--------------------------|-------|--------|---------|----------|-----------|--------------|
| Replica 1 | 4.58 | 9.67 | 13.36 | 17.28 | 19.48 | 21.62 | Undetermined |
| Replica 2 | | | 13.31 | 17.16 | 19.06 | 21.96 | Undetermined |
| Replica 3 | 4.48 | 10.33 | 13.18 | 16.81 | 19.44 | 21.91 | Undetermined |
| Promedio | 4.53 | 10.00 | 13.29 | 17.08 | 19.33 | 21.83 | #!DIV/0! |
| Desv.Est. | 0.07 | 0.47 | 0.09 | 0.24 | 0.23 | 0.18 | #!DIV/0! |
| C.V. | 1.58 | 4.66 | 0.70 | 1.41 | 1.19 | 0.84 | #!DIV/0! |

TABLA 6. RESULTADOS DE CICLOS UMBRAL (C_t) DEL PCR TIEMPO REAL PARA EL ENSAYO DE LA CURVA ESTÁNDAR PARA β -GLOBINA HUMANA.

Desv.Est.: desviación estándar y C.V. coeficiente de variación en %. Los datos faltantes correspondientes a la réplica 2 de la dilución 1:10 y 1:100 no fueron tomados en cuenta debido a que afectaban el coeficiente de variación y este salía del límite establecido (< 5%).

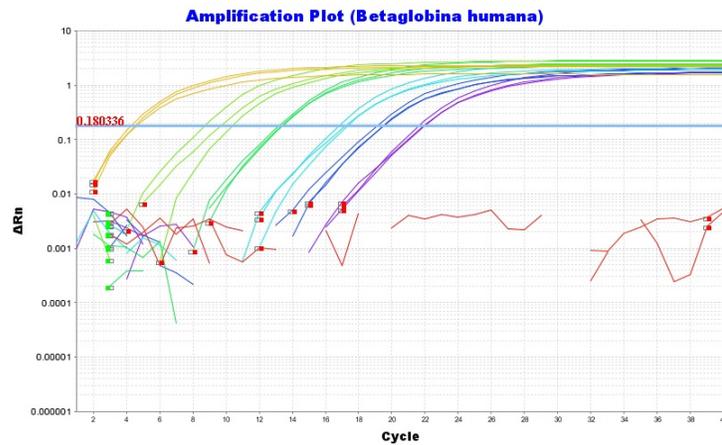


FIGURA 17. GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS PARA β -GLOBINA HUMANA.

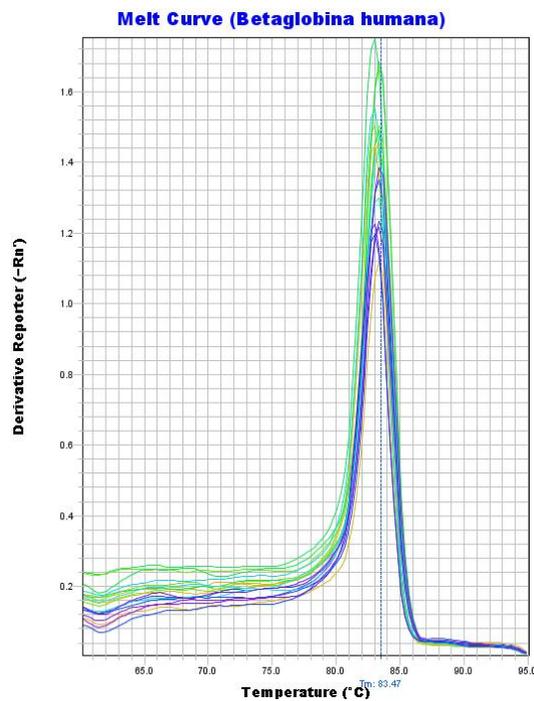


FIGURA 18. CURVA DE DISOCIACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS PARA β -GLOBINA HUMANA.

En esta gráfica se puede corroborar la existencia de un solo pico que corresponde a un solo producto de la amplificación, con una T_m de 83.47°C.

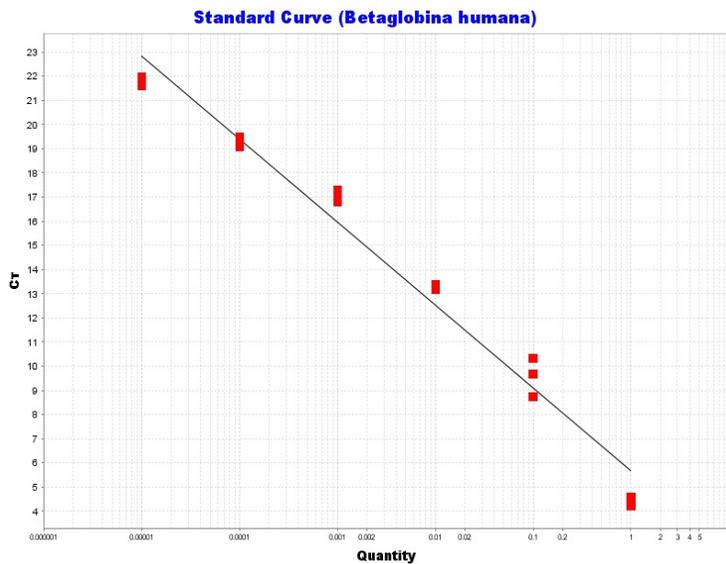


FIGURA 19. CURVA ESTÁNDAR PARA β -GLOBINA HUMANA. En la gráfica semilogarítmica los valores de C_t se muestran en cuadros rojos para las 6 diluciones del DNA base (10^{-1} – 10^{-6}), cada uno con sus correspondientes 3 réplicas (se puede observar la dispersión de las mismas).

Ecuación asociada:
 $y = -3.43 \log(x) + 5.678$.
 $R^2: 0.976$.
 Eficiencia (E): **95.668%**

| VHS-2 [1 μ L DNA] | 1:10 (6ng/ μ L) | 1:100 | 1:1000 | 1:10000 | 1:100000 | 1:1000000 | AGUA |
|--------------------------|------------------------|-------|--------|---------|----------|-----------|--------------|
| Replica 1 | 10.06 | | 19.12 | 22.18 | 23.55 | 26.10 | Undetermined |
| Replica 2 | | 14.09 | 18.78 | 21.96 | 23.55 | 26.30 | Undetermined |
| Replica 3 | 9.77 | 13.94 | 18.28 | 22.18 | 23.92 | 26.11 | Undetermined |
| Promedio | 9.91 | 14.02 | 18.72 | 22.11 | 23.68 | 26.17 | #1DIV/0! |
| Desv.Est. | 0.21 | 0.11 | 0.42 | 0.13 | 0.21 | 0.12 | #1DIV/0! |
| C.V. | 2.08 | 0.75 | 2.25 | 0.57 | 0.90 | 0.44 | #1DIV/0! |

TABLA 7. RESULTADOS DE CICLOS UMBRAL (C_t) DEL PCR TIEMPO REAL PARA EL ENSAYO DE LA CURVA ESTÁNDAR PARA VHS-2.

Réplica: valor de C_t de cada muestra, Desv.Est.: desviación estándar y C.V. coeficiente de variación en %. Los datos faltantes correspondientes a la réplica 2 de la dilución 1:10 y la réplica 1 de la dilución 1:100 no fueron tomados en cuenta debido a que afectaban el coeficiente de variación y este salía del límite establecido (< 5%).

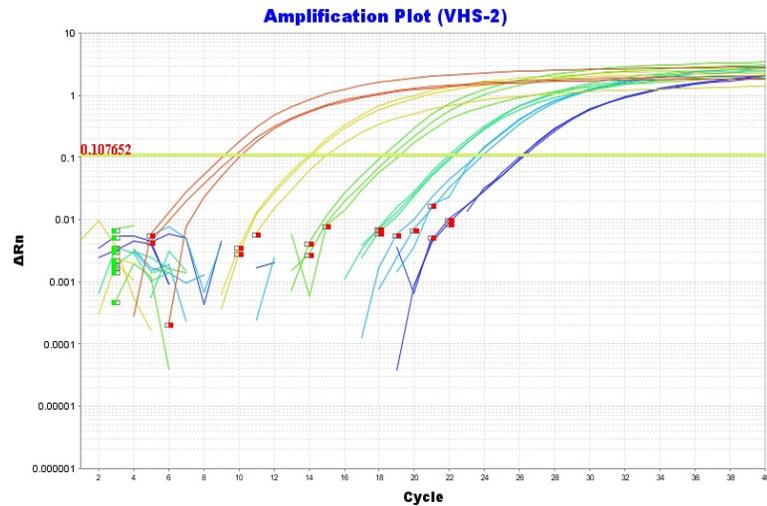


FIGURA 20. GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS PARA VHS-2.

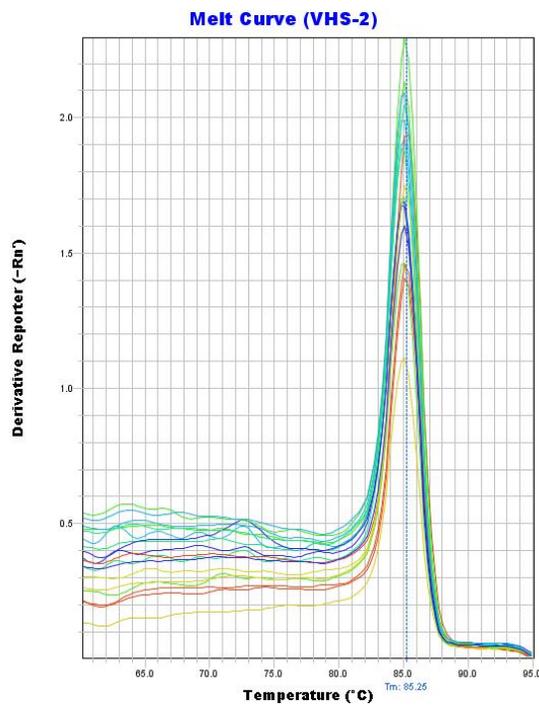


FIGURA 21. CURVA DE DISOCIACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS PARA VHS-2.
En esta gráfica se puede corroborar la existencia de un solo pico que corresponde a un solo producto de la amplificación, con una T_m de 85.25°C.

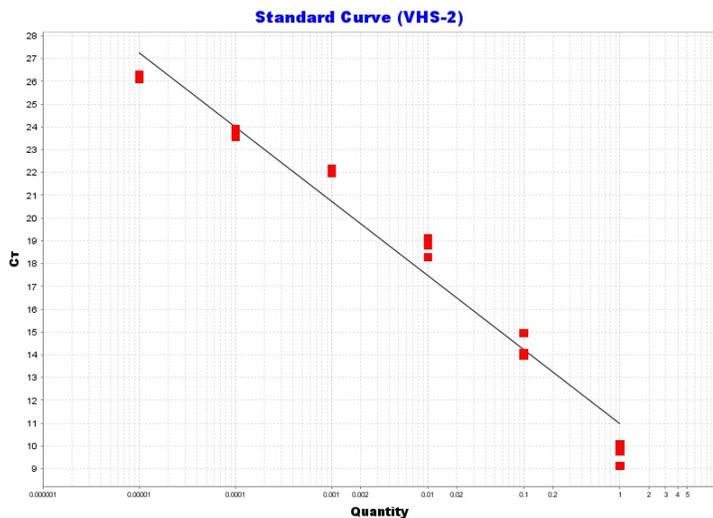


FIGURA 22. CURVA ESTÁNDAR PARA VHS-2.

En la gráfica semilogarítmica los valores de C_t se muestran en cuadros rojos para las 6 diluciones del DNA base ($10^{-1} - 10^{-6}$), cada uno con sus correspondientes 3 réplicas (se puede observar la dispersión de las mismas).

Ecuación asociada:
 $y = -3.275 \log(x) + 10.968$.
 $R^2: 0.964$.
 Eficiencia (E): **102.792%**

CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE MUESTRAS DE HISOPADOS GENITALES Y DE CITOLOGÍA ANAL POSITIVAS A VHS-2.

Las muestras que resultaron positivas a VHS-2 por PCR punto final (7 de citología anal y 13 de hisopados genitales), fueron procesadas por PCR tiempo real. De la misma manera que para la generación de las curvas estándar, en los ensayos de procesamiento de muestras problema también se incluyeron controles negativos (NTC) y cada una de las muestras se procesó con sus 3 réplicas. Así mismo, para cada resultado triplicado se calculó su promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (preferible por debajo de 3%). Se utilizaron la mezcla de PCR y el ciclo previamente estandarizado para cada gen (TABLAS 8 Y 9; FIGURAS 23-26).

| β-globina | agua | ECO048 | ECO062 | ECO064 | ECO290 | ECO334 | ECO361 | ECO503 |
|--------------------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| promedio | Undetermined | 28.79 | 23.30 | 25.00 | 26.58 | 28.87 | 26.32 | 24.71 |
| desviación estándar | Undetermined | 0.09 | 0.06 | 0.06 | 0.21 | 0.18 | 0.30 | 0.29 |
| coeficiente de variación | Undetermined | 0.31 | 0.25 | 0.24 | 0.78 | 0.61 | 1.12 | 1.19 |

| VHS-2 | agua | ECO048 | ECO062 | ECO064 | ECO290 | ECO334 | ECO361 | ECO503 |
|--------------------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| promedio | Undetermined | 21.05 | 24.52 | 27.57 | 20.56 | 23.13 | 25.18 | 25.79 |
| desviación estándar | Undetermined | 0.25 | 0.27 | 0.46 | 0.03 | 0.13 | 0.28 | 0.19 |
| coeficiente de variación | Undetermined | 1.21 | 1.11 | 1.65 | 0.15 | 0.56 | 1.13 | 0.73 |

TABLA 8. RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN DE β-GLOBINA HUMANA Y VHS-2 EN LAS MUESTRAS DE CITOLOGÍA ANAL POSITIVAS A VHS-2.

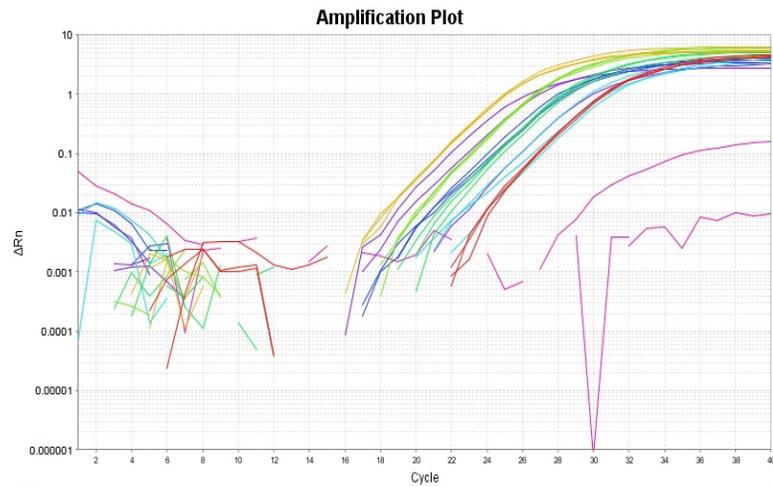


FIGURA 23. GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CITOLOGÍA ANAL QUE RESULTARON POSITIVAS A VHS-2.

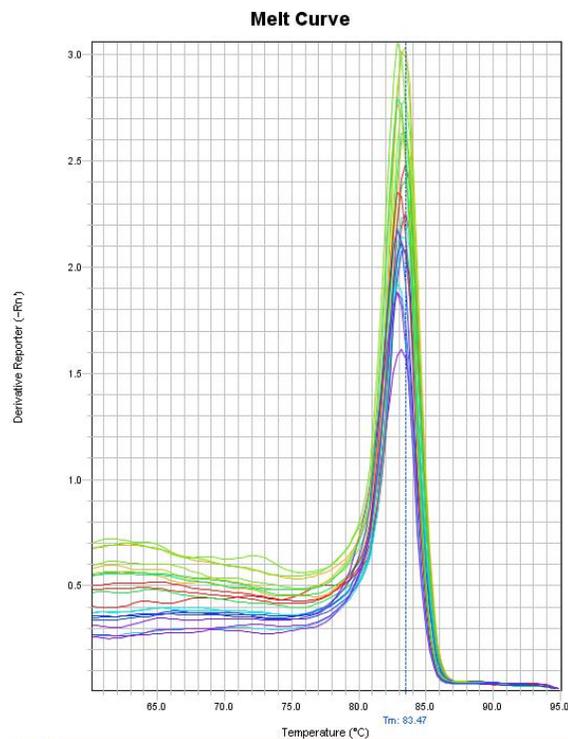


FIGURA 24. CURVA DE DISOCIACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CITOLOGÍA ANAL QUE RESULTARON POSITIVAS A VHS-2.

