

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Farmacología**



**ANÁLISIS DE LAS IMPLICACIONES DE LA INFECCIÓN  
VIH EN LA CAVIDAD ORAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Esther Jiménez Martínez

Bajo la dirección de los doctores

Carmen Gasco García  
Manuel L. Fernández Guerrero  
Juan José Arrieta Blanco

**MADRID, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**“ANÁLISIS DE LAS IMPLICACIONES DE LA  
INFECCIÓN VIH EN LA CAVIDAD ORAL”**

**TESIS DOCTORAL**

**D<sup>a</sup> Esther Jiménez Martínez**

Bajo la dirección de los doctores:

Profa. Dra. Carmen Gasco García

Prof. Dr. Manuel L. Fernández Guerrero

Dr. D. Juan José Arrieta Blanco

**Madrid 2013**

**MEMORIA DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:**

ESTHER JIMÉNEZ MARTÍNEZ

**PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**DIRECTORES:**

PROFA. DRA. CARMEN GASCO GARCÍA  
PROF. DR. MANUEL L. FERNÁNDEZ GUERRERO  
DR. D. JUAN JOSÉ ARRIETA BLANCO

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**MADRID 2013**

A mis padres,

## Agradecimientos:

A mis directores, la Profa. Dña. Carmen Gasco García, que desde que la conocí estudiando la carrera siempre me animó con cualquier idea o proyecto que pareciera interesante, dándome su apoyo y los empujones necesarios para que no desistiera; al Dr. D. Juan José Arrieta, que supo abrirme los ojos para apreciar el interesante mundo de la patología oral y puso a mi disposición sus medios para poder empezar a hacer algunos estudios clínicos; y al Dr. D. Manuel L. Fernández Guerrero que me brindó su apoyo clínico, su amplio conocimiento en la materia y me supo transmitir el interés por esta patología.

A Santiago Cano y Pedro Cuesta, del Centro de Datos de la Universidad Complutense, que realizaron el estudio estadístico de esta Tesis y nos ayudaron a dar sentido a los números obtenidos con mucha paciencia y dedicación.

Al personal de la Fundación Jiménez Díaz, tanto del Servicio de Estomatología como del Servicio de Infecciosas que durante estos años siempre han hecho fácil la tediosa tarea de recolectar muestras y datos, en especial a Loli, Rosalía y Val, siempre con ganas de sacar un estudio adelante.

A los amigos que siempre han estado ahí apoyándome cuando les hablaba de la "eterna tesis", en especial a Belén, amiga y compañera en todas las batallas desde hace muchos años.

A mi familia, que siempre me dio el empujón necesario para seguir. A Carlos, Ester y Pedro, que han conseguido que termine este trabajo para poder dedicarles más tiempo.

A Carlos, gran sufridor en la sombra de esta Tesis, que me ha empujado a seguir aún cuando no tenía tiempo material para poder escribir algo coherente.

Este trabajo forma parte de una línea de investigación que se creó con el objetivo de estudiar el papel y la repercusión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en boca. Actualmente, la infección por VIH continúa aumentando desde que se descubrió el virus por primera vez hace 27 años, la población que se sigue infectando en mayor porcentaje sigue siendo a través de la vía heterosexual, sin embargo en los últimos 6 años ha habido un notable incremento de la transmisión del virus en el colectivo de hombres que tienen sexo con hombres.

Queremos alertar sobre la importancia de esta infección y la relevancia que tiene saber el mecanismo de actuación del virus en nuestro campo (a nivel oral), por eso hemos intentado demostrar la presencia del virus con capacidad replicativa en mucosa oral, ya que a pesar de no ser la saliva el medio de transmisión habitual del virus, el riesgo existe; valorar la importancia de un diagnóstico precoz de la infección en el paciente que acude a consulta mediante métodos indirectos que nos permitan saber en el momento la posible infección de un paciente; y demostrar la existencia de enfermedades de transmisión sexual de manera subclínica en el colectivo hombres que tienen sexo con hombres que actualmente son los que han sufrido un incremento importante en el número de nuevas infecciones en los últimos años.

# **TRABAJOS PUBLICADOS**

Parte del trabajo de investigación discutido en esta tesis ha sido publicado como:

“Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA by In Situ Hybridization in Oral Mucosa Epithelial Cells From Anti-HIV-1 Positive Patients”

Elena Rodríguez-Íñigo, Ester Jiménez, Javier Bartolomé, Nuria Ortiz-Movilla, Begoña Bartolomé Villar, Juan José Arrieta, Félix Manzarbeitia, Vicente Carreño.

Journal of Medical Virology 77:17-22 (2005).

“Prevalence of Pharyngeal Colonization by *Neisseria gonorrhoeae* among HIV positive Men who Have Sex with Men in Downtown Madrid, 2011”

Ester Jiménez, María García, Marta Martínez, Sol Fernández, Juan José Arrieta, Manuel Fernández Guerrero.

Journal of Sexually Transmitted Diseases. 2013. Aceptado y pendiente de publicar.

## Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA by In Situ Hybridization in Oral Mucosa Epithelial Cells From Anti-HIV-1 Positive Patients

Elena Rodríguez-Iñigo,<sup>1</sup> Esther Jiménez,<sup>2</sup> Javier Bartolomé,<sup>1</sup> Nuria Ortiz-Movilla,<sup>1</sup> Begoña Bartolomé Villar,<sup>2</sup> Juan José Arrieta,<sup>2</sup> Felix Manzarbeitia,<sup>3</sup> and Vicente Carreño<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Fundación para el estudio de las Hepatitis Virales, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Dentistry, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

Several in vitro studies have shown that HIV-1 can infect CD4 negative epithelial cells of different origin including normal human oral keratinocytes, but whether this infection of mucosal epithelial cells occurs in vivo is still unclear. In this report, the presence and cell types infected by HIV-1 in paraffin embedded oral mucosa biopsies from 17 anti-HIV-1 positive patients have been examined by in situ hybridization and immunohistochemistry. As controls, oral mucosa biopsies from eight patients without HIV-1 infection markers were also analyzed. The results showed that 8 out of the 17 anti-HIV-1 positive patients had HIV-1 RNA detectable in plasma. Positive hybridization signals were observed in the mucosa biopsies from 14 of the 17 anti-HIV-1 patients (82.3%). The mean percentage of cells showing HIV-1 RNA was  $2.64\% \pm 1.77\%$  (range: 1% to 5.5%). No differences in the mean percentage of HIV-1 infected cells were found between patients with and without HIV-1 RNA in plasma ( $3.01\% \pm 1.57\%$  vs.  $3.4\% \pm 1.27\%$  respectively), or between untreated patients and patients under antiretroviral therapy ( $2.83\% \pm 1.63\%$  vs.  $3.42\% \pm 1.29\%$  respectively). Immunohistochemical detection of S-100 antigen, cytokeratin and CD4 showed that hybridization signals appeared in cytokeratin positive cells and CD4 positive cells but not in S-100 positive cells. In conclusion, this study has demonstrated that HIV-1 infects and replicates in oral mucosa epithelial cells in vivo and that these cells could represent a reservoir of the virus that may escape to the currently used antiretroviral therapy. *J. Med. Virol.* 77: 17–22, 2005.

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** HIV-1 RNA; hybridization signals; oral mucosa cells

### INTRODUCTION

Several studies have shown the presence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in saliva of infected individuals [Goto et al., 1991; Yeung et al., 1993; Phillips et al., 1994] although transmission of the infection through saliva has not been demonstrated. The source of the virus in saliva may be serum transudate or HIV-1 infected mononuclear cells in the presence of periodontal disease. However, another possibility is that HIV-1 may be released from cells infected in the oral mucosa. This hypothesis is supported by the fact that adult macaques become infected and develop AIDS after non-traumatic oral exposure to cell free simian immunodeficiency virus [Stahl-Hennig et al., 1999] which indicates that cells within the oral mucosa could be infected by the virus. In this regard, proviral DNA has been detected in oral mucosal Langerhan's dendritic cells [Chou et al., 2000]. Apart from this, epithelial cells in the oral mucosa may be infected by HIV-1, since epithelial cell lines can be infected in vitro by HIV-1 [Asmuth et al., 1994; Yahi et al., 1995; Tan and Phillips, 1996; Howell et al., 1997]. It has been also shown that HIV-1 infects and replicates in keratinocytes isolated from the normal oral mucosa [Moore et al., 2003; Liu et al., 2003], which suggests that these cells may be one of the cell types within the oral mucosa that can be infected by the virus in vivo. Using in situ polymerase chain reaction (PCR), HIV-1 RNA and proviral DNA has been detected in oral mucosa biopsies from HIV-1 infected patients [Qureshi et al., 1997], but the cell types infected by the virus (keratinocytes or Langerhan's cells) are not well-defined.