Se puede corroborar la existencia de un solo pico que corresponde a un solo producto de la amplificación, con una T_m de 83.47°C.

| β-globina promedio desviación estándar coeficiente de variación | agua | ECO253 | ECO290 | ECO297 | ECO300 | ECO322 | ECO334 | ECO409 | ECO432 | ECO472 | ECO475 | ECO477 | ECO493 | ECO576 |
|---|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Undetermined | 30.88 | 26.91 | 27.87 | 28.29 | 30.86 | 30.45 | 31.45 | 28.74 | 28.67 | 28.65 | 24.93 | 24.70 | 28.23 |
| | Undetermined | 0.10 | 0.33 | 0.19 | 0.14 | 0.24 | 0.31 | 0.43 | 0.24 | 0.24 | 0.14 | 0.06 | 0.06 | 0.21 |
| | Undetermined | 0.34 | 1.22 | 0.69 | 0.49 | 0.77 | 1.03 | 1.38 | 0.84 | 0.83 | 0.48 | 0.22 | 0.26 | 0.73 |

| VHS-2 promedio desviación estándar coeficiente de variación | agua | ECO253 | ECO290 | ECO297 | ECO300 | ECO322 | ECO334 | ECO409 | ECO432 | ECO472 | ECO475 | ECO477 | ECO493 | ECO576 |
|---|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Undetermined | 27.59 | 21.92 | 26.95 | 24.10 | 25.52 | 25.48 | 28.70 | 25.63 | 27.55 | 25.29 | 24.42 | 29.62 | 23.26 |
| | Undetermined | 0.28 | 0.30 | 0.20 | 0.14 | 0.43 | 0.20 | 0.36 | 0.33 | 0.07 | 0.14 | 0.14 | 0.17 | 0.28 |
| | Undetermined | 1.01 | 1.39 | 0.73 | 0.58 | 1.67 | 0.78 | 1.26 | 1.28 | 0.27 | 0.57 | 0.56 | 0.58 | 1.20 |

TABLA 9. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE HISOPADOS GENITALES POSITIVAS A VHS-2.

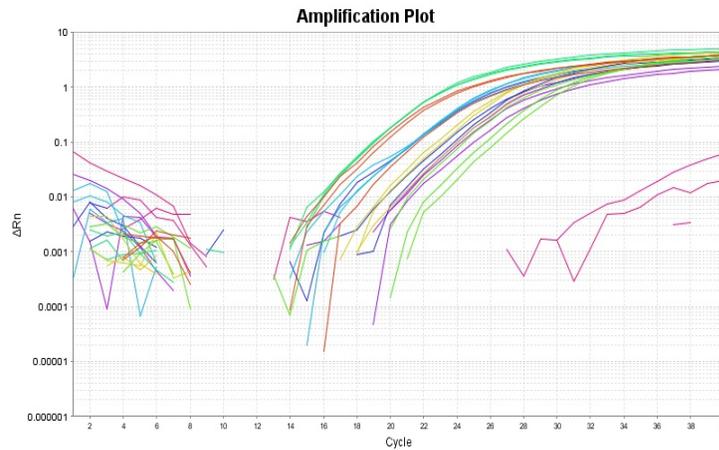


FIGURA 25. GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HISOPADOS GENITALES QUE RESULTARON POSITIVAS A VHS-2.

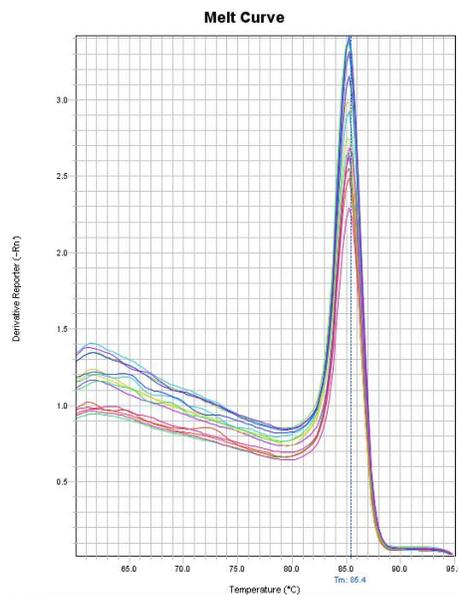


FIGURA 26. CURVA DE DISOCIACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HISOPADOS GENITALES QUE RESULTARON POSITIVAS A VHS-2.

Se puede corroborar la existencia de un solo pico que corresponde a un solo producto de la amplificación, con una T_m de 85.40°C.

Los C_t obtenidos al procesar las muestras problema resultaron por encima de los obtenidos en las curvas estándar correspondientes, debido a esto solamente se pudieron interpolar a la curva estándar un mínimo de muestras problema (Tablas 6 y 7 vs. 8 y 9). Aceptando esta limitante (que es constante para los dos genes y los dos tipos de muestras), con el uso del programa xmgrace (disponible en <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/doc/Tutorial.html#s6>) fueron realizadas curvas de extrapolación teórica de los C_t correspondientes a la muestras problema. Esto se realizó bajo la aseveración de que las muestras que caen por encima de los C_t de la curva estándar no se encuentran en el rango lineal de la reacción (FIGURAS 27 Y 28), por lo tanto su eficiencia podría ser más baja que la reportada en las curvas estándar; lo que implica que en cada ciclo no se está duplicando totalmente el DNA blanco y es muy probable que el resultado de la muestra esté subestimado.

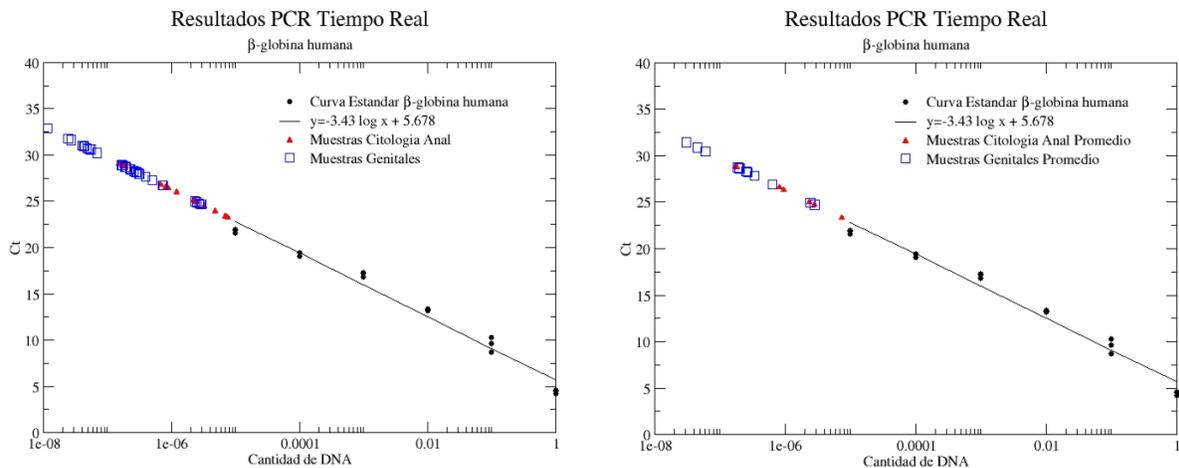


FIGURA 27. CURVAS ESTÁNDAR PARA β -GLOBINA HUMANA (PROGRAMA XMGRACE). IZQUIERDA, los puntos negros corresponden a las diluciones de la curva estándar con sus réplicas. En triángulos rojos se encuentran las muestras de citología anal también con réplicas, y finalmente los cuadrados azules representan a las muestras de hisopados genitales también con réplicas. Como se puede observar, en el caso de β -globina humana ninguna de las muestras problema se pudo interpolar en la curva estándar. DERECHA, los puntos negros corresponden a las diluciones de la curva estándar con sus réplicas. En triángulos rojos se encuentran los promedios de las muestras de citología, y los cuadrados azules representan los promedios de las muestras de hisopados genitales.

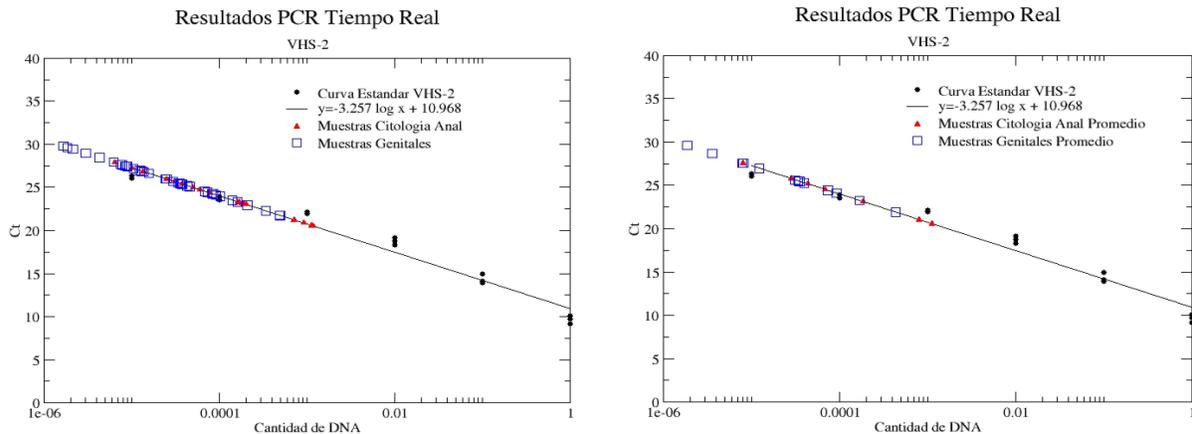


FIGURA 28. CURVA ESTÁNDAR PARA VHS-2 (PROGRAMA XMGRACE).

IZQUIERDA, los puntos negros corresponden a las diluciones de la curva estándar con sus réplicas. En triángulos rojos se encuentran las muestras de citología anal también con réplicas, y finalmente los cuadrados azules representan a las muestras de hisopados genitales también con réplicas. Como se puede observar, solamente 1 muestra de citología anal y 5 de genitales no se pudieron interpolar a la curva estándar. DERECHA, los puntos negros corresponden a las diluciones de la curva estándar con sus réplicas. En triángulos rojos se encuentran los promedios de las muestras de citología, y los cuadrados azules representan los promedios de las muestras de hisopados genitales. En esta gráfica es más sencillo distinguir aquellas muestras que no pudieron interpolarse en la curva estándar.

Una vez que se tuvieron los datos correspondientes al procesamiento de las muestras, tanto para amplificar β -globina humana como VHS-2, se llevó a cabo un análisis de tipo cuantificación relativa (Life technologies, 2014).

Para dicho análisis se realizó una comparación de C_t tomando como referencia la expresión de un gen constitutivo la β -globina humana, y contrastándola con la expresión de VHS-2 en cada muestra (ΔC_t). Esta diferencia de expresión, se integró a la fórmula general del PCR (2^n) en lugar de la potencia quedando la fórmula final como $2^{-\Delta C_t}$. El resultado obtenido de este método comparativo se interpreta como el número de veces que se expresó un gen de interés con respecto del gen constitutivo. En este proyecto el gen de interés fue el de VHS-2 y el gen constitutivo el de la β -globina humana, los resultados fueron calculados de la siguiente manera:

$\Delta C_t = C_t$ del gen de interés (VHS-2) – C_t del gen de expresión constitutiva (β -globina humana)

$2^{-\Delta C_t}$, donde $-\Delta C_t$ corresponde a la diferencia de expresión entre el gen de interés y el gen de expresión constitutiva.

El resultado se expresa sin unidades, se lee como cuantas veces más se expresó (cuantas veces más está presente) VHS-2 con respecto del gen constitutivo β -globina humana. Los resultados obtenidos para cada muestra (7 de citología anal y 13 de hisopados genitales) se detallan en la siguiente tabla:

| Muestras de hisopados genitales | Ct VHS-2 | Ct β -globina | ΔC_t | $2^{-\Delta C_t}$ |
|---------------------------------|----------|---------------------|--------------|-------------------|
| ECO253 | 27.59 | 30.88 | -3.29 | 9.78 |
| ECO290 | 21.92 | 26.91 | -4.99 | 31.78 |
| ECO297 | 26.95 | 27.87 | -0.92 | 1.89 |
| ECO300 | 24.10 | 28.29 | -4.19 | 18.25 |
| ECO322 | 25.52 | 30.86 | -5.34 | 40.50 |
| ECO334 | 25.48 | 30.45 | -4.97 | 31.34 |
| ECO409 | 28.70 | 31.45 | -2.75 | 6.73 |
| ECO432 | 25.63 | 28.74 | -3.11 | 8.63 |
| ECO472 | 27.55 | 28.67 | -1.12 | 2.17 |
| ECO475 | 25.29 | 28.65 | -3.36 | 10.27 |
| ECO477 | 24.42 | 24.93 | -0.51 | 1.42 |
| ECO493 | 29.62 | 24.70 | 4.92 | 0.03 |
| ECO576 | 23.26 | 28.23 | -4.97 | 31.34 |
| Muestras de citología anal | Ct VHS-2 | Ct β -globina | ΔC_t | $2^{-\Delta C_t}$ |
| ECO048 | 21.05 | 28.79 | -7.74 | 213.78 |
| ECO062 | 24.52 | 23.30 | 1.22 | 0.43 |
| ECO064 | 27.57 | 25.00 | 2.57 | 0.17 |
| ECO290 | 20.56 | 26.58 | -6.02 | 64.89 |
| ECO334 | 23.13 | 28.87 | -5.74 | 53.45 |
| ECO361 | 25.18 | 26.32 | -1.14 | 2.20 |
| ECO503 | 25.79 | 24.71 | 1.08 | 0.47 |

TABLA 10. RESULTADOS DEL MÉTODO COMPARATIVO PARA CADA MUESTRA PROCESADA.

En la columna 1 se encuentra el código de cada muestra y su naturaleza (hisopado genital o de citología anal), la columna de C_t VHS-2 se refiere al C_t que se obtuvo de cada muestra cuando fue procesada por PCR tiempo real para amplificar VHS-2, lo mismo para la columna C_t β -globina representa el C_t de la muestra al ser procesada por PCR tiempo real para amplificar β -globina humana, la columna ΔC_t se refiere a la diferencia de C_t de VHS-2 con respecto al C_t de β -globina humana, y la columna 5 ($2^{-\Delta C_t}$) corresponde a cuantas veces más se expresó VHS-2 con respecto de la β -globina humana. Los datos resaltados en rosa corresponden a las muestras que resultaron con mayor presencia de β -globina humana.

Como se observa en la tabla anterior, las muestras marcadas en azul claro son aquellas donde la expresión de VHS-2 fue mayor a la expresión de β -globina humana. Lo que quiere decir que la muestra contenía una cantidad mayor de DNA correspondiente a VHS-2 con respecto a lo que contenía de β -globina. Las muestras marcadas en rosa pálido cuyo valor es <1 , son aquellas en donde la expresión de VHS-2 resultó menor que la expresión de β -globina, lo cual indica que la muestra contenía una mayor cantidad de DNA correspondiente al gen constitutivo en comparación con el DNA de VHS-2.

La mayoría de las muestras (16/20 = 80%) presentaron mayor cantidad de DNA del gen de VHS-2 con respecto al DNA de β -globina humana.

Adicionalmente, las muestras problema fueron procesadas para amplificar β -globina humana mediante el *Abbott RealTime PCR High Risk HPV de Abbott*, que es un PCR tiempo real automatizado que utiliza sondas Taqman. La finalidad de este procesamiento fue la de comparar para cada muestra los C_t obtenidos para β -globina humana con el PCR tiempo real automatizado y el PCR tiempo real que se estandarizó para el presente proyecto.

A pesar de que el sistema de detección para ambos métodos era distinto (PCR tiempo real automatizado: sondas Taqman, y el PCR tiempo real recién estandarizado: *SYBR Green*), y de que el fragmento amplificado también lo era; la diferencia entre el C_t obtenido con la técnica automatizada y la obtenida con el PCR tiempo real recién estandarizado no sobrepasó los 3.32 ciclos (diferencia menor a un orden de magnitud), lo que indica si consideramos este pequeño experimento como un control de calidad externo al PCR tiempo real *per se* el resultado entre ambos es similar y enfatiza de manera positiva la estandarización realizada (TABLA 11).

| Muestras de hisopados genitales | | Ct β-globina | 2^(-ΔCt) | Ct β-globina automatizado | 2^(-ΔCt) |
|--|--|--------------------------------------|---------------------------|---|---------------------------|
| ECO253 | | 30.88 | 9.78 | 31.18 | 12.04 |
| ECO290 | | 26.91 | 31.78 | 25.08 | 8.94 |
| ECO297 | | 27.87 | 1.89 | 29.59 | 6.23 |
| ECO300 | | 28.29 | 18.25 | 25.13 | 2.04 |
| ECO322 | | 30.86 | 40.50 | 27.59 | 4.20 |
| ECO334 | | 30.45 | 31.34 | 28.23 | 6.73 |
| ECO409 | | 31.45 | 6.73 | 32.13 | 10.78 |
| ECO432 | | 28.74 | 8.63 | 28.02 | 5.24 |
| ECO472 | | 28.67 | 2.17 | 27.49 | 0.96 |
| ECO475 | | 28.65 | 10.27 | 27.84 | 5.86 |
| ECO477 | | 24.93 | 1.42 | 24.51 | 1.06 |
| ECO493 | | 24.70 | 0.03 | 23.95 | 0.02 |
| ECO576 | | 28.23 | 31.34 | 26.22 | 7.78 |
| Muestras de citología anal | | Ct β-globina | 2^(-ΔCt) | Ct β-globina automatizado | 2^(-ΔCt) |
| ECO048 | | 28.79 | 213.78 | 27.46 | 85.04 |
| ECO062 | | 23.30 | 0.43 | 27.43 | 7.52 |
| ECO064 | | 25.00 | 0.17 | 28.08 | 1.42 |
| ECO290 | | 26.58 | 64.89 | 24.37 | 14.03 |
| ECO334 | | 28.87 | 53.45 | 27.78 | 25.11 |
| ECO361 | | 26.32 | 2.20 | 24.58 | 0.66 |
| ECO503 | | 24.71 | 0.47 | 27.66 | 3.66 |

TABLA 11. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE C_t PARA β -GLOBINA HUMANA. En azul se muestran los datos de β -globina humana obtenidos mediante el PCR tiempo real estandarizado en el presente estudio, y en rosa pálido los datos obtenidos con el PCR tiempo real automatizado. Los cálculos de (2^{-ΔCt}) fueron realizados con respecto al Ct de VHS-2 obtenido en este estudio para cada una de las muestras (Ver tabla 10).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO-EPIDEMIOLÓGICO.

Como parte del análisis estadístico fueron analizados los datos de 336 participantes, los cuales se describen en las tablas 12 y 13. Estos datos fueron obtenidos de los cuestionarios aplicados a cada participante en la toma basal de las muestras, así como de sus expedientes clínicos. Durante la parte experimental previa de este trabajo, fueron procesadas mediante la técnica de ELISA 338 muestras, una de cada participante. Sin embargo, el análisis estadístico sólo incluye a 336 porque no se encontraron datos de dos de los participantes.

| | | n (336) | VHS-2 (%) | p |
|---------------|---------------------|---------|-----------|--------------|
| EDAD (años) | 18-25 | 47 | 8.5 | 0.576 |
| | 26-40 | 200 | 5 | |
| | >41 | 89 | 4.5 | |
| ESCOLARIDAD | Básica | 100 | 11 | 0.007 |
| | Media | 142 | 4.2 | |
| | Superior | 94 | 1.1 | |
| TABAQUISMO | Perdidos | 29 | 0 | 0.120 |
| | Actualmente fuma | 197 | 4.1 | |
| | Actualmente no fuma | 68 | 10.3 | |
| | Nunca ha fumado | 42 | 7.1 | |
| *ALCOHOL | Perdidos | 4 | 0 | 0.019 |
| | Nunca | 51 | 11.8 | |
| | Frecuente | 236 | 3 | |
| | Muy frecuente | 45 | 11.1 | |
| USO DE DROGAS | Si | 217 | 4.6 | 0.410 |
| | No | 119 | 6.7 | |

TABLA 12. VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS.

Donde VHS-2(%) se refiere a la proporción de la variable VHS-2 anal y genital en cada categoría.*Categorías de la variable alcohol hace referencia a tomar >5 copas en una sola ocasión: nunca= ninguna vez, frecuente= 1-2 veces al año y 1-4 veces al mes, y muy frecuente= 1-5 por semana, casi diario y diario. Los valores de p en rojo: datos estadísticamente significativos, y en negritas: datos indicativos.

| | | n (336) | % VHS-2 | p |
|--|----------------------------|---------|---------|--------------|
| ITS | No ITS | 102 | 2.9 | 0.249 |
| | Ulcerativas | 128 | 7.8 | |
| | Otras no ulcerativas | 106 | 4.7 | |
| SEXO OCASIONAL | Perdidos | 8 | 0 | 0.144 |
| | No | 45 | 0 | |
| | 1-18 | 91 | 9.9 | |
| | 20-100 | 106 | 4.7 | |
| | 108-5400 | 86 | 4.7 | |
| *USO DE CONDÓN (frecuencia de uso) | Perdidos | 5 | 0 | 0.628 |
| | Nunca a menos de la mitad | 66 | 3 | |
| | La mitad a más de la mitad | 230 | 5.7 | |
| | Siempre | 35 | 8.6 | |
| NÚMERO DE HOMBRES EN LOS ÚLTIMOS 6 MESES | Perdidos | 7 | 0 | 0.386 |
| | Ninguno | 55 | 3.6 | |
| | 1-10 | 211 | 4.7 | |
| | 12-450 | 63 | 9.5 | |
| DIAGNÓSTICO DE VIH (años) | Perdidos | 8 | 12.5 | 0.037 |
| | ≤ 1año | 75 | 10.7 | |
| | > 1año | 253 | 3.6 | |
| CD4 ⁺ (células/mL) | Perdidos | 13 | 15.4 | 0.153 |
| | ≤ 500 | 180 | 6.1 | |
| | > 500 | 143 | 3.5 | |
| CARGA VIRAL (VIH) | Perdidos | 13 | 15.4 | 0.189 |
| | Detectable | 211 | 5.7 | |
| | Indetectable | 112 | 3.6 | |
| TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (años) | No | 70 | 11.4 | 0.020 |
| | ≤ 1año | 77 | 5.2 | |
| | > 1año y ≤ 10años | 173 | 2.3 | |
| | > 10años | 16 | 12.5 | |

TABLA 13. VARIABLES DE COMPORTAMIENTO SEXUAL Y CLÍNICAS.

Donde VHS-2(%) se refiere al porcentaje de la variable VHS-2 anal y genital en cada categoría.*Variable uso de condón, hace referencia al uso del mismo durante el total de sus relaciones sexuales: nunca a menos de la mitad de las veces, la mitad a más de la mitad de las veces, etcétera. Los valores de p en rojo: datos estadísticamente significativos, y en negritas: datos indicativos.

De acuerdo a las tablas de frecuencias de cada variable, cerca del 60% de la población de estudio tiene entre 26 y 40 años, y el 42.3% de ellos tienen solo educación media (preparatoria y carrera técnica).

De igual manera se analizaron variables sociodemográficas relacionadas con adicciones tales como tabaquismo donde se encontró que más de la mitad de la población actualmente fuma (58.6%), en la variable alcohol donde alrededor de 70% de los participantes consume 1 a 2 veces al año y 1 a 4 veces al mes más de 5 copas de alcohol en una sola ocasión, y finalmente cerca de 2/3 de la población total reportó consumir drogas.

Con respecto del comportamiento sexual de los participantes, fueron analizadas algunas variables como el diagnóstico de ITS (distintas al VIH). En las etapas iniciales de este estudio los 338 participantes resultaron positivos a VHS-2 mediante la técnica de ELISA, sin embargo tan solo el 13.7% de la población mencionó este diagnóstico; en conjunto el 38% de la población tenía el diagnóstico de alguna infección de transmisión sexual ulcerativa, las que incluyen sífilis, chancro blando y por supuesto VHS-2. Además se cuestionó acerca del uso de condón y se encontró que más de 2/3 de la población total dijo usar condón en la mitad y más de la mitad de las veces que tienen relaciones sexuales.

Así mismo se cuestionó a los participantes acerca de el número de parejas ocasionales y el resultado mostró que la media de esta variable fue 222.41. Finalmente se reportaron datos acerca del número de hombres con los que cada participante había tenido relaciones sexuales en los 6 meses anteriores a la aplicación del cuestionario, y la media de esta variable resultó en 10.33, aunque hubo datos de hasta 450 hombres en los últimos 6 meses.

Los datos obtenidos de los expedientes clínicos de cada participante fueron clasificados en 4 variables: el tiempo de diagnóstico de VIH categorizado en años y del cual se obtuvo que la proporción mayor corresponde a la categoría más de 1

año de diagnóstico (75.3%); cuenta de células T CD4⁺ que fueron en al menos el 42.5% de los participantes mayor a 500 células/mL; la carga viral de VIH que fue indetectable en solo un tercio de la población total; y por último se calculó el tiempo que lleva cada participante con terapia antirretroviral a la fecha de aplicación del cuestionario y resultó que el dato mayor fue el de la categoría de entre 1 y 10 años (51.5%).

De acuerdo a los datos obtenidos al realizar las tablas de contingencia (prueba estadística χ^2), se encontraron 4 asociaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) dentro de las variables escolaridad, alcohol, diagnóstico de VIH y terapia antirretroviral; en los cuales el valor más alto de proporción de VHS-2 anal y genital se encontró en escolaridad básica (11%), en los que nunca tomaron alcohol (11.8%), en aquellos que tenían ≤ 1 año de diagnóstico de VIH (10.7%) y en aquellos con mayor tiempo de terapia antirretroviral (12.5%), respectivamente.

Mediante la aplicación de pruebas estadísticas χ^2 se pudieron determinar específicamente cuales categorías dentro de cada variable estadísticamente significativa eran las relacionadas con la diseminación anal y genital de VHS-2.

Como resultado de lo anterior, se obtuvo específicamente que la escolaridad básica vs la superior ($p= 0.0052$), la variable alcohol en sus categorías nunca vs frecuente ($p= 0.015$) y frecuente vs muy frecuente ($p= 0.028$), la variable diagnóstico de VIH en su categoría ≤ 1 año vs >1 año ($p= 0.0318$) y la variable tiempo de terapia antirretroviral categoría no vs >1 año - ≤ 10 años ($p= 0.006$), resultaron con una asociación estadísticamente significativa con la diseminación anal y genital de VHS-2.

Adicionalmente, hubo algunas variables cuyos valores de p (≤ 0.200) fueron considerados indicativos debido a que se observó una asociación pero los datos eran escasos para ponerla de manifiesto: tabaquismo, sexo ocasional, cuenta de células T CD4⁺ y carga viral de VIH.

Cabe destacar, que tres de las variables clínicas (diagnóstico de VIH, cuenta de células T CD4+ y carga viral de VIH), tuvieron los porcentajes mayores de VHS-2 anal y genital en la categoría “perdidos”.

Con la finalidad de establecer el tipo de asociación entre las variables clínicas cuantitativas de la población de estudio y la presencia de VHS-2 en muestras de citología anal y de hisopado genital, se realizaron pruebas estadísticas t de student para comparar medias entre grupos (los que diseminaban y los que no). De esta prueba solamente resultó estadísticamente significativa la variable carga viral de VIH ($p= 0.002$) en la cual se utilizaron los datos de logaritmo de la carga viral de VIH.

Debido a que la carga viral de VIH resultó estadísticamente significativa cuando se le realizó una prueba t de student (para comparar las medias del logaritmo de carga viral de VIH del grupo que diseminaba VHS-2 vs el grupo que no lo hacía) bajo el supuesto de que los datos cumplían con la distribución normal, se realizó una prueba más con los datos originales de carga viral de VIH (reportados en copias/mL).

La prueba realizada fue la U de Mann-Whitney, ahora bajo el supuesto de que los datos originales (reportados en el expediente clínico de cada participante) no cumplían con la distribución normal. En esta prueba, se compararon las medianas del grupo que diseminaba VHS-2 anal y genital vs el que no lo hacía. Al igual que en la prueba t de student, en la prueba U de Mann-Whitney la carga viral de VIH resulto con un valor de $p < 0.05$ ($p= 0.022$), lo que nos corrobora que si existe una asociación estadísticamente significativa entre la carga viral de VIH y la diseminación anal y genital de VHS-2.

Al transformar los datos de logaritmo de carga viral de VIH a copias/mL, basado en la prueba estadística t de student, podemos decir que la media de carga viral en aquellos sujetos con VHS-2 anal y genital fue de 4073.80 copias/mL y en

aqueellos que no se pudo detectar VHS-2 anal y genital resultó de 288.40 copias/mL. Lo anterior deja de manifiesto que hay una asociación significativa entre una carga viral de VIH alta y la presencia o diseminación de VHS-2 en tejido anal y genital sin lesiones (TABLA 14 Y FIGURA 29).

| | VHS-2 ANAL Y GENITAL | n | \bar{x} | σ^2 | IC 95% | p |
|---------------------------------|----------------------|-----|-----------|------------|-------------|-------|
| Dx VIH (años) | SI | 17 | 3.51 | 4.11 | 1.4-5.6 | 0.168 |
| | NO | 310 | 5.17 | 4.88 | 4.6-5.7 | |
| CD4+ (cel./mL) | SI | 16 | 406.69 | 235.59 | 281.1-532.2 | 0.288 |
| | NO | 307 | 472.93 | 228.22 | 447.3-498.6 | |
| *CARGA VIRAL DE VIH (copias/mL) | SI | 16 | 3.61 | 1.71 | 2.7-4.5 | 0.002 |
| | NO | 307 | 2.46 | 1.39 | 2.3-2.6 | |

TABLA 14. PRUEBA ESTADÍSTICA t DE STUDENT.

Donde n= tamaño de la muestra, \bar{x} = media, σ^2 = desviación estándar, IC 95%= intervalos de confianza de la media al 95% y el valor de p. Los valores de p en rojo: datos estadísticamente significativos. En la variable (*) la media corresponde a la media del logaritmo de carga viral de VIH.

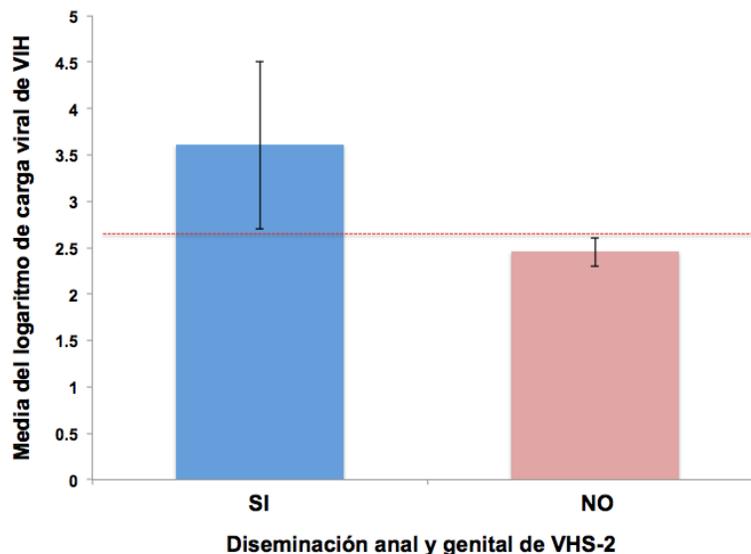


FIGURA 29. COMPARACIÓN DE MEDIAS CARGA VIRAL DE VIH ENTRE GRUPOS CON Y SIN DISEMINACIÓN ANAL Y GENITAL DE VHS-2.