\*Correspondence to: Dr. Vicente Carreño, C/ Guzman El Bueno, 72 28015 Madrid, Spain. E-mail: fehvhpa@fehvh.org

Accepted 24 May 2005

DOI 10.1002/jmv.20409

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

**Prevalence of Pharyngeal Colonization by *Neisseria gonorrhoeae* among HIV positive Men who Have Sex with Men in Downtown Madrid, 2011.**

Esther Jiménez M.D., María García Pedrazuela M.D., Marta Martínez Pérez M.D., Sol Fernández de Mosteyrín, PhD., Juan J. Arrieta M.D. and Manuel L. Fernández Guerrero.

Division of Infectious Diseases (Department of Internal Medicine) and the Services of Clinical Microbiology and Dentistry. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid.

Running head: **Pharyngeal gonorrhoea**

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, MSM, HIV.

Manuscript word count: 947; Abstract word count: 49

Corresponding author: Manuel L. Fernández Guerrero, M.D.;  
Fundación Jiménez Díaz. Avda. Reyes Católicos, 2; 28040 Madrid, Spain.  
Email: [mlfernandez@fjd.es](mailto:mlfernandez@fjd.es)  
Phone: 34 915504800; Fax: 34 915504922

No funding has been received for this study.

No conflicts of interest reported

Esther Jiménez is Professor of Stomatology and Orthodontics at the Scholl of Dentistry, Universidad Complutense de Madrid. Her main area of interest is Infectious Diseases of the Mouth. One of her main contribution to the field is "Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA by In Situ Hybridization in Oral Mucosa Epithelial Cells From Anti-HIV-1 Positive Patients". *Journal of Medical Virology* 2005; 77:17-22.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>I. Introducción</b>	1
<b>1. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)</b>	2
1.1 Epidemiología del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	3
1.2 Estructura y morfología del VIH	29
1.3 Organización del genoma viral	32
1.4 Ciclo vital del VIH	35
1.4.1 Fase temprana: Mecanismo de entrada del VIH en la célula huésped	38
1.4.2 Fase tardía: transcripción del genoma viral, síntesis y ensamblaje de proteínas y generación de progenie infecciosa	45
1.5 Etiopatogenia del Sida. La boca como fuente de infección	49
1.5.1 Replicación del VIH en las células de la mucosa bucal	54
1.6 VIH y el sistema inmune: células presentadoras de antígenos en la patogénesis de la infección por VIH. Los tejidos linfáticos como sitios de replicación viral	61
<b>2. Estructura del epitelio bucal</b>	62
<b>3. Respuesta inmune frente a la infección por VIH</b>	69
3.1 Respuesta Humoral	69

	3.1.1	Inmunidad específica	69
	3.1.2	Inmunidad inespecífica	70
	3.2	Respuesta celular	70
	3.2.1	Inmunidad específica	70
	3.2.2	Inmunidad inespecífica	71
<b>4.</b>		<b>Métodos de detección del VIH:</b>	<b>72</b>
	4.1	Pruebas de cribado y confirmación	73
	4.1.1	Pruebas de cribado ó screening	73
	4.1.2	Pruebas de confirmación	74
	4.2	Detección de la proteína p24	74
	4.3	Pruebas de diagnóstico indirecto.	75
		Detección del VIH en fluidos orales: anticuerpos y proteínas salivares específicos del VIH-1	
	4.3.1	Métodos de diagnóstico del VIH-1 en saliva	82
	4.4	Cultivo viral y diagnóstico molecular en saliva y otras muestras orales	86
<b>5.</b>		<b>VIH y sus manifestaciones en mucosa bucal</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>		<b>Transmisión del VIH en la clínica dental</b>	<b>101</b>
<b>II.</b>		<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>105</b>
<b>III.</b>		<b>Pacientes y Métodos</b>	<b>108</b>
	<b>1.</b>	<b>Pacientes</b>	<b>109</b>
	1.1	Población de estudio y obtención de la muestra	109
	1.2	Descripción de la muestra	110
	<b>2.</b>	<b>Métodos</b>	<b>112</b>

2.1	Toma de las muestras	114
2.2	Análisis de las muestras	116
2.3	Análisis estadístico de las muestras	122
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b>	124
<b>V.</b>	<b>Discusión</b>	168
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones</b>	198
<b>VIII.</b>	<b>Anexos</b>	201
<b>IX.</b>	<b>Bibliografía</b>	208
<b>X.</b>	<b>Resumen en inglés</b>	229

## Glosario de términos

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADVP	Administración e drogas vía parenteral
CCR5	Receptor de la membrana celular de cepas R5, no sincitiales
CFR	Circulating recombinant forms. Formas recombinantes circulantes
CMSP	Células mononucleares en sangre periférica
CTL	Linfocitos CD8 citotóxicos
CXCR4	Receptor de la membrana celular de cepas X4, sincitiales
DC-Sign	Molécula específica tipo lectina con especial afinidad al VIH
EIA	Enzimo-inmuno análisis convencional. Método de diagnóstico indirecto del VIH.
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
FDC	Follicular dendritic cells. Células dendríticas foliculares
FISH	Fluorescence in situ hybridization. Hibridación in situ fluorescente
GACELISA	Método de diagnóstico indirecto del VIH. Específico cuando en la muestra existe un número bajo de inmunoglobulinas
GACRIA	Método de diagnóstico indirecto del VIH. Inmunoanálisis absorbente ligado a enzima
Gag	Gen gag antígeno de grupo. Codifica las proteínas del core
GalCer	Galactosilceramida
GP 120	Glicoproteína externa 120, del VIH
HAART	Highly active antiretroviral activity
HEF	Hiperplasia epitelial focal
HLA	Antígeno de histocompatibilidad, proteína celular
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres

ICAM-1	Proteínas de adhesión celular
IFN	Interferón. Citoquina proinflamatoria
IL-1 $\alpha$	Interleuquina 1 $\alpha$ . Citoquina proinflamatoria
INNRT	Inhibidores no nucleótidos de la transcriptasa inversa
ITS	Infecciones de transmisión sexual
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue. Tejido linfoide integrado en la mucosa
Nm	Nanómetros
OHCPs+	Oral Health Care Professional HIV positive. Profesionales de la salud oral VIH positivos
PBS	Phosphate saline buffer. Tampón fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de polimerasa
PMN	Polimorfos nucleares neutrófilos
RT	Reverse transcriptase. Transcriptasa inversa
SAG	Salivary agglutinin. Aglutininas salivales
SLPI	Secretory Leukocyte protease inhibitor. Leucocito secretor inhibidor de la proteasa
SRI	Síndrome de reconstitución inmune
SSC	Sodium saline citrate. Tampón citrato de sodio
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
TRIM5 $\alpha$	Proteína importante en la decapsidación en el ciclo vital del VIH
TSP	Trombospondina. Proteína salival
UDIs	Usuarios de drogas intravenosas
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
VHS-1	Virus del herpes simple tipo 1
VPH	Virus del papiloma humano

# I. INTRODUCCIÓN

## **1. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)**

La descripción inicial del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1) data de 1983 <sup>1, 2</sup> y la del VIH-2 de 1986 <sup>3</sup>. Estos dos virus fueron identificados hace casi 30 años como la principal causa del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El número de personas infectadas actualmente en todo el mundo excede los 34 millones, la mayoría de las cuales habitan en los países en vías de desarrollo de Asia, África Sub-Sahariana y América del Sur <sup>4</sup>.

La infección por el VIH constituye una pandemia. Su expansión ha sido de tal magnitud y el impacto de la enfermedad tan devastador que es necesaria una respuesta global. Un intento de respuesta se llevó a cabo en 1996 cuando tras la unión de seis naciones, se constituyó el primer programa del Síndrome de la Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) de la ONU (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS: UNAIDS). Desde entonces UNAIDS ha jugado un papel fundamental en la revisión e información sobre la epidemiología en la infección por VIH <sup>5</sup>.