La barra azul en el gráfico muestra la media del logaritmo de carga viral de VIH para el grupo que sí disemina VHS-2 (n= 16, \bar{x} = 3.61 y desviación estándar 1.71) y la barra en rosa muestra la media de carga viral de VIH para el grupo que no disemina VHS-2 (n= 307, \bar{x} = 2.46 y desviación estándar 1.39), respectivamente. Como se puede observar la dispersión de las medias de los dos grupos no se tocan, lo que manifiesta de manera gráfica que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos grupos (p= 0.002).

DISCUSIÓN

PCR TIEMPO REAL.

En el presente proyecto se han utilizado técnicas de laboratorio que cada vez van cobrando un mayor realce. En años recientes, el PCR tiempo real ha emergido como una metodología robusta y ampliamente utilizada en la investigación de carácter biológico debido a que puede detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos, los cuales son monitoreados durante su amplificación usando tecnología fluorescente. Además de esto, el PCR tiempo real es llevado a cabo como una reacción cerrada que no requiere manipulación post-PCR, por tanto minimiza la contaminación cruzada en el laboratorio (Valasek and Repa, 2005).

Para diagnóstico clínico molecular, el PCR tiempo real se ha usado para medir cargas virales o bacterianas e incluso para evaluar el estatus de un proceso canceroso. Esto se ha hecho más práctico debido a la innovación en la tecnología del PCR tiempo real, tanto que actualmente es posible detectar la presencia de virus (como el VHS-2) desde muestras menos invasivas (con respecto a las biopsias), tales como el suero, las muestras de hisopados genitales y anales, éstas dos últimas las utilizadas en el presente proyecto (Speers, 2006). Al igual que todas las técnicas de laboratorio, esta tecnología también tiene sus limitaciones y probablemente la más grande de ellas no es inherente a la tecnología en sí misma, sino que reside en el error humano; en situaciones tales como el desarrollo impropio del ensayo, el análisis incorrecto de los datos o las conclusiones infundadas (Valasek and Repa, 2005).

En el proyecto se realizó un procesamiento de las muestras por medio de PCR punto final, la cual a pesar de ser la base del PCR tiempo real tiene algunas diferencias significativas respecto al último. El PCR tiempo real detecta los productos de amplificación durante la fase exponencial, en donde la cantidad de

DNA blanco amplificado es directamente proporcional a la cantidad inicial de DNA blanco adicionado a la reacción; mientras que el PCR punto final detecta los productos de la amplificación durante la fase *plateau* y en esta fase no siempre existe una relación directa entre el DNA inicial añadido y el DNA amplificado (Pfaffl Michael W., 2004). Debido a esto, como parte final y crucial de este proyecto las muestras que resultaron positivas en PCR punto final fueron procesadas por medio de PCR tiempo real.

El procesamiento de las muestras por PCR punto final se llevó a cabo mediante *pools*, esto es realizando mezclas de 4 con las muestras a procesar. Lo anterior contribuyó a disminuir el uso de reactivos, materiales y tiempo de procesamiento; para esto se tomó como base lo ya reportado por diversos autores sobre la eficacia del procesamiento de muestras en *pools* de orina, suero, raspados e hisopados cervicales y uretrales, hisopados externos genitales y anales, estos dos últimos tal como los que se utilizaron en este proyecto (Behets et al., 1990b; Lisby et al., 1994; Kapala et al., 2000; Sánchez-Alemán et al., 2005).

Algunas investigaciones reportadas han profundizado en la búsqueda de diseminación del VHS-2, en personas sintomáticas y asintomáticas, esta última característica de nuestra población de estudio. De la misma manera que en este proyecto, la determinación del virus se ha hecho a partir de hisopados genitales los cuales son recomendados para este tipo de procesamiento. Uno de los estudios más representativos es el que fue realizado por Tronstein y colaboradores, donde se evaluaron 498 personas infectadas con VHS-2 sintomáticas y asintomáticas (215 hombres y 283 mujeres) en búsqueda del virus en sus muestras de hisopados genitales diarios (≥ 30 días). En el estudio mencionado se encontró que el 10% (519/5070) de las muestras de personas asintomáticas resultaron positivas para VHS-2, mediante el procesamiento por PCR tiempo real. Estos resultados sobrepasan los obtenidos en el presente estudio donde la prevalencia total de diseminación de VHS-2 fue de 5.32% (IC_{95%} 2.93-7.71), del cual las muestras de citología anal positivas a VHS-2 alcanzaron

un 2.07% (IC_{95%} 0.56-3.58) y las de hisopados genitales un 3.85% (IC_{95%} 1.8-5.9); sin embargo estos resultados son referentes al número de participantes y no al número de muestras, además de que en el estudio de Tronstein la población estaba mezclada entre hombres heterosexuales, HSH y mujeres. Sin embargo, tomando como dato comparativo la prevalencia de diseminación de VHS-2 encontrada en el estudio de Tronstein (10%), aunque la prevalencia total de nuestro estudio fue de 5.32%, este dato está subestimado debido a que nuestros resultados fueron obtenidos de muestras tomadas en un solo punto en el tiempo (de acuerdo con el diseño general de nuestro estudio: transversal) (Tronstein et al., 2011).

Existen también estudios donde se han analizado muestras por medio de PCR tiempo real con el uso de la tecnología *LightCycler* PCR tiempo real de ROCHE; el cual es un ensayo adaptado al sistema de PCR *Workflow MagNA Pure LC* y al instrumento *LightCycler*. Este sistema se basa en la detección de un fragmento de VHS-1 y VHS-2 con el uso de sondas de hibridización, y se distinguen cada uno mediante la generación de un pico en la curva de disociación: VHS-1 $T_m=54^\circ\text{C}$ y VHS-2 $T_m=67^\circ\text{C}$ (Koenig, Reynolds, Aldous and Hickman, 2001; Niesters, 2001). Uno de estos estudios fue el realizado por Koenig en 2001, donde se analizaron 104 muestras de hisopados genitales de una población de hombres y mujeres, con la finalidad de comparar la especificidad y sensibilidad del PCR tiempo real *LightCycler*, el inmunoensayo enzimático y el cultivo celular. Como resultado del estudio, se reportó que el *LightCycler* es tan específico como el cultivo y es más sensible que el inmunoensayo y el cultivo (Koenig et al., 2001). Sin embargo, en el presente estudio se utilizó un sistema de detección de PCR tiempo real diferente, el agente intercalante *SYBR Green*, así como un instrumento y software de PCR tiempo real más actualizado: *StepOne™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems*.

Una de las ventajas de utilizar un agente intercalante para la detección de VHS-2, es el hecho de que la detección del amplicón de interés (un solo pico en la curva de disociación) no se ve afectado por la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido incluso en aquellas secuencias con una tasa alta de mutaciones, y al ser un PCR específico para detectar VHS-2 este no se ve afectado por la competencia de reacción entre el VHS-1 y VHS-2, y así no se disminuye la sensibilidad del ensayo como se ha reportado por muchos autores (Stevenson, Hymas and Hillyard, 2005; LeBlanc et al., 2008). Además el uso de agentes intercalantes, es sencillo de establecer y tiene un bajo costo con respecto a las sondas de hidrólisis; pero, es de tomar en cuenta que una de las desventajas de estos agentes es que son susceptibles a unirse a cualquier DNA de doble cadena incluso a productos inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos. Sin embargo, esto puede evadirse mediante un correcto análisis de las curvas de disociación (Watzinger, Ebner and Lion, 2006) y con los controles de calidad necesarios.

El ciclo de PCR punto final utilizado en este proyecto corresponde al ciclo ya descrito por Corona-Oregón, para la detección de β -globina humana y VHS-2, así como los oligonucleótidos utilizados (Corona-Oregón et al., 2010). El PCR para amplificar VHS-2 es un PCR dúplex que también amplifica VHS-1, sin embargo para este proyecto el PCR punto final se modificó al omitirse el oligonucleótido específico para amplificar VHS-1.

En los primeros ensayos de PCR tiempo real que realizamos para este proyecto, tomamos como base el ciclo y los oligonucleótidos del PCR punto final, sin embargo la amplificación obtenida resultó inespecífica, además de percatarnos de la presencia de dímeros de oligonucleótidos. Al analizar las especificaciones para el PCR tiempo real, nos vimos en la necesidad de diseñar nuevos oligonucleótidos que amplificaran un fragmento más pequeño que el reportado anteriormente (tamaño de amplicón recomendado para PCR tiempo real <150pb) y que no tuvieran o tuvieran el mínimo de interacciones tanto homodiméricas como heterodiméricas. Una vez que se contó con los nuevos oligonucleótidos también

se modificó la mezcla de reacción de acuerdo con las indicaciones del fabricante del *SYBR Green* utilizado (Thermo Scientific., 2011; Life technologies, 2012, 2014; Vinueza-Burgos, 2009).

La mayoría de los ensayos diagnósticos de PCR tiempo real retoman los datos usando un enfoque cualitativo, es decir un formato “si/no o también conocido como presencia/ausencia”. El desarrollo del PCR tiempo real ha traído la oportunidad de cuantificar un DNA blanco tanto a nivel de investigación como diagnóstico. La determinación de la cantidad de templado de DNA por PCR puede ser desarrollado de dos maneras: la cuantificación absoluta y la relativa. En el presente proyecto, se optó por utilizar una cuantificación de tipo relativo, la cual describe los cambios en la cantidad de una secuencia de DNA blanco en comparación relativa a un gen endógeno. Generalmente, la cuantificación relativa provee de suficiente información y es simple de desarrollar. Si bien una comparación de curvas estándar absolutas da pie a una cuantificación absoluta del DNA amplificado, las curvas estándar relativas y los valores de C_t del ensayo producen valores finales similares. La idea general es que un control interno en combinación con al menos 3 réplicas de cada muestra son esenciales para una cuantificación fiable por PCR tiempo real. Debido a esto, nosotros desarrollamos curvas estándar relativas para nuestro gen de interés (VHS-2) y para el gen de referencia (β -globina humana), y cada ensayo que se realizó incluyó 3 réplicas de cada muestra (Mackay, Arden and Nitsche, 2002). Así mismo, la eficiencia de un ensayo de PCR tiempo real se debe establecer por medio de las curvas de calibración, debido a que estas proveen un indicador simple, rápido y reproducible de la eficiencia de la reacción, la sensibilidad analítica y la robustez del ensayo (Bustin et al., 2009).

Una característica más del PCR tiempo real es que ofrece la posibilidad de una cuantificación viral más certera debido a su enorme rango dinámico. Dependiendo del DNA templado usado para generar las curvas de calibración, el rango dinámico debe contener al menos 3 órdenes de magnitud e idealmente puede extenderse

hasta concentraciones de 5 o 6 \log_{10} , e incluso hasta 8 órdenes de magnitud. A pesar de ello, el rango dinámico y la eficiencia de la reacción se pueden ver afectadas por inhibidores del PCR o por condiciones pobres de optimización de la reacción. Los datos obtenidos en nuestras curvas estándar, reflejan un rango dinámico relativamente corto que va desde 10^{-1} hasta 10^{-6} pero cuyas eficiencias de reacción están dentro de los parámetros deseados (90-110%). Sin embargo los datos de C_t obtenidos al procesar nuestras muestras problema para amplificar β -globina humana, quedan fuera del rango dinámico de nuestra reacción. Por otro lado, la mayoría de los datos que obtuvimos al procesar las muestras para amplificar VHS-2 quedaron dentro del rango dinámico de nuestra curva estándar. Esto podría deberse a la naturaleza diferente de las muestras problema, ya que provienen de muestras de hisopados genitales y de citología anal ambas tomadas de sitios sin evidencia de lesiones herpéticas; así como del DNA templado que fue utilizado para desarrollar las curvas estándar. Este último fue obtenido en procesos independientes a nuestro proyecto, y pudo estar expuesto ante sustancias capaces de inhibir la reacción de PCR. Esto podría representar la causa de que no todas nuestras muestras problema hayan entrado en los rangos dinámicos de nuestras curvas (Bustin et al., 2009; Mackay, Arden and Nitsche, 2002).

A pesar de esto, nosotros nos hemos permitido extrapolar nuestras muestras problema a las curvas estándar; bajo la aseveración de que estas no se encuentran en el rango lineal de la reacción y por lo tanto su eficiencia de amplificación es menor a la reportada en las curvas, lo que se traduce en que estas muestras no están duplicando totalmente el DNA blanco en cada ciclo de PCR tiempo real. Cabe destacar que en la estrategia de cuantificación relativa que fue la que utilizamos, no son necesarias las curvas estándar. Sin embargo nosotros decidimos realizar las curvas para cada gen apoyando a la estandarización del ensayo de PCR tiempo real específico para VHS-2 y β -globina humana, ya que iniciamos este proceso sin una referencia base (Pfaffl Michael W., 2004).

El método de cuantificación relativa que empleamos para analizar los datos obtenidos, es un derivado del método de cuantificación normalizada mejor conocido como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Con ayuda de este método derivado ($2^{-\Delta Ct}$), se elimina de la ecuación el valor correspondiente a los genes calibradores, los cuales no fueron utilizados en nuestro proyecto. Además, una ventaja de utilizar este modelo es que obtenemos valores de presencia directamente proporcionales a la cantidad absoluta de DNA, por lo que además de comparar cuantas veces más se presenta un gen de interés respecto a su gen endógeno control, podemos conocer si un gen de interés A (VHS-2) se presenta en mayor o menor medida que un gen constitutivo B (β -globina humana) (Castanera A.R., 2011).

Los datos que obtuvimos de las veces que se presentó VHS-2 con respecto a β -globina humana en las muestras de hisopados genitales y de citología, resultaron en su mayoría con valores de VHS-2 mayores. Esto apoya lo reportado por otros autores acerca de que la diseminación de VHS-2 es posible en individuos asintomáticos (Tronstein et al., 2011). Si bien es cierto que en estudios anteriores se han tenido poblaciones de estudio femeninas y sus muestras son de mucosa cervical, perineo y zona perianal; nuestros resultados a pesar de que son solo de una población de HSH se pueden comparar ya que provienen también de piel (genitales: pene y perineo) y mucosa (canal anal). Los resultados de la cuantificación relativa muestran una tendencia hacia el incremento en la presencia de VHS-2 (lo que habla de diseminación) determinada en las muestras de citología anal provenientes de un tejido tipo mucosa, esto con respecto de la presencia de VHS-2 en muestras de hisopados genitales provenientes de piel del pene y perineo. La tendencia observada aunque está basada en una cantidad de datos limitada, es de fácil entendimiento si tomamos en cuenta que la mucosa del canal anal es de un tipo de epitelio escamoso estratificado no queratinizado muy lábil ante las prácticas sexuales de nuestra población de estudio y muy fácil de penetrar por un agente viral como el VHS-2, por ello la mayor presencia de VHS-2. Es precisamente por su diferencia con la piel que es de un tipo de epitelio queratinizado, que en los datos obtenidos de las muestras citología anal (mucosa)

la presencia de VHS-2 es más alta respecto a los de las muestras de hisopados genitales (cabe resaltar que la queratina es la que ejerce la función protectora de los epitelios) (Wald et al., 1995). Aunado a esto, obtuvimos un par de muestras coincidentes, es decir que tanto la muestra genital y la de citología anal de estos dos participantes resultaron positivas a VHS-2. Bajo la limitante del tamaño de muestra, podríamos suponer que el rol sexual de estos participantes es tanto del tipo insertivo como receptivo.

El presente trabajo se desarrolló tomando en cuenta los puntos más relevantes de la estandarización del PCR tiempo real, y los datos aquí reportados son un gran avance en la estandarización óptima de un PCR tiempo real para amplificar β -globina humana y VHS-2 usando el agente intercalante *SYBR Green*.

DISEMINACIÓN ANAL Y GENITAL DEL VHS-2.