En 1995, se produjo la introducción de inhibidores de proteasa e inhibidores no nucleótidos de la transcriptasa inversa (INNTR) ó "Non Nucleotides Reverse Transcriptase Inhibitors" (NNRTI) al tratamiento antirretroviral iniciándose la era de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ó tratamiento antirretroviral altamente activo ("Highly Active Antirretroviral Therapy": HAART), dando como resultando una disminución en la mortalidad y morbilidad de la enfermedad por el VIH, produciendo un descenso en la incidencia de infecciones oportunistas, tumores y incluso muertes.

## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

En 25 años, 65 millones de personas han sido infectadas y más de 25 millones han fallecido a causa del SIDA. A nivel mundial, más del 40% de las nuevas infecciones que se producen en adultos son en jóvenes entre 15 y 25 años <sup>6</sup>.

Actualmente es la cuarta causa de muerte a nivel mundial y se considera una de las enfermedades más devastadoras que afectan al ser humano <sup>7</sup>.

El número de personas que han fallecido anualmente a causa del SIDA ha disminuido en los dos últimos años pasando de 2,2 millones (1,9-2,6 millones) en 2005, a 2 millones (1,8-2,3 millones) en 2007 y a los 1,8 millones (1,6-2,1 millones) de 2009 y esto es debido en parte al mayor acceso por parte de la población al tratamiento frente al VIH <sup>8</sup>.

El SIDA, es hoy en día la causa principal de muerte prematura entre personas de 15 a 59 años <sup>9</sup> y lamentablemente, sólo una quinta parte de la población de los países desarrollados que necesitan tratamiento reciben terapia antirretroviral <sup>10</sup>.

Las pautas actuales recomiendan que no se inicie tratamiento en aquellas personas asintomáticas con una concentración en plasma del VIH-ARN menor de 100.000 copias/ml, a menos que el número de células CD4 sea menor de 350 cels/mm<sup>3</sup> <sup>11</sup>.

Después de una década de tratamiento con los fármacos antirretrovirales de gran actividad (TARGA), los principales efectos secundarios conocidos, como las alteraciones del metabolismo, lipodistrofias, diabetes, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y

las dislipidemias, aún no tienen ningún tratamiento protocolizado y consensuado <sup>12</sup>. En la Comunidad de Madrid se tratan alteraciones como las lipodistrofias en este tipo de pacientes, mediante rellenos faciales que aún no están completamente estandarizados.

El porcentaje de resistencia a fármacos de las cadenas del VIH circulantes continúa aumentando, desde un 5% en muestras recogidas antes de 1996, hasta un 15% en muestras recogidas entre 1999 y 2003. Por tanto, actualmente los pacientes deberían someterse a pruebas de resistencia a fármacos antes de empezar el tratamiento. Como el algoritmo de Stanford, empleado para analizar cada secuencia de nucleótidos del individuo <sup>13</sup>.

En cuanto a enfermedades asociadas al VIH, una gran preocupación continúa siendo la gran relación que existe entre el virus y la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculosis mata a una de cada siete personas con SIDA a nivel mundial, y un tercio del aumento de los casos de tuberculosis en los últimos cinco años pueden ser atribuidos a la epidemia del VIH. De ahí el creciente interés por encontrar una manera que ayude a disminuir la tuberculosis en el paciente con infección por VIH <sup>12</sup>.

Los esfuerzos en disminuir el número de muertes debidas a tuberculosis entre los pacientes que viven con VIH, harán que se intente disminuir en un 50% esta cifra en 2015 <sup>14</sup>.

Desde 2004, e número de muertes por tuberculosis en pacientes con VIH ha descendido el 25% a nivel mundial y el 28% en el África Subsahariana, lo que se supone un descenso del 80% de toda la población que vive con tuberculosis y VIH.

En 2011, un 23% de los pacientes con tuberculosis a los que se les realizó el test del VIH resultó positivo <sup>14</sup>.

La incidencia de SIDA es un buen indicador para valorar la frecuencia y evolución de estadios avanzados de la infección por VIH en la población, además de ser una pieza clave para evaluar la efectividad de los tratamientos y el diagnóstico precoz de la infección, que son las intervenciones que mayor impacto tienen en la evolución del SIDA <sup>15</sup>.

Los datos publicados, suponen un 16% menos que la cifra estimada publicada en 2006 (39,5 millones [34,7–47,1 millones]) (ONUSIDA/OMS, 2006) (figuras 1 y 2). Precisamente, en el informe de Unaid de 2012, existe un ligero descenso de las nuevas infecciones y de las personas que viven con el VIH (figura 3a), así como de las personas que han fallecido a causa del sida (figura 4a) <sup>4</sup>.

Impacto global del VIH/SIDA <sup>16</sup>:

- Personas que vivían con el VIH en 2009 (figura 2):

Total 33,3 millones (31,4 – 35,3 millones)

Mujeres 17,7 millones (15,1 – 20,9 millones)

- Nuevas infecciones por el VIH en 2009 (figura 3):

Total 2,6 millones (2,3 – 2,8 millones)

Europa Occidental y Central: 31.000 (23.000-40.000)

- Defunciones causadas por el SIDA en 2009 (figura 4):

Total 2,1 millones (1,9 – 2,4 millones)

Europa Occidental y Central: 12.000

<b>Variable</b>	<b>1995</b>	<b>2000</b>	<b>2005</b>	<b>2009</b>
<b>N° casos de infección por VIH ó SIDA (millones)</b>				
Total	14.0-15.0	36.1	40,3	33,3
Mujeres	7.0	16.4	17,5	15,9
Niños	1.5	1.4	2,3	2.5
<b>N° nuevas infecciones de VIH</b>				
Total	4.7	5.3	4,9	2,6
Mujeres	ND	2.2	ND	ND
Niños	0.5	0.6	0,7	0,37
<b>N° muertes</b>				
Total	2.3†	3.0	3,1	1,8
Mujeres	ND	1.3	ND	ND
Niños	0.5†	0.5	0,6	0,29

ND: No disponible

†: Los datos de mortalidad son de 1997 y representan un aumento del 50% con respecto al año anterior.

Los datos de niños de nuevas infecciones y de muertes están representados en porcentaje.

*Figura 1: Prevalencia e Incidencia Mundial de la infección por VIH, SIDA y mortalidad en 1995, 2000, 2005 y 2009 <sup>12</sup>.*

Adults and children estimated to be living with HIV | 2009



Figura 2: Estimaciones mundiales VIH, 2009. (Informe ONU-SIDA-OMS, 2010 Global Report).

Estimated number of adults and children newly infected with HIV | 2009

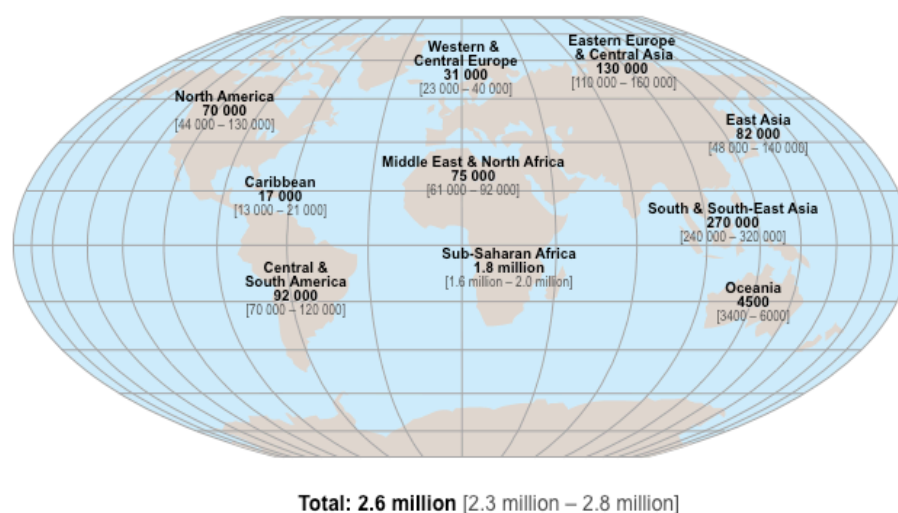


Figura 3: Número estimado nuevas infecciones por VIH de adultos y niños en 2009. (Informe ONU-SIDA-OMS, 2010 Global Report).

	Adults and children living with HIV	Adults and children newly infected with HIV
WESTERN AND CENTRAL EUROPE	2011 900 000 [830 000–1 00 000]	30 000 [21 000–40 000]
	2001 640 000 [590 000–710 000]	29 000 [26 000–34 000]
GLOBAL	2011 34.0 million [31 400 000–35 900 000]	2.5 million [2 200 000–2 800 000]
	2001 29.4 million [27 200 000–32 100 000]	3.2 million [2 900 000–3 400 000]

Figura 3a: Estadística del VIH/Sida en 2001 y 2011. Informe global Unacids 2012. Diciembre 2012.

Estimated adult and child deaths from AIDS | 2009

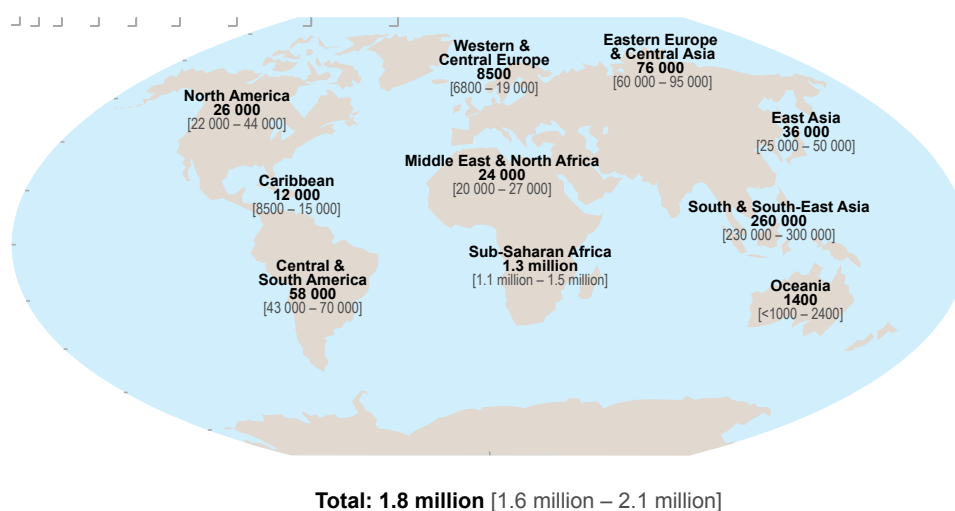


Figura 4: Número estimado de defunciones causadas por el SIDA en adultos y niños durante 2011. (Informe ONU-SIDA-OMS, 2010 Global Report).

AIDS-related deaths among adults and children, 2005 and 2011		
<b>WESTERN AND CENTRAL EUROPE</b>		
2011		7 000 [6 100–7 500]
2005		7 800 [7 600–9 000]
<b>GLOBAL</b>		
2011		1.7 million [1 500 000–1 900 000]
2005		2.3 million [2 100 000–2 600 000]

Figura 4a: Estadística de las muertes causadas por sida en 2011. Informe global UnaidS 2012. Diciembre 2012.

Estas estimaciones enmascaran el dinamismo de esta epidemia en relación a la distribución geográfica, su magnitud y su modo de transmisión; hoy día, no existe ninguna región del mundo que no esté afectada por esta pandemia <sup>17</sup>.

El modo de transmisión predominante, sigue siendo la vía heterosexual, que abarca el 85% de todas las infecciones por VIH <sup>18</sup>.

Las disminuciones registradas en los dos últimos años se deben en parte a la ampliación de los servicios de tratamiento anti-retroviral. El Sida continúa siendo una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo y la principal en África subsahariana (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2003). La incidencia mundial del VIH probablemente alcanzó su punto máximo en los últimos años de la década de 1990 con más de 3 millones de nuevas infecciones por año, y se estimó que más de dos tercios, un 68%, de los 2,5 millones [1,8–4,1 millones] de nuevas infecciones registradas en 2007 se produjeron en el África Sub-Sahariana (figura 3). Esta reducción en la incidencia del VIH probablemente refleje las tendencias

naturales en la epidemia así como también el resultado de los programas de prevención que se han abandonado en gran medida <sup>19</sup>.

En **2011**, el número de **nuevas infecciones**, continúa descendiendo (2,5 mill [2,2-2,8 mill]), un 20% menos que en 2001. Los descensos más notables en el número de personas que adquieren VIH desde 2001 se han observado en el África Sub-Sahariana, con un descenso del 20%, y en el Caribe con un descenso del 42% <sup>20</sup>.

En **2011**, 1,7 millones de personas (1,5-1,9 mill) **fallecieron a causa del Sida** y sus complicaciones, esto representa un descenso del 24% en comparación con los datos de 2005, cuando fallecieron 2,3 millones de personas (2,1-2,6 millones) (figura 4) <sup>21</sup>.

A nivel mundial, en relación con el **mecanismo de transmisión**, en 2011 la prevalencia del VIH en el grupo de hombres que tienen sexo con Hombres (HSH) es notablemente más alta en las ciudades que en la población en general (aproximadamente 13 veces). Este aumento es debido a la poca protección sexual de estos pacientes. Únicamente un 38% de los hombres que tiene sexo con hombres (HSH) se han sometido al test de diagnóstico del VIH en el último año. En 2015 se espera reducir en un 50% el número de personas que se contagian vía sexual <sup>22</sup>.

En este mismo período, el grupo de personas que adquirieron el virus por el uso de drogas vía parenteral (UDVP), es una población muy afectada, cuya prevalencia es mayor que en la población en general, siendo la infección por VIH en este colectivo al menos 22 veces más elevada que en el resto de la población <sup>22</sup>.

En el África Sub-Sahariana en 2009, gracias a la expansión de manera global de la terapia antirretroviral murieron 320.000 personas menos que en 2004 <sup>23</sup>.

Esta región, sigue siendo la más afectada por el SIDA, en 2009, 22,5 millones (20,9-24,3 millones) de personas vivían con el VIH, casi dos millones más que en el 2001 (20,9 millones), sin embargo esta cifra se mantiene estable desde 2007. Las dos terceras partes del total de personas que viven con el VIH se encuentran en esta zona, así como el 77% del total de mujeres VIH positivas. En 2011, uno de cada 20 adultos viven con el VIH, el 4,9% de la población, que representan el 69% de la población mundial que vive con el VIH <sup>4</sup>. En esta región fallecieron aproximadamente 1,3 millones (1,1-1,5 millones) de personas en 2009, mientras que otros 1,8 millones (1,6-2,0 millones) contrajeron la infección por el VIH frente a los 2,2 millones (1,7-2,7 millones) de nuevas infecciones que se produjeron en 2001 <sup>24</sup>. En 2009, el 35% de las nuevas infecciones por VIH y el 38% de las muertes a causa del SIDA se han producido en esta región que alberga el 67% de la población mundial afectada por esta enfermedad <sup>25</sup>.

Un tercio de todas las infecciones por VIH se producen por la administración de drogas vía intravenosa (8,8 millones aproximadamente) la mayor parte de las cuales están localizadas en Europa Central, Europa del Este y sudeste Asiático <sup>26</sup>.

En **Europa oriental, Asia central y en Asia oriental**, la epidemia está creciendo rápidamente. En las dos primeras, el número de personas que viven con el VIH ha aumentado en un 150% de 2001 (630.000) a 2007 (1,6 millones) y en 2009 (1,4 millones), y el número de fallecimientos causados por el SIDA se ha elevado hasta 76.000 en 2009, comparado con los 55.000 en 2007 y los 8.000 de 2001. En Asia oriental, el número de personas que viven con el VIH en 2009 era de 770.000, en 2007 aumentó hasta 800.000 personas, en comparación con los 420.000 de 2001 <sup>27</sup>.

Las formas de contraer el VIH en los adultos varían con la edad y el área geográfica; en el 80% de los casos el contagio se ha producido a través de relaciones heterosexuales; por el contrario, un 90% de las infecciones en niños son el resultado de la transmisión vertical madre-hijo. Recientemente también aparece como vía de contagio del VIH en esta región la administración de drogas vía parenteral (ADVP), aunque en un porcentaje muy pequeño <sup>28</sup>.