Los resultados de este trabajo pusieron de manifiesto la existencia de diseminación de VHS-2 en individuos asintomáticos, así como la implicaciones que esta conlleva. La incertidumbre respecto al abordaje y manejo óptimo de las personas infectadas con VHS-2 asintomáticas, deriva en parte de la falta de información sobre la historia natural de esta infección en este grupo de personas. Con la finalidad de llenar ese vacío, es necesario el desarrollo de estudios de cohortes prospectivas de personas VHS-2 positivas sintomáticas y asintomáticas para determinar los patrones de diseminación viral en cada caso particular; y también para detectar aquellas características y asociaciones específicas de sintomáticos y asintomáticos que pudieran servir como base en la prevención y manejo .

De manera general, las infecciones por VHS-2 se han clasificado en sintomáticas y asintomáticas de acuerdo a su presentación clínica; sin embargo, esta dicotomía no es suficiente para el adecuado manejo y tratamiento de las personas infectadas, y más aún para la contención de la infección en sí misma. Igualmente,

el acceso a las pruebas diagnósticas para VHS-2 ha estado condicionado por la clasificación de la persona infectada como sintomático o asintomático (que puede considerarse erróneamente sano) de acuerdo al diagnóstico clínico (Wald et al., 2000; Fleming et al., 1997). Esto ha sido una de las causas de que menos del 25% de las personas infectadas con VHS-2 realmente estén consientes de su condición (Tronstein et al., 2011; Cowan et al., 1994). Sin embargo, existe evidencia de que incluso las personas asintomáticas tienen tasas y periodos considerables de diseminación viral aún sin lesiones herpéticas típicas; hecho que impacta sobre el aumento en la transmisión del VHS-2 en la población general. Sumado a lo anterior, una persona que se considera asintomática o sana, puede realmente serlo o no. Mucho depende de que un porcentaje de infecciones por VHS-2 realmente son asintomáticas (Patel et al., 2012; Van de Perre et al., 2008; Schiffer et al., 2009), y de que las mismas personas infectadas no puedan distinguir una lesión herpética debido a la ignorancia sobre el tema, por el tamaño de la misma (microlesiones) o incluso al lugar anatómico donde se presente dicha lesión. Por ejemplo, si las lesiones se encuentran en el canal anal son más difíciles de observar.

A pesar de lo ya mencionado, aún se carece de un enfoque preventivo y de diagnóstico con las personas asintomáticas determinadas por la clínica. De hecho existen trabajos reportados que debido a sus hallazgos recomiendan la realización de pruebas diagnósticas generales o de tamizaje para VHS-2 (por ejemplo ELISA) a pesar de que clínicamente la persona entre en la clasificación de asintomática, o en aquellos con factores de riesgo como los HSH, trabajadores del comercio sexual, incluso en aquellas personas infectadas con otra ITS (Álvarez-Yañez I. et al., 2011; Patel et al., 2012; Schacker et al., 1998). El siguiente paso a ello, es la implementación de pruebas más sensibles, más específicas y más certeras como el PCR tiempo real; que puede generar resultados mucho más informativos.

Considerando también que nuestra población de estudio corresponde a individuos coinfectados con VIH/VHS-2, debe tomarse en cuenta que una creciente cantidad de reportes han sugerido que las manifestaciones clínicas de VIH/VHS-2 son de naturaleza bidireccional. Existen estudios que soportan la hipótesis de que el VHS-2 incrementa la eficiencia de adquisición del VIH, así como su transmisión. De manera similar, el VIH incrementa la susceptibilidad hacia el VHS-2, a la diseminación del mismo y por supuesto el conteo bajo de CD⁴⁺ debido a que el VIH aumenta la severidad de las manifestaciones clínicas del VHS-2 .

En términos de adquisición del VIH, el VHS-2 puede causar microlesiones o úlceras mayores en lugares menos visibles y accesibles, lo que en estudios de cohorte se ha asociado de manera positiva a 7-11 veces el riesgo de adquirir VIH. Así mismo, existen datos reportados que indican que los HSH infectados con VHS-2 tienen hasta un doble de riesgo de adquirir VIH con respecto a aquellos que no están infectados con VHS-2.

Estudios realizados en poblaciones similares a nuestra población de estudio, HSH VIH positivos, han reportado que la sinergia de VHS-2 y VIH es tan notable que se ha podido detectar RNA de VIH de muestras tomadas de lesiones herpéticas y que las recurrencias clínicas del VHS-2 y la diseminación asintomática del mismo están asociadas con el incremento de la carga viral de VIH en plasma y secreciones genitales. Estos hallazgos sugieren que las reactivaciones del VHS-2 pueden incrementar la infectividad del VIH. Se ha sugerido también, que los individuos coinfectados muestran un incremento de la diseminación de VHS-2, incluso siendo asintomáticos (Schacker et al., 2002).

Es por todo esto que se sugiere que el VHS-2 se diagnostique mediante técnicas de laboratorio lo que podría incluir serología o métodos moleculares, no solamente con la presentación clínica; esto con la finalidad de impactar en el diagnóstico oportuno, la prevención, el manejo y el tratamiento de los individuos infectados sean sintomáticos o asintomáticos, ya que de ambos depende la diseminación del

VHS-2, el aumento en la prevalencia del mismo, e incluso el aumento de la prevalencia e incidencia de otras ITS tales como el VIH/Sida (Schacker et al., 1998; Nagot et al., 2008).

FACTORES ASOCIADOS A LA DISEMINACIÓN ANAL Y GENITAL DE VHS-2.

Con respecto de los resultados obtenidos en el análisis estadístico-epidemiológico, podemos decir que son muchos los factores impactan en la diseminación anal y genital de VHS-2.

En primer lugar, una de las variables sociodemográficas que resultó estadísticamente significativa fue la escolaridad ($p= 0.007$) y de manera específica se encontró estadísticamente significativa la categoría escolaridad “básica” con respecto de la escolaridad superior ($p= 0.0052$). Para dilucidar como es que la escolaridad “básica” está tan relacionada con la diseminación de VHS-2, se realizaron tablas de contingencia (tipo 2x2) donde con la aplicación de la prueba estadística χ^2 se cruzaron los datos de la escolaridad contra las otras variables utilizadas en este trabajo. Como resultado de ello, obtuvimos que el uso de condón en su categoría nunca a menos de la mitad de las veces, el tiempo de diagnóstico de VIH en su categoría ≤ 1 año y la cuenta de células T CD4⁺ categoría ≤ 500 cel./mL tuvieron una relación estadísticamente significativa con la escolaridad “básica” ($p < 0.05$).

La categoría de escolaridad “básica” tiene el porcentaje más abundante de VHS-2 en aquellas personas que nunca a menos de la mitad de las veces usan condón (43.9%) vs la categoría siempre usan condón (22.9%) con una $p= 0.047$. Esto podría deberse a la falta de información sobre prevención de ITS, métodos anticonceptivos y de medios para comprender esta información; lo que podría aumentar la vulnerabilidad de los individuos con escolaridad básica o mínima a contraer una ITS como el VHS-2 (Kalichman et al., 2013; Kalichman, Ramachandran and Catz, 1999).

Por otro lado, en la categoría ≤ 1 año de tiempo de diagnóstico de VIH, es donde se tiene el porcentaje mayor de sujetos con escolaridad “básica” (34.66%) vs aquellos individuos que tienen > 1 año de tiempo de diagnóstico (28.85%) con una $p= 0.049$. y la variable cuenta de $CD4^+$ en su categoría ≤ 500 cel./mL también concentró el mayor porcentaje de sujetos con escolaridad “básica” (34.4%) vs la categoría > 500 cel./mL (23.8%) con una $p= 0.007$. Estas variables se encuentran relacionadas entre sí porque el nivel de $CD4^+$ se ve disminuido ante una infección por VIH, se cuente o no con el diagnóstico de la infección; a su vez, un nivel bajo de escolaridad puede influir en el acceso a los sistemas de salud y por tanto en las pruebas diagnósticas para VIH y la realización de un conteo de células $CD4^+$ (Kalichman et al., 2013).

En otros estudios la variable escolaridad en sus categoría “básica o mínima” se ha encontrado con una relación estadísticamente significativa con la posibilidad de infectarse con alguna ITS. Por ejemplo uno de ellos reporta que los individuos que tienen el nivel de estudios de preparatoria o más, presentan menos posibilidades de estar infectados con VHS-2 en comparación con aquellos que tienen escolaridad menor a preparatoria (RM=0.7 IC_{95%} 0.5-1.1) (Beydoun et al., 2010). De igual manera, existen publicaciones que hacen hincapié en desarrollar e instituir intervenciones en salud pública sobre prevención de ITS que puedan impactar en aquellos individuos con un nivel de escolaridad mínimo o nulo, mediante el uso primordial de material gráfico. Dichas intervenciones tienen la finalidad de ampliar en esas personas el conocimiento sobre estilos de vida y tratamiento para personas coinfectadas con VIH y VHS-2, esto con el objetivo de disminuir la transmisión de ambos virus y mejorar su situación clínica sin importar el nivel escolar del individuo (Strick, Wald and Celum, 2006).

En cuanto a la frecuencia de consumo de alcohol, variable sociodemográfica que resultó estadísticamente significativa ($p= 0.019$) en sus categorías nunca vs frecuente ($p= 0.015$) y frecuente vs muy frecuente ($p= 0.028$), existen otros estudios como el de Beydoun y colaboradores que analizaron también la misma variable. Ellos reportan que las personas que consumen alcohol tienen 1.8 veces

más posibilidades de presentar una infección por VHS-2 con respecto a aquellas personas que no consumen alcohol (RM=1.8 IC_{95%} 1.0-3.2), sin embargo solo uno de nuestros hallazgos (“muy frecuente”) coincide con esta aseveración (Beydoun et al., 2010). Esto puede deberse a lo mencionado en la revisión sistemática publicada por Cook y colaboradores en 2005, donde se hace notar que la evidencia general de un efecto del consumo de alcohol en la adquisición de infecciones de transmisión sexual sigue siendo incierta debido a las diferencias metodológicas entre los estudios existentes (Cook and Clark, 2005).

Antes de hacer notar los hallazgos en cuanto a las variables clínicas cuantitativas, cabe mencionar que en 3 de ellas (tiempo de diagnóstico de VIH, cuenta de células CD4⁺ y carga viral de VIH), se encontró el mayor porcentaje de VHS-2 en la categoría “perdidos”. Esta categoría fue creada debido a que durante la revisión de los expedientes clínicos de los participantes no se encontraron los datos requeridos. De acuerdo a esto, podemos sugerir que la falta de datos puede deberse a un seguimiento inadecuado de los individuos, lo que podría impactar en algunas de las variables analizadas, tales como la terapia antirretroviral. De hecho, existen muchos estudios realizados con anterioridad que han resaltado la importancia en la adherencia al tratamiento antirretroviral (Wasti et al., 2012; Weiss et al., 2008; Mbopi-Kéou et al., 2000; Kalichman et al., 2013; Kalichman, Ramachandran and Catz, 1999; Corey, Wald, Celum and Quinn, 2004).

Por ejemplo Jamison y colaboradores, señalan que debido a la baja adherencia al tratamiento antirretroviral, la cuenta de células CD4⁺ se ve disminuida, y es precisamente cuando los CD4⁺ se encuentran por debajo de 500 cel./mL donde las infecciones oportunistas se manifiestan; por supuesto el herpes genital entre ellas (ANEXO 9).

Adicionalmente, el hecho de que el VIH y el VHS-2 sean virus sinérgicos aumenta la replicación de ambos y ya con el sistema inmune debilitado (CD4⁺ bajos) las manifestaciones de ambos son mayores, tanto que incluso hay reportes de que el VHS-2 facilita la replicación de VIH residual aún en sujetos que tienen terapia

antirretroviral y este fenómeno se ve aumentado si hay una baja adherencia a la terapia (Wright et al., 2003; Corey et al., 2004; Ouedraogo et al., 2006).

Nuestros hallazgos estadísticamente significativos en la variable de terapia antirretroviral, donde los porcentajes mayores de diseminación de VHS-2 se focalizaron en la categoría “no” pueden traducirse en la necesidad de tratamiento y en la categoría 10 años o más lo que podría deberse a que el esquema de terapia ya no es suficiente para normalizar su cuenta de células CD4⁺ y por tanto se presenta diseminación de VHS-2 (Corey et al., 2004; Wright et al., 2003).

Adicionalmente, algunos autores comentan que las manifestaciones del VHS-2 surgen cerca de los 10 años posteriores al diagnóstico de VIH. Sin embargo nosotros encontramos lo contrario, una asociación significativa cuando el diagnóstico de VIH es reciente; así que el hecho de que el VHS-2 se esté manifestando antes, puede deberse a que nuestra población (HSH PVV) es de alto riesgo y a la falta de seguimiento ante su condición (Jamison et al., 2006; Strick, Wald and Celum, 2006; Wasti et al., 2012).

A pesar de que la variable clínica carga viral de VIH, resultó con una $p= 0.189$ o no estadísticamente significativa, puede considerarse un dato inductivo que posiblemente se afectó por el tamaño muestral. Para corroborar este dato y debido a que se trata de una variable cuantitativa, se realizaron pruebas estadísticas t de student (con los datos transformados de cada participante: logaritmo de la carga viral de VIH), con lo que se encontró estadísticamente significativo ($p= 0.002$), al comparar las medias de carga viral entre el grupo con VHS-2 anal y genital (media mayor de copias/mL) en contraste con el grupo que no lo presenta (media menor de copias/mL). Aunado a esto, con los datos originales de carga viral (copias/mL) se realizó una prueba no paramétrica que también resultó estadísticamente significativa ($p= 0.022$) al comparar las medianas de carga viral de VIH entre los grupos VHS-2 anal y genital vs el grupo que no presenta diseminación anal y genital de VHS-2. Esto podría deberse a que la carga viral alta de VIH debilita de manera importante el sistema inmune del individuo, resultando en un decremento

de sus células T CD4⁺, lo que puede condicionar que el individuo se encuentre más susceptible a otras infecciones como el VHS-2 e incluso a la diseminación del mismo si es que ya está infectado (Wright et al., 2003; Schacker et al., 2002; Van de Perre et al., 2008).

Finalmente, los resultados del análisis estadístico-epidemiológico del presente estudio, pusieron de manifiesto que existe una correlación entre las variables con significancia estadística. El nivel de escolaridad bajo se ha relacionado estrechamente con el acceso limitado a los sistemas de salud, con el diagnóstico tardío y con la pobre adherencia al tratamiento antirretroviral; siguiendo con ello la carencia de tratamiento antirretroviral en aquellos casos donde es necesaria o aquellos esquemas de tratamiento muy antiguos que han dejado de funcionar, son circunstancias de alto impacto en la disminución de las células T CD4⁺ y en el aumento de la carga viral de VIH, lo que puede desencadenar una diseminación anal y genital de VHS-2 (Cowan et al., 2006; Wright et al., 2003; Kalichman, Ramachandran and Catz, 1999; Kalichman et al., 2013; Schacker et al., 2002; Corey et al., 2004; Tronstein et al., 2011; Wasti et al., 2012; Weiss et al., 2008).

CONCLUSIONES

Mediante el procesamiento de sólo una muestra en un momento del tiempo, se detectó VHS-2 en muestras de citología anal y de hisopados genitales por medio de PCR punto final, lo cual indica que un porcentaje de individuos asintomáticos diseminan el VHS-2 en el área anal y genital.

Se logró estandarizar la técnica de PCR tiempo real para amplificar β -globina humana y VHS-2, con lo que se constató que en la mayoría de la población analizada la presencia del VHS-2 en área anal y genital sobrepasa la presencia de un gen constitutivo de referencia (β -globina humana).

El tener una escolaridad básica o mínima, el consumo bajo de alcohol, el tiempo corto de diagnóstico de VIH, no tener terapia antirretroviral, tener <1 año o >10 con ella, pero sobretodo poseer una carga viral de VIH alta (en promedio 4073.80 copias/mL); están relacionados con la diseminación de VHS-2 en tejido anal y genital.