Los datos actuales revelan una fuerte relación entre el riesgo de adquirir VIH por vía sexual y el uso de drogas y/o alcohol como forma de diversión esporádica <sup>29</sup>.

Existe una evidencia cada vez mayor de que la carga viral es un valor predictivo del riesgo de transmisión del VIH. A pesar de no estar muy clara la contribución de los viriones VIH libres circulantes, sin estar asociados a células, con los viriones VIH asociados a células en la transmisión de la infección <sup>30</sup>.

Los niveles más altos de viremia se dan durante la infección aguda y durante la fase avanzada de la enfermedad por VIH <sup>31</sup>. Sin embargo, cuando existen coinfecciones con otras enfermedades de transmisión sexual en pacientes VIH+ asintomáticos, los niveles de viremia pueden ser similares a los valores observados en la infección aguda <sup>32</sup>.

Desde 2002, en **América del Norte, Europa Occidental y Oriental** existe un incremento en el número de nuevos diagnósticos de VIH. En conjunto, aproximadamente 2,3 (2,0-2,7) millones de personas están viviendo con el VIH en 2009 en estas regiones, frente a los 2,1 (1,5-3,0) millones de personas que los hacían en 2007. Debido al acceso generalizado al tratamiento anti-retroviral, en 2009 falleció por SIDA un

número comparativamente bajo de personas, 35.000 (29.000-56.000), cifras ligeramente superiores a las registradas en 2007 (32.000 personas) (figura 3)<sup>33</sup>.

Sólo en Estados Unidos anualmente se diagnostican 40.000 nuevas infecciones, la mayoría de estas infecciones son transmitidas por personas que desconocen que son portadoras del VIH-1. Cerca de 250.000 personas en Estados Unidos no saben que están infectadas, sin embargo realizan prácticas sexuales asociadas a la transmisión por VIH<sup>34</sup>.

Mucha gente susceptible de ser infectada por el VIH no son diagnosticadas a tiempo y por tanto más de un tercio de los diagnosticados con VIH desarrollan Sida en el año de su diagnóstico. Un comienzo del tratamiento en etapas tempranas de la enfermedad mejora mucho el pronóstico a diferencia del tratamiento que se instaura una vez que el paciente presenta inmunosupresión severa <sup>34</sup>.

En 2009, en **Europa Occidental y Central** unas 820.000 personas (720.000-910.000) están viviendo con el VIH frente a las 760.000 personas (600.000-1,1 millones) de 2007 (figura 2) <sup>28</sup>. Después del África Subsahariana, las regiones más afectadas por el VIH son Europa occidental y central donde el 1% de los adultos estaban viviendo con el sida en 2011 (figura 3a) <sup>4</sup>.

La tasa de nuevos diagnósticos de VIH casi se ha mantenido en **Europa Occidental** en el período de 2001-2009: 31.000 (27.000-35.000). En Europa Occidental, se está observando un aumento significativo de nuevos diagnósticos de VIH por relaciones sexuales entre hombres (HSH). Datos de los 23 países europeos demuestran que los nuevos diagnósticos de VIH por relaciones sexuales entre hombres han aumentado un 86% entre 2000 y 2006. Mientras tanto, las nuevas infecciones entre usuarios de

drogas vía parenteral han disminuido de manera global. Inmigrantes que viven con el VIH son un colectivo en aumento en varios países europeos; la transmisión heterosexual engloba a la mitad de las nuevas infecciones en Europa Central, pero la mayoría de estas personas se contagiaron en el extranjero (principalmente en África Sub-Sahariana, Caribe y Asia)<sup>35</sup>.

En Europa Occidental, se han observado dos tendencias epidémicas divergentes: El número de nuevos diagnósticos de VIH atribuibles a las relaciones sexuales peligrosas entre varones prácticamente se duplicaron entre 1999 y 2006 (de 2538 a 5016) sin embargo, aquellos casos atribuibles a los usuarios de drogas vía parenteral (UDVP) registraron una disminución en el mismo período (de 661 a 581), salvo en España y Portugal (EuroVIH, 2007) <sup>36</sup>.

Se estima que en **Europa Occidental** por cada dos pacientes infectados hay uno (33%) que lo desconoce. Este 33% de personas infectadas que lo desconocen contribuyen a un exceso de nuevas transmisiones (60-70% del total) y además no se beneficiarán o lo harán con retraso, de los tratamientos TARGA<sup>37</sup>.

En Julio de 1993, en Europa se revisaron las especificaciones de la definición de SIDA para adultos (mayores de 13 años) y se añadieron tres nuevas enfermedades a la lista de las 23 que ya eran consideradas como enfermedades indicadoras de SIDA. Estas enfermedades eran: tuberculosis pulmonar, neumonía bacteriana recurrente en los 12 meses desde el primer episodio y cáncer de cérvix en mujeres infectadas por el VIH <sup>38</sup>.

En **España**, en el año 2011 se han notificado 2.763 nuevos diagnósticos de infección por VIH. La edad media es de 35 años (sin diferencias significativas por sexo) y los hombres suponen un 83% de los nuevos diagnósticos (figura 5).

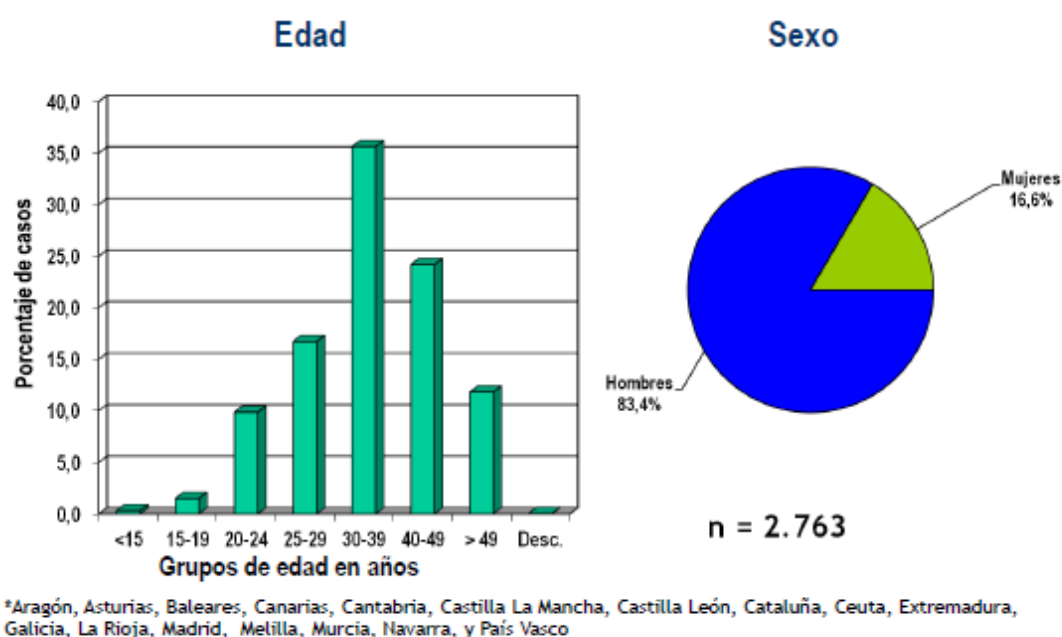
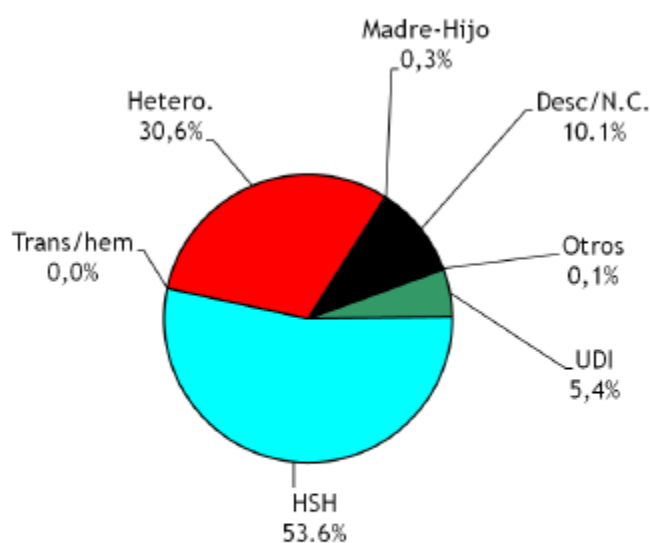


Figura 5: Nuevos diagnósticos de VIH. Distribución por edad y sexo. España. Instituto de Salud Carlos III. Epidemiología VIH. (Consultado diciembre 2012).