Es por ello que se recomienda prestar especial atención a aquellas poblaciones que coincidan con los factores clínicos (tiempo corto de diagnóstico de VIH y con la carencia, tiempo corto o muy largo de terapia antirretroviral) y sociodemográficos (escolaridad básica y bajo consumo de alcohol) que resultaron asociados con la diseminación anal y genital de VHS-2.

Finalmente, basándonos en nuestros resultados podemos decir que la diseminación anal y genital de VHS-2 en HSH PVV asintomáticos es de relevancia porque sobrepasa la presencia de un gen constitutivo (β -globina humana). Es decir, que se encontró VHS-2 en tejido anal y genital sin lesiones, esto nos habla de la gran disponibilidad de este virus en la superficie de la piel y mucosa, lo que puede originar una mayor transmisión del VHS-2.

Por todo lo mencionado anteriormente, es necesario hacer hincapié en realizar diagnósticos de laboratorio oportunos y certeros, y dar tratamiento específico para VHS-2 en individuos HSH que viven con VIH, incluso en los asintomáticos.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Al igual que otros estudios el presente también cuenta con limitaciones, las cuales se desarrollarán a continuación:

Tiempo limitado para llevar a cabo el presente trabajo. Debido a esto, el procesamiento de las muestras se realizó mediante *pools*, y ello nos permitió ahorrar material y reactivos. Sin embargo, esto retrasó un poco la obtención de resultados debido a que se tuvieron que montar múltiples experimentos para determinar la cantidad mínima de reactivos (por ejemplo, *SYBR Green*) con los cuales fuera posible realizar adecuadamente el PCR en tiempo real.

De la misma manera, si bien es cierto que el procesar *pools* es más rápido y efectivo que procesar muestras individuales, se pudo haber dado un fenómeno de inhibición entre las muestras de un mismo *pool*, y esto pudo resultar en la pérdida de muestras que realmente eran positivas.

Por último, el diseño propio de este estudio que corresponde a uno de tipo transversal y es por ello que solo se incluyó el procesamiento de las muestras de una sola toma (toma basal o tiempo 0) y aunque ello nos lleva a una subestimación de la prevalencia total de VHS-2 encontrada en este estudio, fue posible terminar en tiempo y forma el desarrollo del mismo.

PERSPECTIVAS

En un futuro, los oligonucleótidos internos para β -globina humana y VHS-2 generados en este proyecto podrían ser utilizados para llevar a cabo PCR punto final y tiempo real de muestras de naturaleza distinta, así como PCR de tipo anidado utilizando a la par los oligonucleótidos externos.

De la misma manera, la estandarización del PCR tiempo real para β -globina humana y VHS-2 obtenidas en este proyecto podrían servir de base para procesar distintas muestras (incluso la totalidad del banco de muestras utilizado en el presente proyecto) llevando a cabo una cuantificación relativa e incluso una absoluta de los resultados (al contar con un DNA base estándar de número de copias de DNA conocida), para con ello obtener un dato de prevalencia total a partir del procesamiento de las muestras individuales. Emplear las muestras de seguimiento de los VHS-2 seropositivos para determinar en distintos puntos del tiempo la presencia de diseminación, con lo que posiblemente aumentará el porcentaje total de diseminación.

Basado en los hallazgos derivados del análisis estadístico-epidemiológico, al dejar de manifiesto que entre HSH PVV la diseminación de VHS-2 es tan importante en individuos sintomáticos como en asintomáticos; podría diseñarse alguna estrategia experimental que evalúe el efecto de fármacos antiherpéticos como el aciclovir y sus derivados en la disminución de la diseminación del VHS-2, en el contexto de las PVV en México.

Así mismo, la evidencia (ya existente y comprobada en el presente estudio) de que los factores sociodemográficos como la escolaridad y clínicos como la terapia antirretroviral y la adherencia a esta resultan significativos en la diseminación del VHS-2, podría servir como base en estudios epidemiológicos sobre intervenciones de salud pública que impactaran de manera positiva en los factores antes mencionados.

Por mencionar alguna, este trabajo podría cimentar las bases para decidir si en aquellas PVV coinfectadas VIH/VHS-2 que ya cuentan con terapia antirretroviral se debe realizar una determinación de carga viral de VIH y con ello establecer un punto de corte para establecer un tratamiento antiherpético con la finalidad de disminuir la diseminación del VHS-2.

ANEXO 1.

Extracción de DNA por cromatografía de intercambio iónico, estuche comercial AmpliLute Liquid Media Extraction Kit de Roche.

- Ajustar la temperatura de un baño María a 56°C y otro a 70°C.
- Preparar los tubos necesarios de acuerdo al número de muestras.
- Disolver los posibles precipitados del buffer ATL, en baño María a 70°C con agitación.
- Adicionar 80µL de ATL a cada tubo vacío para preparar la extracción.
- Añadir 250µL de la muestra (genital o de cultivo) y llevar al vórtex por 10 segundos.
- Adicionar 20uL de Proteinasa K y nuevamente mantener 10 segundos en el vórtex.
- Incubar los tubos a 56°C durante 30 minutos.
- Colocar los aditamentos a la bomba de vacío.
- Reconstituir el carrier RNA adicionando 310uL de buffer de elución AVE y llevar al vórtex 10 segundos.
- Agregar 30mL de etanol absoluto al buffer AW2.
- Preparar el buffer de trabajo AL. (Ejemplo: para 24 muestras mezclar 7mL de buffer AL y 70µL de RNA carrier).
- Una vez terminado el periodo de incubación, adicionar 250µL de buffer de trabajo AL y mantener 10 segundos en el vórtex.
- Incubar a 70°C durante 15 minutos.
- Pipetear 300µL de etanol absoluto y llevar al vórtex durante 15 segundos.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Dar un spin a máxima RCF.
- Transferir lisado a la columna (que forma parte de los aditamentos de la bomba de vacío) y dejar incubar 1 minuto.
- Aplicar vacío hasta haber aspirado todo el líquido en las columnas.
- Agregar 750µL de buffer AW2 a cada columna e incubar 1 minuto para después aplicar vacío.
- Agregar 750µL de etanol absoluto a cada columna, incubar un minuto y aspirar el líquido por vacío.
- Retirar la extensión de la columna, cerrar las tapas y descartar los tubos.
- Transferir columnas a los tubos de colección de volumen 2mL.
- Centrifugar a 13000g por 3 minutos.
- Rotular los tubos de elución final de volumen 1.5mL.
- Descartar los tubos de desecho y colocar la columna en los tubos de elución final.
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos (con la tapa abierta).
- Adicionar 120µL de buffer AVE a la columna y cerrar las tapas.
- Incubar las columnas a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Centrifugar a 13000g por un minuto. Retirar las columnas y desechar.
- Almacenar los tubos de elución final ya con DNA.

ANEXO 2.

PCR punto final para la amplificación de un fragmento de 391pb del VHS-2.

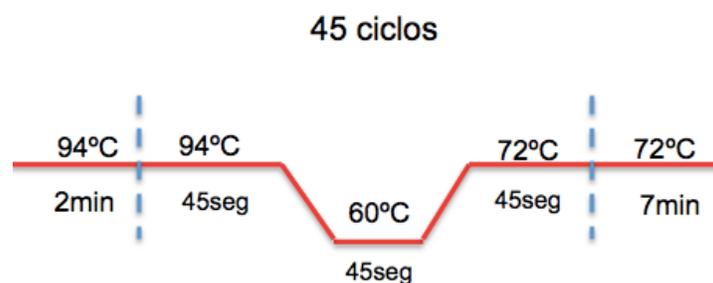
- Asegurar la limpieza del material que se va a utilizar, usar puntas estériles.
- Tener calculadas las concentraciones y los volúmenes que serán utilizados.
- Atemperar las muestras y reactivos.
- Realizar la mezcla de reacción como se muestra en la tabla (ejemplo de volumen de reacción = 25 μ L).

| Reactivo | Concentración final | Volumen final (μ L) |
|----------------------|---------------------|--------------------------|
| Buffer 10X KCl | 1x | 2.5 |
| MgCl ₂ | 1.5mM | 1.5 |
| dNTP's | 0.32mM | 0.8 |
| Taq.Pol. 1U/ μ L | 1U | 1 |
| Iniciador HSV | 0.07pmol/ μ L | 2 |
| Iniciador HSV-2 | 0.08pmol/ μ L | 2 |
| H ₂ O | --- | 8.2 |
| DNA molde | --- | 5 |

Mezcla de reacción: PCR punto final para VHS-2

- Utilizar un control positivo y uno negativo para cada corrida.

Programa de PCR



ANEXO 3.

Electroforesis en gel de agarosa (porcentaje variable).

- La concentración de agarosa en el gel es de acuerdo al tamaño del poro deseado y por lo tanto del fragmento esperado.
- Pesar la agarosa y medir 30mL de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x.
- Mezclar ambos en un matraz Erlenmeyer y llevar al fuego hasta que la solución sea totalmente líquida y transparente.
- Dejar atemperar, agregar un volumen de Bromuro de Etidio (la solución debe quedar a una concentración final de 0.5µg/mL) y mezclar.
- Armar la cámara de electroforesis y verter la solución de agarosa.
- Colocar uno o dos peines de acuerdo al número de pocillos requeridos.
- Dejar polimerizar, aproximadamente 10 minutos.
- Una vez polimerizado, retirar los peines y las placas laterales.
- Llenar la cámara con buffer TAE 1x hasta cubrir el gel.
- Por otro lado, preparar sobre una superficie lisa 1µL de buffer de carga (compuesto de azul de bromofenol y glicerina) por cada muestra.
- Tomar 5µL de la muestra y mezclar con el buffer de carga resuspendiendo.
- Colocar la muestra con el buffer de carga una por pocillo, siendo el primero el elegido para el marcador de peso molecular.
- Después de colocar todas las muestras, cerrar la cámara y colocar los cables positivo y negativo, respectivamente.
- Encender la fuente de poder y correr el gel a 75mV por 30 minutos.
- Pasado este tiempo, apagar la fuente de poder retirar los cables y la tapa para sacar el gel.
- Una vez fuera, observar el gel con ayuda de un transiluminador o un fotodocumentador.
- Para generar evidencias del gel, se pueden tomar fotografías del mismo.

ANEXO 4. PCR tiempo real para la amplificación y cuantificación de β -globina humana y VHS-2.

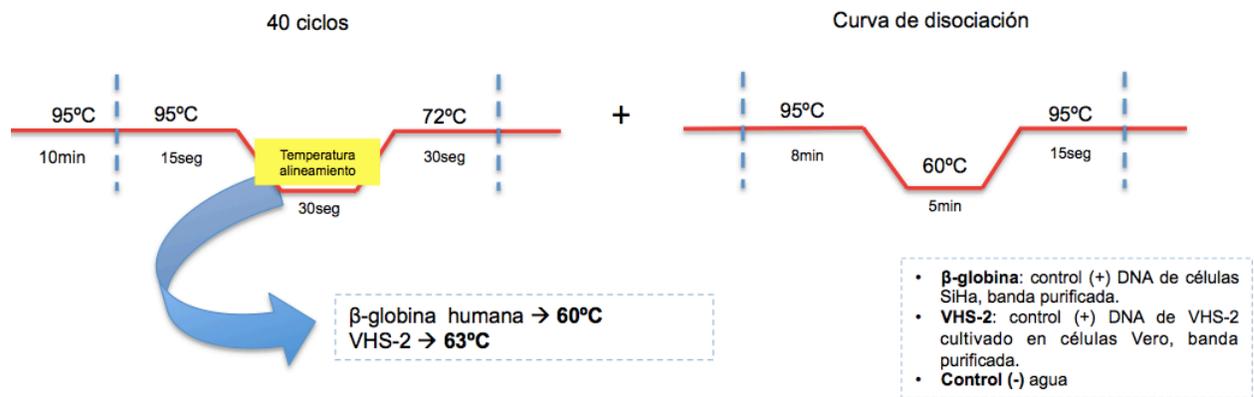
- Asegurar la limpieza del material y el espacio que se va a utilizar, así como usar puntas estériles.
- Tener calculadas con anticipación las concentraciones y los volúmenes que serán utilizados.
- Atemperar las muestras y reactivos. Después de atemperadas, llevar al vórtex las muestras y reactivos, y centrifugar brevemente.
- Programar la corrida en el equipo de acuerdo a la ubicación de cada muestra en la placa y a los oligonucleótidos utilizados.
- Realizar la mezcla de reacción como se muestra en la tabla (volumen de reacción = 25 μ L).

*Cuidado especial: no exponer por mucho tiempo el *SYBR Green* a la luz.

Mezcla de reacción: PCR tiempo real para β -globina humana y VHS-2 (con sus oligonucleótidos correspondientes).

| Reactivo | Concentración final | Volumen final (25 μ L) | Volumen final (12 μ L) |
|---|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)</i> | - | 12.5 | 6 |
| Oligonucleótido <i>Forward</i> | 0.3 μ M | 0.75 | 0.36 |
| Oligonucleótido <i>Reverse</i> | 0.3 μ M | 0.75 | 0.36 |
| Agua libre de nucleasas (estéril) | - | 10 | 4.28 |
| DNA molde | \leq 500ng | 1 | 1 |

Programa de PCR tiempo real



ANEXO 5. Aprobación de ética del estudio madre.


INSTITUTO NACIONAL DE
SALUD PÚBLICA
Avenida Universidad 655,
Colonia Santa María Ahuacatlilán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
Teléfono: +52 (777) 329 30 00 Ext.2465
Email: jcastro@insp.mx
web: www.insp.mx

COMISIÓN DE ÉTICA
Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Presidenta

Cuernavaca, Mor., 21 de abril, 2009.
Cf: 782, No. 691

Eduardo Cesar Lazcano Ponce
Investigador Responsable
Presente

En relación a su proyecto titulado "**Prevalencia, incidencia y persistencia de VPH en hombres que tienen sexo con hombres: un elevado riesgo de neoplasia intraepitelial anal.**" me permito informarle que los miembros de la Comisión de ética revisaron las correcciones incorporadas adecuadamente por Usted y dado que responden a los requisitos solicitados, le han otorgado el dictamen de:

Aprobado

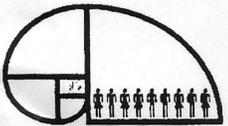
Le informamos que esta aprobación tiene vigencia **hasta el 20 de abril del 2010**. Si su estudio se extiende por un periodo mayor, le pedimos solicitar la *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento, presentando el formato correspondiente.

Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión previo a su implementación, utilizando el sistema de *Modificaciones a Proyectos en Desarrollo* que se encuentra dentro del sistema SIID. Si usted tiene dudas sobre el registro de modificaciones menores, favor de comunicarse con esta Comisión para su consideración.

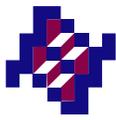
Atentamente




C.c.p. Dr. Eduardo Lazcano Ponce.- Presidente de la Comisión de Investigación.
Dr. Salvador Villalpando.- Presidente de la Comisión de Bioseguridad



ANEXO 6. Consentimiento informado del estudio madre.



FORMATO DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO PARA CARACTERIZAR LA HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN GENITALES MASCULINOS.

Titulo del estudio:

Prevalencia, incidencia y persistencia de VPH en hombres que tienen sexo con hombres: un elevado riesgo de neoplasia intraepitelial anal.

Este estudio se realiza en colaboración entre el Instituto Nacional de Salud Pública, CONASIDA, Servicios de Salud del Distrito Federal (Clínica Condesa) y los Servicios de Salud del Estado de Morelos (Capasits-Cuernavaca).

Objetivo General:

El objetivo del estudio es determinar los factores asociados a la presencia, adquisición, persistencia, eliminación y re-infección por VPH en una cohorte de Hombres en las ciudades de México, D.F. y Cuernavaca, Mor.

A usted se le ha invitado a participar voluntariamente en un estudio para la realización semestral por un periodo de 2 años de aplicación de una encuesta, así como la obtención de una citología anal, de células de su región anogenital, una muestra de orina y una muestra de sangre.

A continuación le brindaremos información específica acerca del procedimiento, los beneficios y riesgos potenciales involucrados en su participación, de tal manera que pueda proporcionar un consentimiento informado para participar.

Por favor, tome el tiempo necesario para decidirse y haga al médico o personal del estudio cualquier pregunta que pudiera tener.