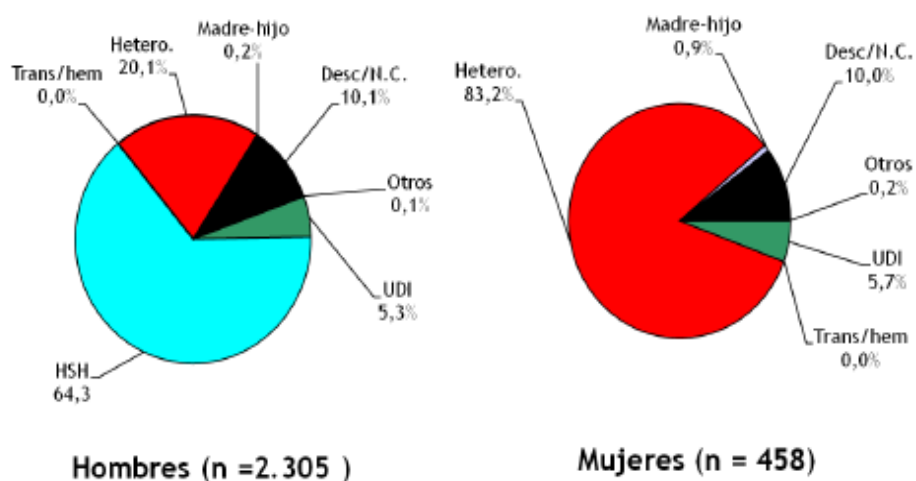
La vía de transmisión más frecuente es la de las relaciones sexuales entre hombres (HSH) que son un 54%, seguida de las relaciones heterosexuales que son un 31% del total de los nuevos diagnósticos, y por último el uso de drogas vía intravenosa (UDVP) que es de un 5% (figuras 6 y 7).



(n = 2.763)

\*Aragón, Asturias, Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla La Mancha, Castilla León, Cataluña, Ceuta, Extremadura, Galicia, La Rioja, Madrid, Melilla, Murcia, Navarra, y País Vasco

Figura 6: Nuevos diagnósticos de Sida por categoría de transmisión. España. Instituto de Salud Carlos III. Epidemiología VIH. (Consultado Diciembre 2012).

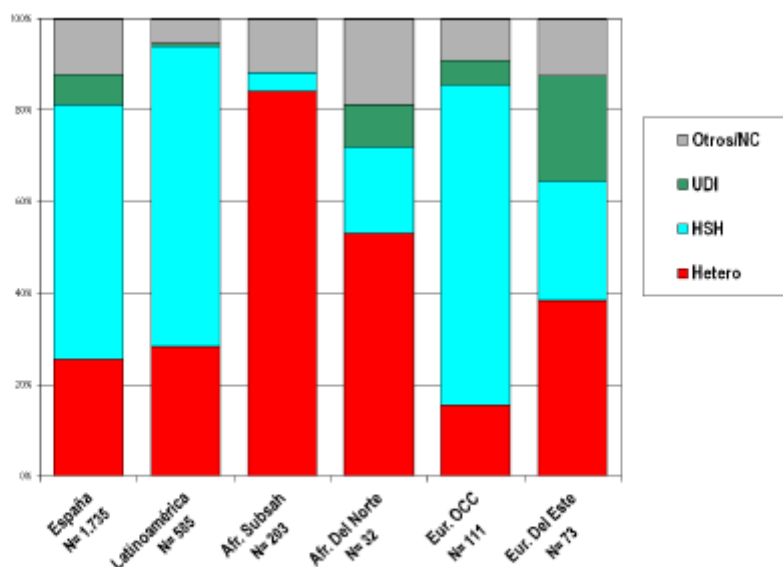


\*Aragón, Asturias, Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla La Mancha, Castilla León, Cataluña, Ceuta, Extremadura, Galicia, La Rioja, Madrid, Melilla, Murcia, Navarra, y País Vasco

Figura 7: Nuevos diagnósticos de Sida por categoría de transmisión y sexo. España. Instituto de Salud Carlos III. Epidemiología VIH. (Consultado Diciembre 2012).

En España, el porcentaje de extranjeros diagnosticados con infección por VIH es cada vez mayor, pasando del 31% en 2004 al 37% en 2011. De estos nuevos diagnósticos, el 21% corresponden a personas originarias de Latinoamérica. En los nuevos diagnósticos en mujeres, más del 50% eran inmigrantes<sup>39</sup>.

Se observa que en los casos procedentes de Latinoamérica y Europa Occidental, la transmisión entre HSH supone un 66% y un 70% respectivamente, mientras que en españoles supone el 56%. En los subsaharianos, en cambio, el 84% adquirió la infección a través de la transmisión heterosexual, frente al 26% que representa en españoles (figura 8).



\*Aragón, Asturias, Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla La Mancha, Castilla León, Cataluña, Ceuta, Extremadura, Galicia, La Rioja, Madrid, Melilla, Murcia, Navarra, y País Vasco

Figura 8: Nuevos diagnósticos de VIH en inmigrantes. Distribución por categorías de transmisión según origen. España. Año 2011. Instituto de Salud Carlos III.

El 46% del global de los nuevos diagnósticos presentaron diagnóstico tardío.

En las distintas categorías de transmisión de la infección por VIH, los españoles son mayoritarios en todas ellas, pero en la transmisión heterosexual casi el 50% son inmigrantes (latinoamericanos y subsaharianos) y en la transmisión homosexual entre hombres (HSH), los latinoamericanos son el 27%.

En el período 2007-2011, se aprecian diferentes tendencias en la incidencia de nuevos diagnósticos de VIH según mecanismo de transmisión: la tendencia es descendente en UDVP (10,2/millón de habitantes en 2007 frente a 4,5/millón en 2011); en la transmisión heterosexual las tasas tienden a estabilizarse, sobre todo teniendo en cuenta el retraso en la notificación; y aumentan claramente los nuevos diagnósticos en HSH (93,1/millón población masculina en 2007 frente a 109,4 en 2011). A lo largo del periodo, tanto el número de personas extranjeras (973 en 2007 frente a 875 en 2011) como el porcentaje que representan, permanece estable. El diagnóstico tardío disminuye en el grupo de HSH desde 41% en 2007 hasta 37% en 2011.

Entre los españoles la transmisión homosexual ocupa el primer lugar desde 2005. En el caso de personas originarias de otros países, desde 2009 es también la transmisión homosexual la primera vía de transmisión del virus <sup>39</sup>.

En España, desde el inicio de la epidemia se han notificado 81.855 casos de sida. La incidencia es un indicador de la frecuencia y evolución de los estadios avanzados de la infección por VIH en la población, pero no aporta información sobre la frecuencia de nuevas infecciones por VIH en la población ni de su evolución reciente <sup>39</sup>. Los programas de reducción en la incidencia se han asociado a un descenso en el consumo de drogas intravenosas y número de infecciones por el VIH en este colectivo. La prevalencia del VIH en ciudades como Barcelona y Sevilla sufrieron una

reducción significativa entre 1995 y 2003 del número de infecciones del VIH en este grupo: Barcelona de un 44% a un 21%; Sevilla de un 44% a un 22%. Sin embargo en Madrid, donde los programas de reducción de daños se empezaron a aplicar a finales de los noventa, la prevalencia del VIH entre los consumidores de drogas intravenosas se mantuvo estable: 37% en 1995 y 35% en 2003 <sup>40, 41</sup>