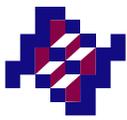
Procedimientos:

1. Número de visitas, duración del estudio.

Este estudio tendrá una duración de 2 años a partir de la primera entrevista y obtención de muestras biológicas. Posteriormente, se le solicitará nuevamente su participación, con los mismos procedimientos, cada 6 meses durante cuatro ocasiones adicionales.

2. Se aplicará un cuestionario cada 6 meses, donde usted nos brindará información acerca de su historia de vida sexual, así como hábitos de estilo de vida. Esto llevará aproximadamente 30 minutos y lo contestará en privado al médico que le atiende. Su nombre no aparecerá en el cuestionario ya que se le identificará por una clave y también podrá dejar de contestar preguntas que así desee.
3. El cuestionario y obtención de muestras biológicas se realizará en el sitio donde usted recibe atención regularmente.
4. Los procedimientos que se realizarán en el estudio son los siguientes:

En cada visita se aplicará un cuestionario donde se le preguntará algunas características sociodemográficas; historia sexual, y uso de métodos de prevención de Infecciones de Transmisión Sexual; antecedentes de infecciones de transmisión sexual; hábitos de consumo de alcohol, tabaco y drogas ilegales, el que se garantiza que será estrictamente confidencial. En cada visita se obtendrá una muestra de células del canal anal. Para ello se insertará un hisopo (pequeño algodón en la punta de un palillo de madera o plástico como el usado para limpieza de los oídos) en su ano a aproximadamente 3 cm de profundidad. Esto no causa dolor, ni hay riesgo de sangrado, ni causa herida. Asimismo, se



recolectarán con ayuda de hisopos muestras de las siguientes regiones: pene, escroto, y la región perineal, perianal e intraanal para realización de la prueba de detección del virus de papiloma humano. Usted sólo recibirá los resultados de la prueba de células del canal anal cuando ésta tenga evidencia de anomalías y en caso de que tenga un resultado positivo usted será referido, de manera independiente a este estudio, a un servicio de anoscopia de alta resolución para complementación diagnóstica y orientación que le brindará el médico especialista para el manejo y vigilancia de un eventual problema de salud.

Si usted tiene un resultado de la presencia de infección de transmisión sexual a partir de las muestras de sangre y/u orina, será remitido a su clínica de adscripción para recibir tratamiento contra sífilis, clamidia y/o gonorrea.

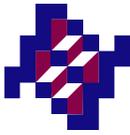
5. Los riesgos a los que usted se expone por proporcionarnos muestras biológicas son mínimos. En el caso de las muestras para obtención de citología del canal anal y de células exfoliadas de genitales, experimentará una sensación de frotamiento por el contacto con el hisopo. Para la obtención de muestra sanguínea, sentirá un pequeño dolor, como sensación de pellizco, en el sitio de punción. En total obtendremos dos tubitos de su sangre, equivalentes a 14 mililitros (dos cucharadas soperas). Con la muestra de orina usted dispondrá de privacidad para depositarla en un frasco que se le proporcionará.
6. Todos los gastos originados por los procedimientos que le han sido descritos y el costo de tratamientos contra infecciones de transmisión sexual serán cubiertos por el investigador responsable del proyecto o por la institución en la cual usted está siendo reclutado.
7. Los beneficios que usted tendrá están relacionados con la vigilancia periódica del estado de salud de su región anogenital y la posibilidad de recibir tratamiento en caso de presencia de una infección de transmisión sexual.
8. Toda la información que usted nos proporcione, así como el resultado de las pruebas que se realicen, será utilizada con fines exclusivos de investigación y se mantendrá en forma estrictamente confidencial. Su nombre no será identificado en forma alguna porque emplearemos códigos de números para rotular cuestionarios y muestras biológicas.
9. Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera los servicios y la atención que recibe en los servicios de salud.
10. Si tiene alguna duda durante el transcurso del estudio, usted podrá dirigirse telefónicamente al Dr. Carlos Jesus Conde-González, al teléfono 01 7777 1 01 29 04, y/o al correo electrónico cjconde@insp.mx
11. Adicionalmente si lo requiere, también puede telefonar a la Dra. Andrea González de la Clínica Condesa en el D.F. (tel: 52716439).

Si tiene usted preguntas generales acerca de sus derechos como participante en un estudio de investigación, puede comunicarse con la Presidente de la Comisión de Ética, Dra. Ivone Castro Romero, al teléfono (777) 329-3000, extensión 7424, de lunes a viernes de 9.00 a 17.00 hrs. O si lo prefiere puede usted escribirle a la siguiente dirección de correo electrónico:

etica@correo.insp.mx

Al firmar abajo, yo acepto que:

“Entiendo que mi participación en este estudio es voluntaria y que puedo retirarme en cualquier momento si así lo decido, sin que ello afecte mi atención posterior en la unidad de atención donde fui



contactado y/o a la que fui referido. Estoy enterado que una copia de esta carta de consentimiento informado me será entregada a la firma de la misma”.

He tenido la oportunidad de hacer preguntas y me las han respondido.

Nombre y Firma del participante

Fecha

Nombre y Firma del testigo 1

Fecha

DOMICILIO:

PARENTESCO:

Nombre y Firma del testigo 2

Fecha

DOMICILIO:

PARENTESCO:

ANEXO 7. Carta de autorización para el uso de muestras biológicas y base de datos del estudio madre.



*Generación de conocimiento
para el desarrollo de políticas de salud*

Centro del Centro de Investigación en Salud Poblacional

Cuernavaca, Mor., a 28 de febrero del 2014

Dr. Carlos Conde González
Secretario Técnico de la
Comisión de Investigación
Presente

Por este medio, autorizo a la alumna Dayana Nicté Vergara Ortega, de la Maestría en Ciencias-Enfermedades Infecciosas generación 2012-2014, el empleo de las muestras biológicas y la base de datos que se han generado del proyecto "Prevalencia, incidencia y persistencia de VPH en hombres que tienen sexo con hombres: un elevado riesgo de neoplasia intraepitelial anal (VPH en PVV)", del que soy investigador responsable. Las muestras y la información se utilizarán en la tesis de maestría "Determinación de los factores clínicos y sociodemográficos asociados a la diseminación anal y genital del virus del herpes simple tipo 2 en hombres que tienen sexo con hombres, y que viven con VIH".

Sin otro particular por el momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce
Responsable del Proyecto

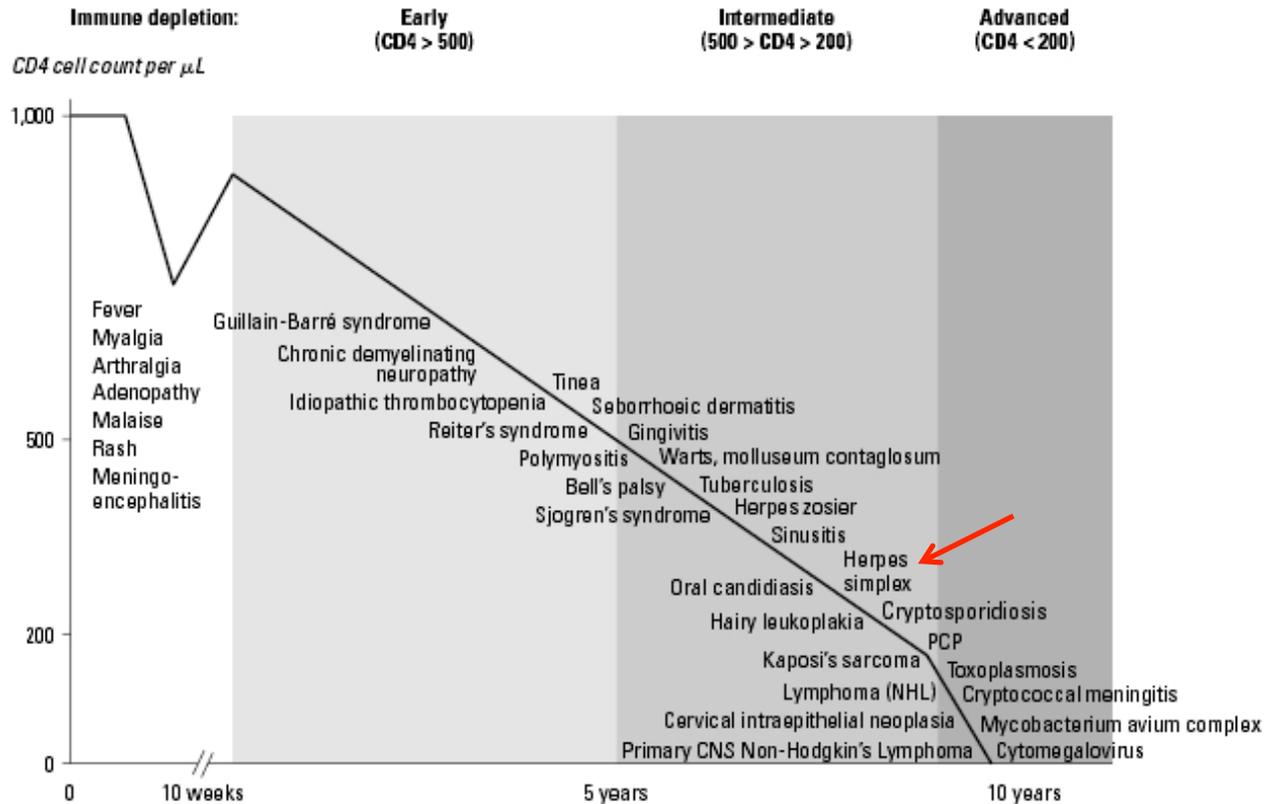
Avenida Universidad 655
Cerrada Los Pinos y Caminera
Colonia Santa María Ahuacatlilán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conm.: (777) 329 3000

www.insp.mx

ANEXO 8. Recodificación de variables para el análisis estadístico-epidemiológico.

| NOMBRE DE LA VARIABLE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERACIONAL |
|--|---|---|
| 1.- EDAD (años) | Años cumplidos del participante. | 1: 18-25 2: 26-40 3: ≥ 41 |
| 2.- ESCOLARIDAD | Nivel máximo de estudios. | 1: básico (ninguno, primaria y secundaria) 2: media (preparatoria y carrera técnica) 3: superior (licenciatura y posgrado) |
| 3.- TABAQUISMO | Si ha fumado >100 cigarrillos de tabaco durante los últimos seis meses. | 0: datos perdidos 1: actualmente fuma (si) 2: actualmente no fuma (no) 3: nunca ha fumado (nunca) |
| 4.- ALCOHOL | Frecuencia con la que han tomado 5 copas o más en una ocasión. | 0: datos perdidos 1: nunca (no) 2: frecuente (1-2 veces al año y 1-4 veces al mes) 3: muy frecuente (casi diario/diario) |
| 5.- USO DE DROGAS | Si ha usado drogas durante los últimos 6 meses. | 1: si 2: no |
| 6.- ITS | Si al participante le han diagnosticado alguna ITS que no sea el VIH. | 1: No ITS 2: positivo a cualquier ulcerativa (VHS-2, sífilis y chancro) 3: positivo a otra ITS no ulcerativa |
| 7.- SEXO OCASIONAL | Si ha tenido relaciones sexuales ocasionales con hombres y cuantos. *Relación ocasional: aquella que es la primera vez que conoce al hombre. | 0: datos perdidos 1: no ha tenido sexo ocasional 2: 1 a 18 hombres 3: 20 a 100 hombres 4: 108 a 5400 hombres |
| 8.- USO DE CONDÓN | Frecuencia de uso de condón en sus relaciones sexuales con hombres. | 0: perdidos 1: nunca a menos de la mitad de las veces 2: mitad a más de la mitad de las veces 3: siempre |
| 9.- NÚMERO DE HOMBRES EN LOS ÚLTIMOS 6 MESES | Número de hombres con los que el participante ha tenido relaciones sexuales en los últimos 6 meses. | 0: datos perdidos 1: con ninguno 2: 1 a 10 hombres 3: 12 a 450 hombres |
| 10.- DIAGNÓSTICO DE VIH | Tiempo desde el diagnóstico de VIH. | 0: datos perdidos 1: ≤1 año 2: >1 año |
| 11.- CD4 ⁺ (células/mL) | Número de células T CD4 ⁺ . | 0: datos perdidos 1: ≤500 2: >500 |
| 12.- CARGA VIRAL | Carga viral de VIH. | 0: datos perdidos 1: detectable 2: indetectable |
| 13.- TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV) | Tiempo desde el inicio de la terapia antirretroviral. | 1: no han iniciado TARV 2: ≤1 año 3: >1 y ≤10 años 4: >10 años |

ANEXO 9. Cascada de infecciones y procesos cancerosos que se desarrollan ante una depresión del Sistema Inmune.



Source: Authors.

Tomado de *Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition. Capítulo 18, HIV/AIDS Prevention and Treatment*. Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al., editores. Washington (DC): World Bank; 2006 (Jamison et al., 2006).

REFERENCIAS

Álvarez-Yañez I., Martínez-Salazar M. Fernanda, Conde-Gonzalez, García-Serrato Adriana and Sánchez-Alemán, 2011. Seroprevalencia y seroincidencia del Virus del Herpes Simplex tipo 2 en personas que viven con VIH. *Enf. Inf. Microbiol.*, 31(3), pp.93–97.

Applied Biosystems, 2010. *Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus (TM). Real-Time PCR Systems. Getting Started Guide*. Part Number 4376786 Rev. F. Applied Biosystems.

Behets, F., Bertozzi, S., Kasali, M., Kashamuka, M., Atikala, L., Brown, C., Ryder, R.W. and Quinn, T.C., 1990a. Successful use of pooled sera to determine HIV-1 seroprevalence in Zaire with development of cost-efficiency models. *AIDS (London, England)*, 4(8), pp.737–741.

Behets, F., Bertozzi, S., Kasali, M., Kashamuka, M., Atikala, L., Brown, C., Ryder, R.W. and Quinn, T.C., 1990b. Successful use of pooled sera to determine HIV-1 seroprevalence in Zaire with development of cost-efficiency models. *AIDS (London, England)*, 4(8), pp.737–741.

Beydoun, H.A., Dail, J., Ugwu, B., Boueiz, A. and Beydoun, M.A., 2010. Socio-demographic and behavioral correlates of herpes simplex virus type 1 and 2 infections and co-infections among adults in the USA. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14 Suppl 3, pp.e154–160.

Brown, Z.A., Benedetti, J.K., Watts, D.H., Selke, S., Berry, S., Ashley, R.L. and Corey, L., 1995. A comparison between detailed and simple histories in the diagnosis of genital herpes complicating pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 172(4 Pt 1), pp.1299–1303.

Brugha, R., Keersmaekers, K., Renton, A. and Meheus, A., 1997. Genital herpes infection: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26(4), pp.698–709.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), pp.611–622.

Castanera A.R., 2011. *Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de Pleurotus ostreatus*. [Trabajo Fin de Máster/Master Amaierako Lana] Available at: <<http://academica-e.unavarra.es/handle/2454/5004>> [Accessed 10 Aug. 2014].

Celum, C., Wald, A., Lingappa, J.R., Magaret, A.S., Wang, R.S., Mugo, N., Mujugira, A., Baeten, J.M., Mullins, J.I., Hughes, J.P., Bukusi, E.A., Cohen, C.R., Katabira, E., Ronald, A., Kiarie, J., Farquhar, C., Stewart, G.J., Makhema, J., Essex, M., Were, E., Fife, K.H., de Bruyn, G., Gray, G.E., McIntyre, J.A., Manongi, R., Kapiga, S., Coetzee, D., Allen, S., Inambao, M., Kayitenkore, K., Karita, E., Kanweka, W., Delany, S., Rees, H., Vwalika, B., Stevens, W., Campbell, M.S., Thomas, K.K., Coombs, R.W., Morrow, R., Whittington, W.L.H., McElrath, M.J., Barnes, L., Ridzon, R., Corey, L. and Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team, 2010. Acyclovir and transmission of HIV-1 from persons infected with HIV-1 and HSV-2. *The New England Journal of Medicine*, 362(5), pp.427–439.

Conde-Glez, C.J., Juárez-Figueroa, L., Uribe-Salas, F., Hernández-Nevárez, P., Schmid, D.S., Calderón, E. and Hernández-Avila, M., 1999. Analysis of herpes simplex virus 1 and 2 infection in women with high risk sexual behaviour in Mexico. *International Journal of Epidemiology*, 28(3), pp.571–576.

Cook, R.L. and Clark, D.B., 2005. Is there an association between alcohol consumption and sexually transmitted diseases? A systematic review. *Sexually Transmitted Diseases*, 32(3), pp.156–164.

Corey, L., 1982. The diagnosis and treatment of genital herpes. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 248(9), pp.1041–1049.

Corey, L., Adams, H.G., Brown, Z.A. and Holmes, K.K., 1983. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. *Annals of Internal Medicine*, 98(6), pp.958–972.

Corey, L., Wald, A., Celum, C.L. and Quinn, T.C., 2004. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 35(5), pp.435–445.

Corona-Oregón, E., Conde-González, C.J., Barrón, B.L. and Sánchez-Alemán, M.A., 2010. [Herpes simplex virus type 1: a possible sexually transmitted agent among college students]. *Gaceta Médica De México*, 146(2), pp.98–102.

Cowan, F.F., Pascoe, S.J.S., Barlow, K.L., Langhaug, L.F., Jaffar, S., Hargrove, J.W., Robinson, N.J., Latif, A.S., Bassett, M.T., Wilson, D., Brown, D.W.G. and Hayes, R.J., 2006. Association of genital shedding of herpes simplex virus type 2 and HIV-1 among sex workers in rural Zimbabwe. *AIDS (London, England)*, 20(2), pp.261–267.

Cowan, F.M., Johnson, A.M., Ashley, R., Corey, L. and Mindel, A., 1994. Antibody to herpes simplex virus type 2 as serological marker of sexual lifestyle in populations. *BMJ (Clinical research ed.)*, 309(6965), pp.1325–1329.

Dockrell, D.H., 2003. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *Journal of Medical Microbiology*, 52(Pt 1), pp.5–18.

Dolan, A., Jamieson, F.E., Cunningham, C., Barnett, B.C. and McGeoch, D.J., 1998. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *Journal of Virology*, 72(3), pp.2010–2021.

Fleming, D.T., McQuillan, G.M., Johnson, R.E., Nahmias, A.J., Aral, S.O., Lee, F.K. and St Louis, M.E., 1997. Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *The New England Journal of Medicine*, 337(16), pp.1105–1111.

Herrera-Martínez, E., Ondarza-Aguilera, R., Estrada-Parra, S., Pérez, G. and Barrón, B.L., 2005. Comparison of two methods of PCR followed by enzymatic restriction digestion for detection and typing of herpes simplex viruses isolated from patients with mucocutaneous or cutaneous lesions. *Revista Latinoamericana De Microbiología*, 47(3-4), pp.76–81.

Jamison, D.T., Breman, J.G., Measham, A.R., Alleyne, G., Claeson, M., Evans, D.B., Jha, P., Mills, A. and Musgrove, P. eds., 2006. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd ed. [online] Washington (DC): World Bank. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11728/>> [Accessed 31 Jul. 2014].

Kalichman, S.C., Cherry, C., Kalichman, M.O., Amaral, C., White, D., Grebler, T., Eaton, L.A., Cruess, D., Detorio, M.A., Caliendo, A.M. and Schinazi, R.F., 2013. Randomized clinical trial of HIV treatment adherence counseling interventions for people living with HIV and limited health literacy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 63(1), pp.42–50.

Kalichman, S.C., Ramachandran, B. and Catz, S., 1999. Adherence to combination antiretroviral therapies in HIV patients of low health literacy. *Journal of General Internal Medicine*, 14(5), pp.267–273.

Kapala, J., Copes, D., Sproston, A., Patel, J., Jang, D., Petrich, A., Mahony, J., Biers, K. and Chernesky, M., 2000. Pooling cervical swabs and testing by ligase chain reaction are accurate and cost-saving strategies for diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), pp.2480–2483.

Katzung Bertram G. and Masters Susan B., 2010. *Farmacología básica y clínica*. 11^a. ed. McGraw-Hill Medical.

Koenig, M., Reynolds, K.S., Aldous, W. and Hickman, M., 2001. Comparison of Light-Cycler PCR, enzyme immunoassay, and tissue culture for detection of herpes simplex virus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 40(3), pp.107–110.

Lakeman, F.D. and Whitley, R.J., 1995. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *The Journal of Infectious Diseases*, 171(4), pp.857–863.

LeBlanc, J.J., Campbell, S., Pettipas, J., Hatchette, T.F. and Davidson, R.J., 2008. Herpes simplex virus type 2 displays atypical melting-temperature profiles at low viral titers. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), pp.2786–2789.

Legoff, J., Bouhlal, H., Grésenguet, G., Weiss, H., Khonde, N., Hocini, H., Désiré, N., Si-Mohamed, A., de Dieu Longo, J., Chemin, C., Frost, E., Pépin, J., Malkin, J.-E., Mayaud, P. and Bélec, L., 2006. Real-time PCR quantification of genital shedding of herpes simplex virus (HSV) and human immunodeficiency virus (HIV) in women coinfecting with HSV and HIV. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), pp.423–432.

Life technologies, 2012. *Real-Time PCR Handbook*. 2^a ed. CO320850812. Life technologies.

Life technologies, 2014. *Introducción a PCR en Tiempo Real. ViiA 7(TM) Real-Time PCR System. Technical Note*. v.1.2014. Life technologies.

Lisby, G., Scheibel, J., Abrahamsson, L.O., Christensen, E.S. and Paloheimo, S., 1994. Detection of Chlamydia trachomatis in individual and pooled endocervical and urethral scrapes by a commercially available polymerase chain reaction. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 102(10), pp.797–800.

Mackay, I.M., Arden, K.E. and Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), pp.1292–1305.

Madhavan, H.N., Priya, K. and Bagyalakshmi, R., 2003. Phenotypic and genotypic methods for the detection of herpes simplex virus serotypes. *Journal of Virological Methods*, 108(1), pp.97–102.

Mandell, G.L., 2009. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: Expert Consult Premium Edition - Enhanced Online Features and Print*. 7 edition ed. Volumen 2. Part 3. Section A. Cap. 136. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone.

Martín, J.M., Villalón, G. and Jordá, E., 2009. Update on the treatment of genital herpes. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 100(1), pp.22–32.

Mbopi-Kéou, F.X., Grésenguet, G., Mayaud, P., Weiss, H.A., Gopal, R., Matta, M., Paul, J.L., Brown, D.W., Hayes, R.J., Mabey, D.C. and Bélec, L., 2000. Interactions between herpes simplex virus type 2 and human immunodeficiency virus type 1 infection in African women: opportunities for intervention. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(4), pp.1090–1096.

McClelland, R.S., Wang, C.C., Overbaugh, J., Richardson, B.A., Corey, L., Ashley, R.L., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J.J. and Kreiss, J.K., 2002. Association between cervical shedding of herpes simplex virus and HIV-1. *AIDS (London, England)*, 16(18), pp.2425–2430.

Mertz, G.J., Benedetti, J., Ashley, R., Selke, S.A. and Corey, L., 1992. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Annals of Internal Medicine*, 116(3), pp.197–202.

Nagot, N., Ouedraogo, A., Konate, I., Weiss, H.A., Foulongne, V., Defer, M.C., Sanon, A., Becquart, P., Segondy, M., Sawadogo, A., Van de Perre, P., Mayaud, P. and ANRS 1285 Study Group, 2008. Roles of clinical and subclinical reactivated herpes simplex virus type 2 infection and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced immunosuppression on genital and plasma HIV-1 levels. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(2), pp.241–249.

Nahmias, A.J., Lee, F.K. and Beckman-Nahmias, S., 1990. Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum*, 69, pp.19–36.

Niesters, H.G., 2001. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.419–429.

Ouedraogo, A., Nagot, N., Vergne, L., Konate, I., Weiss, H.A., Defer, M.-C., Foulongne, V., Sanon, A., Andonaba, J.-B., Segondy, M., Mayaud, P. and Van de Perre, P., 2006. Impact of suppressive herpes therapy on genital HIV-1 RNA among women taking antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *AIDS (London, England)*, 20(18), pp.2305–2313.

Patel, P., Bush, T., Mayer, K.H., Desai, S., Henry, K., Overton, E.T., Conley, L., Hammer, J., Brooks, J.T. and SUN Study Investigators, 2012. Prevalence and risk factors associated with herpes simplex virus-2 infection in a contemporary cohort of HIV-infected persons in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, 39(2), pp.154–160.

Van de Perre, P., Segondy, M., Foulongne, V., Ouedraogo, A., Konate, I., Huraux, J.-M., Mayaud, P. and Nagot, N., 2008. Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(8), pp.490–497.

Pfaffl Michael W., M.W., 2004. *Gene quantification: A-Z of quantitative PCR*. S.A. Bustin ed. Cap. 3 Quantification strategies in real-time PCR. International University Line (IUL).

PrimeQ, 2008. *Dissociation Curve Analysis. Technical Note*. T08-003A. PrimeQ.

Puerta C.J. and Urueña C.P., 2005. *Prácticas de Biología Molecular*. 1ª. ed. Bogotá, Colombia.: Pontificia Universidad Javeriana.

Quizlet, 2014. *Herpes Viruses (Alpha)*. [online] Available at: <<http://quizlet.com/26199672/herpes-viruses-alpha-flash-cards/>> [Accessed 11 Aug. 2014].

Ramírez Pineda, A., Covarrubias Ramírez, J.L., Flores Torres, C., Martínez González, R.J., González Avila, J.G., Tamez Guerra, R.S., Rodríguez Padilla, C. and Rivera Morales, L.G., 2007. Infecciones oportunistas presentes en individuos con VIH/SIDA: virus del herpes simple tipo 1 y 2, citomegalovirus y herpesvirus tipo 8 asociado a sarcoma de Kaposi. *Revista salud pública y nutrición*, [online] 8(1). Available at: <<http://biblat.unam.mx/es/revista/revista-salud-publica-y-nutricion/articulo/infecciones-oportunistas-presentes-en-individuos-con-vihsida-virus-del-herpes-simple-tipo-1-y-2-citomegalovirus-y-herpesvirus-tipo-8-asociado-a-sarcoma-de-kaposi>> [Accessed 10 Aug. 2014].

Rebbapragada, A., Wachih, C., Pettengell, C., Sunderji, S., Huibner, S., Jaoko, W., Ball, B., Fowke, K., Mazzulli, T., Plummer, F.A. and Kaul, R., 2007. Negative mucosal synergy between Herpes simplex type 2 and HIV in the female genital tract. *AIDS (London, England)*, 21(5), pp.589–598.

Roberts, C.M., Pfister, J.R. and Spear, S.J., 2003. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sexually Transmitted Diseases*, 30(10), pp.797–800.

ROCHE, 2007. *FastStart SYBR Green Master. Technical Note*. Version 7.0, Cat. No. 04673492001. ROCHE.

Sánchez-Alemán, M.Á., Bertozzi, S.M., Frontela-Noda, M., Guerrero-Lemus, V. and Conde-González, C.J., 2005. Detección de Chlamydia trachomatis en orina por LCR: aplicación del método de mezcla de muestras biológicas. *Revista de investigación clínica*, 57(4), pp.548–554.

Schacker, T., Ryncarz, A.J., Goddard, J., Diem, K., Shaughnessy, M. and Corey, L., 1998. Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1-infected men. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 280(1), pp.61–66.

Schacker, T., Zeh, J., Hu, H., Shaughnessy, M. and Corey, L., 2002a. Changes in plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA associated with herpes simplex virus reactivation and suppression. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(12), pp.1718–1725.

Schiffer, J.T., Abu-Raddad, L., Mark, K.E., Zhu, J., Selke, S., Magaret, A., Wald, A. and Corey, L., 2009. Frequent release of low amounts of herpes simplex virus from neurons: results of a mathematical model. *Science Translational Medicine*, 1(7), p.7ra16.

Schillinger, J.A., Xu, F., Sternberg, M.R., Armstrong, G.L., Lee, F.K., Nahmias, A.J., McQuillan, G.M., Louis, M.E. and Markowitz, L.E., 2004. National seroprevalence and trends in herpes simplex virus type 1 in the United States, 1976-1994. *Sexually Transmitted Diseases*, 31(12), pp.753–760.

Speers, D.J., 2006. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *The Clinical Biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 27(1), pp.39–51.

Stamm, W., Wasserheit, J. and Corey, L., 2007. *Sexually Transmitted Diseases, Fourth Edition*. 4 edition ed. New York: McGraw-Hill Professional.

Stevens, J.G. and Cook, M.L., 1971. Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science (New York, N.Y.)*, 173(3999), pp.843–845.

Stevenson, J., Hymas, W. and Hillyard, D., 2005. Effect of Sequence Polymorphisms on Performance of Two Real-Time PCR Assays for Detection of Herpes Simplex Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), pp.2391–2398.

Strick, L.B., Wald, A. and Celum, C., 2006. Management of herpes simplex virus type 2 infection in HIV type 1-infected persons. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(3), pp.347–356.

Thermo Scientific., 2011. *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)*. Technical Note. #K0221. Thermo Fisher Scientific.

Torres-Ibarra L. and Salmerón J., n.d. Prevalence and risk factors for anal HPV-16/18 infection in Mexican HIV-infected men who have sex with men. *Enviado*.

Tronstein, E., Johnston, C., Huang, M.-L., Selke, S., Magaret, A., Warren, T., Corey, L. and Wald, A., 2011. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 305(14), pp.1441–1449.

Valasek, M.A. and Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), pp.151–159.

Vergara-Ortega D.N., 2012. *Determinación de la diseminación del Virus del Herpes Simplex tipo 2 en una población de hombres mexicanos que viven con VIH*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR).

Vinueza-Burgos, C., 2009. *PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular*. [online] REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. Available at: <<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=63617114013>> [Accessed 10 Aug. 2014].

Wald, A., Corey, L., Cone, R., Hobson, A., Davis, G. and Zeh, J., 1997. Frequent genital herpes simplex virus 2 shedding in immunocompetent women. Effect of acyclovir treatment. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(5), pp.1092–1097.

Wald, A. and Link, K., 2002. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(1), pp.45–52.

Wald, A., Zeh, J., Selke, S., Ashley, R.L. and Corey, L., 1995. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. *The New England Journal of Medicine*, 333(12), pp.770–775.

Wald, A., Zeh, J., Selke, S., Warren, T., Ryncarz, A.J., Ashley, R., Krieger, J.N. and Corey, L., 2000. Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *The New England Journal of Medicine*, 342(12), pp.844–850.

Ward, P.L. and Roizman, B., 1994. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends in genetics: TIG*, 10(8), pp.267–274.

Wasti, S.P., Simkhada, P., Randall, J., Freeman, J.V. and van Teijlingen, E., 2012. Factors influencing adherence to antiretroviral treatment in Nepal: a mixed-methods study. *PloS One*, 7(5), p.e35547.

Watzinger, F., Ebner, K. and Lion, T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), pp.254–298.

Weiss, H.A., Wasserheit, J.N., Barnabas, R.V., Hayes, R.J. and Abu-Raddad, L.J., 2008. Persisting with prevention: the importance of adherence for HIV prevention. *Emerging Themes in Epidemiology*, 5, p.8.

Whitley, R.J. and Roizman, B., 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357(9267), pp.1513–1518.

Wright, P.W., Hoesley, C.J., Squires, K.E., Croom-Rivers, A., Weiss, H.L. and Gnann, J.W., 2003. A prospective study of genital herpes simplex virus type 2 infection in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-seropositive women: correlations with CD4 cell count and plasma HIV-1 RNA level. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(2), pp.207–211.

Zamilpa-Mejía, L.G., Uribe-Salas, F., Juárez-Figueroa, L., Calderón-Jaimes, E. and Conde-González, C.J., 2003. [Prevalence and factors associated with syphilis and genital herpes in 2 groups of the female population]. *Salud Pública De México*, 45 Supp 5, pp.S617–623.