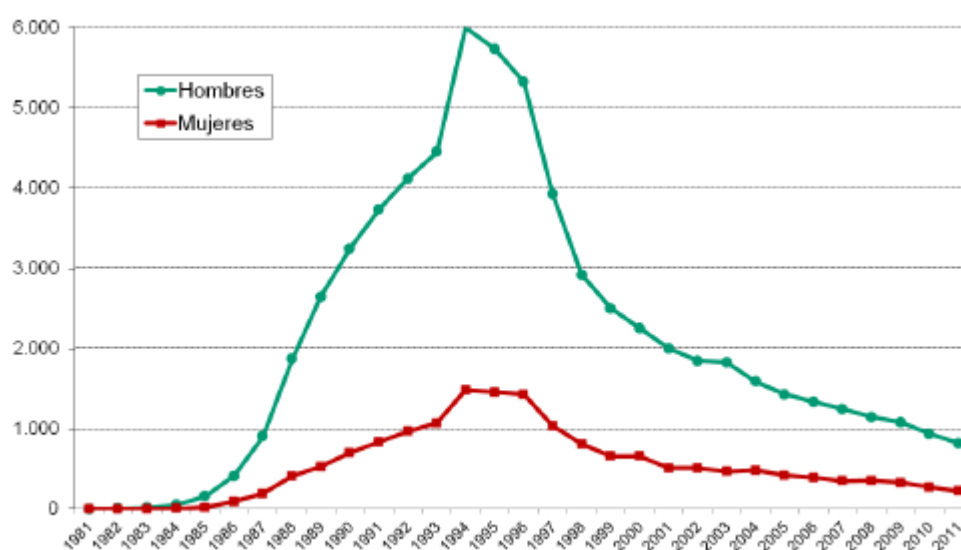


Figura 9: Incidencia anual de SIDA en España por sexo. Actualización a 30 de Junio de 2011. (Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo. Consultado Diciembre 2012).

En España, desde la extensión de los nuevos tratamientos antirretrovirales a finales de 1996, la incidencia de SIDA ha disminuido en un 78% hasta el 2007 y en un 81% hasta 2010, con un descenso considerable entre 1997-1999 y otro más moderado hasta el 2001. A partir del 2002 los descensos se mantienen por debajo del 10%. Sin embargo, España sigue siendo uno de los países de mayor incidencia de SIDA en la Europa Occidental (figura 9) <sup>39</sup>.

En 2004, se diagnosticaron en España 2.071 casos de SIDA, que en comparación con los 2.218 estimados en 2003 supone un 6,6% de descenso. En 2005 se diagnosticaron un total de 1.781 casos, en 2006 un total de 1.586 casos y en 2007 1.345 casos de sida.

En 2011, se diagnosticaron en España 1.038 nuevos casos de sida frente a los 1.162 de 2010. El 79% fueron varones y la media de edad fue de 42 años. El porcentaje de personas que contrajeron la infección por vía heterosexual fue del 32%, seguido del grupo HSH con un 30% de los casos y un 25% corresponden a los UDVP, ésta última vía de contagio en ligero descenso respecto al año anterior (27% en 2010) (figura 10).

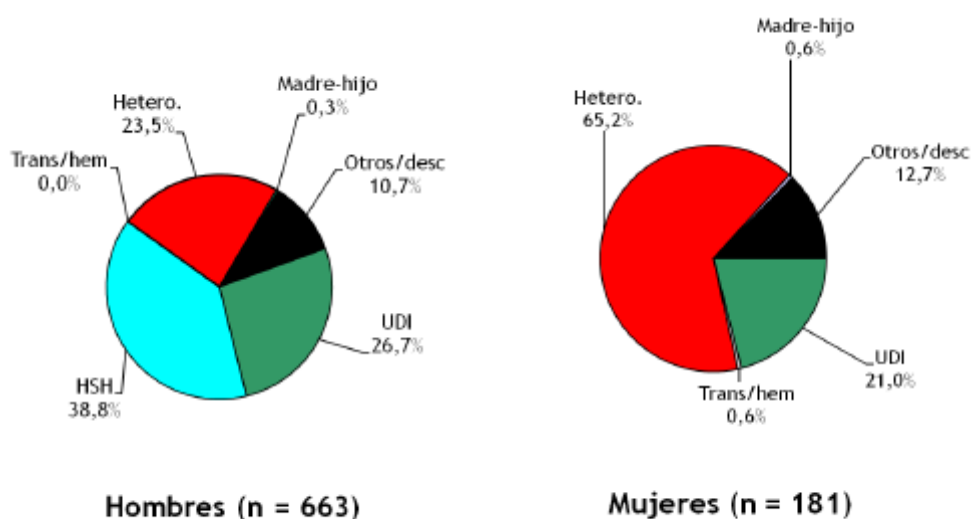
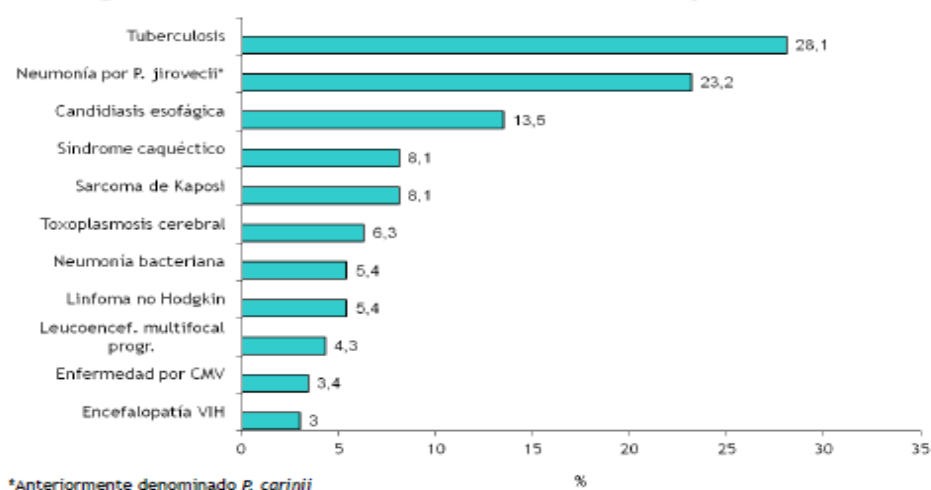


Figura 10: Casos de SIDA diagnosticados en España. Año 2011. Distribución de categorías de transmisión por sexo. (Instituto de Salud Carlos III. Centro nacional de Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo). Actualización a 30 de Junio de 2012.

Desde mediados de la década de los 90 el número de casos de sida ha experimentado un progresivo declive, que supone un 85% desde 1996 (año previo a la generalización de la terapia anti-retroviral de gran actividad, TARGA) hasta 2011. Con respecto al 2010, en el año 2011 los casos descendieron un 13% entre los varones y un 18% entre las mujeres. Por categorías de transmisión los UDVP y los heterosexuales descendieron 22% y el 16% respectivamente, mientras que el descenso fue mínimo en los HSH, con un 1%<sup>39</sup>.

El número de casos de inmigrantes aumenta hasta llegar al 30% en 2011, sin embargo hasta 1997 la proporción de casos de sida en personas nacidas fuera de España estaba por debajo del 3%. En el periodo 2007-2011, la tuberculosis de cualquier localización siguió siendo la enfermedad indicativa de sida más frecuente, afectando al 28% de los casos. Le sigue la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (23%) y la candidiasis esofágica (13%) (figura 11).



*Figura 11: Enfermedades diagnósticas de sida más frecuentes en el período 2007-2011. Registro Nacional de Sida. Actualización a 30 de Junio de 2012. Instituto de Salud Carlos III.*

En algunos individuos con infección por VIH que no progresa a largo plazo (esto es, sin disminución del número de células CD4+ o infección crónica durante al menos siete años sin desarrollo de SIDA), se lograron identificar viriones defectuosos <sup>42</sup>. Por tanto, la infección con virus defectuosos o con poca capacidad replicativa, puede prolongar el curso clínico de la infección por VIH-1. Sin embargo, en la mayoría de los individuos la infección por VIH-1 está caracterizada por una replicación competente del virus, con altos niveles de recambio de viriones, producidos diariamente.

Sigue siendo muy elevado el número de nuevas infecciones y este se mantiene constante, aunque la composición cualitativa de los nuevos infectados haya cambiado. Hay más transmisión heterosexual y a través de relaciones homosexuales masculinas y menos a causa de compartir jeringuillas contaminadas <sup>43</sup>.

Al menos el 30% de los pacientes con nuevas infecciones han nacido fuera de España, pero a menudo la infección la han adquirido tras su llegada a España. La infección por el VIH-1 se diagnostica tarde en al menos el 40% de los casos (cuando la cifra de linfocitos T CD4+ está por debajo de las 200 células/mm<sup>3</sup> de plasma y el riesgo de infección oportunista es alto). A nivel individual, ello implica un conjunto de pacientes infectados que desconocen su situación y que contribuyen a un incremento de nuevas transmisiones. En números absolutos esto podría significar que en España se estima que hay 140.000 personas infectadas por VIH-1 de los cuales aproximadamente 40.000 desconocerían su

situación. Este 35% de personas que desconoce que están infectadas por el VIH, se estima que contribuyen a un 60-70% de las nuevas transmisiones<sup>44</sup>.

En 2011, el Instituto de Salud Carlos III ha realizado una encuesta hospitalaria sobre 812 pacientes VIH/SIDA ambulatorios en contacto con el Sistema Nacional de Salud (SNS), en la que se han recogido los siguientes datos respecto de la infección por VIH:

- País de origen: el 16% de los pacientes encuestados en 2011 son extranjeros.
- Mecanismos de transmisión: hay un incremento de hasta el 25% en los casos atribuidos a relaciones homosexuales entre hombres, frente al 14% que era el porcentaje de los casos por esta vía de transmisión en 2000.
- Situación clínica de los pacientes VIH 2000-2011: Tras la aparición del TARGA existe una mejoría importante de la situación clínica. En 2011 de los pacientes encuestados que se supo el estadio, el 40% eran asintomáticos, el 21% sintomáticos y el 38% tenían diagnóstico de sida. Aumenta la proporción de pacientes con niveles altos de CD4 pasando de 314 céls/ $\mu$ l en 2000 a 481 céls/ $\mu$ l en 2011.
- Pacientes en tratamiento antirretroviral: el 88% está en tratamiento antirretroviral frente al 78% que lo estaba en 2000.
- Enfermedades asociadas al VIH y co-morbilidad más frecuente: las enfermedades más frecuentes siguen siendo neumonía por *P. Jirovecci*,

tuberculosis y candidiasis esofágica. En 2011 el 12% de los pacientes fueron diagnosticados de alguna ETS en los últimos 12 meses: sífilis (58%), condilomas (21%), gonococia (16%), uretritis no gonocócica (16%), VPH (10%), herpes genital (8%), clamidiasis (8%), tricomoniasis (5%).

Algunos pacientes fueron diagnosticados de más de una ETS. En el periodo 2000-2011 existe un importante incremento de las conductas sexuales de riesgo, sin embargo en este mismo periodo no se observa variación en la proporción de pacientes con VHB y existe una disminución significativa de los pacientes que son portadores del VHC que suelen ser pacientes con historial de drogas vía parenteral (UDVP) ó ex-UDVP <sup>45</sup>.

Existe una importante interrelación de las enfermedades de transmisión sexual (Infecciones de transmisión sexual, ITS) con la infección por el VIH: por una parte las ITS aumentan el riesgo de adquisición y transmisión del VIH a través de distintos mecanismos y por otra, al compartir vías de transmisión con el VIH y tener un periodo de latencia más corto, son consideradas como indicadores de cambios en los comportamientos sexuales de riesgo<sup>46</sup>.

Las ITS sometidas a vigilancia epidemiológica son la infección gonocócica, la sífilis y la sífilis congénita. Se ha podido apreciar en los últimos años un incremento en los casos de sífilis y gonococia notificados en toda España . En Mayo de 2005 se creó el grupo de trabajo sobre Infecciones de Transmisión Sexual (Grupo de Trabajo sobre ITS), compuesto inicialmente por 14 centros de diagnóstico y tratamiento de ITS pertenecientes a 7 Comunidades Autónomas. En 2007 se incorporaron al grupo de trabajo otro centro de Murcia e Instituciones Penitenciarias<sup>47</sup>.

En España de Julio de 2005 a diciembre de 2009, sobre 4.257 pacientes de distintas comunidades autónomas se realizaron 4.295 diagnósticos de ITS, 2.065 de sífilis y 2.241 de infección gonocócica (tabla 1).

Comunidad Autónoma	Centro	Nº casos	Diagnóstico	
			Sífilis	Gonococia
Andalucía	Centro ETS de Algeciras	90	42	49
	Hospital San Juan de Dios (Granada)	226	111	118
	Unidad Promoción y Apoyo a la Salud (Málaga)	140	83	60
	Centro ETS de Sevilla	874	338	550
Asturias	Centro ETS de Gijón	283	201	86
	Unidad ITS. Hospital Monte Naranco, Oviedo	120	77	44
Cataluña	Unidad de ITS. CAP Drassanes (Barcelona) *	1.092	545	547
	Unidad de ITS. CAP Tarragonès(Tarragona)	15	9	8
Madrid	Programa Prevención del Sida-ETS. Ayuntamiento Madrid	249	119	134
C. Valenciana	CIPS de Alicante	231	131	102
Murcia	Unidad ETS-sida. CS Área II Cartagena	10	6	4
	Comité de apoyo a trabajadoras del sexo (CATS) (Murcia)**	14	3	11
País Vasco	Unidad ETS-Infecciosas. Hospital Basurto (Bilbao)	559	159	412
	Unidad ETS-Microbiología. Hospital Basurto (Bilbao)	120	53	70
	Consulta de ETS. San Sebastián	85	39	46
	Instituciones Penitenciarias**	149	149	—
	TOTAL	4.257	2.065	2.241

\* sin datos en el periodo 01/07/2007 al 31/12/2007

\*\* desde 1 de enero 2007

*Tabla 1: Distribución de los casos según diagnóstico y centro participante. Diagnósticos de sífilis y gonococia en una red de centros ITS: Características clínico-epidemiológicas. Julio 2005. Julio 2005-Diciembre 2009* <sup>46</sup>.

La mayor parte de los pacientes presentaron un único diagnóstico de las ITS bajo estudio, 2.005 sífilis y 2.192 infección gonocócica, aunque a 49 casos (1,1%) se les diagnosticó sífilis e infección gonocócica al mismo tiempo (tabla 2).

Diagnósticos	Nº	Porcentaje
Sífilis primaria	676	15,9
Sífilis secundaria	807	19,0
Sífilis latente precoz	533	12,5
Infección gonocócica	2.192	51,5
Sífilis primaria + infección gonocócica	18	0,4
Sífilis secundaria + infección gonocócica	14	0,3
Sífilis latente precoz + infección gonocócica	17	0,4
<b>TOTAL</b>	<b>4.257</b>	<b>100</b>

Tabla 2: Distribución de los casos según diagnóstico. Diagnósticos de sífilis y gonococia en una red de centros ITS: Características clínico-epidemiológicas. Julio 2005. Julio 2005-Diciembre 2009 <sup>46</sup>.

El patrón sociodemográfico muestra un predominio de los hombres, con una edad media de 35,0 años (DE:10,1) para los diagnósticos de sífilis y de 31,1 años (DE:8,6) para la gonococia. Casi la mitad de los pacientes tienen estudios secundarios o superiores.

Con respecto al lugar de origen, el 66,9% de los diagnósticos de sífilis y de gonococia eran españoles; los originarios de otros países provenían principalmente de Latinoamérica (tabla 3).

Lugar de origen	Sífilis		Gonococia	
	Nº	Porcentaje	Nº	Porcentaje
España	1.369	66,3	1.518	67,7
Otras procedencias	678	32,8	709	31,6
Europa Occidental	84	4,1	102	4,6
Europa del Este	97	4,7	95	4,2
Latinoamérica	415	20,1	381	17,0
África subsahariana	21	1,0	30	1,3
Norte de África	41	2,0	72	3,2
Otros/Extranjero de procedencia desconocida	20	1,0	29	1,3
No consta información	18	0,9	14	0,6
<b>TOTAL</b>	<b>2.065</b>	<b>100</b>	<b>2.241</b>	<b>100</b>

Tabla 3: Diagnósticos de sífilis y gonococia según lugar de origen. Vigilancia epidemiológica en ITS 1995-2010. Instituto de Salud Carlos III <sup>46</sup>.

El 11,1% de los diagnósticos de sífilis primaria, el 4,3% de sífilis secundaria y el 14,4% de gonococia presentaron localización anorrectal. La localización orofaríngea estuvo presente en el 10,1% de los diagnósticos de gonococia, el 6,3% de sífilis primaria y 3,9% de la secundaria.

De los 1.694 diagnósticos de sífilis con información disponible, 318 (18,8%) presentaron además otra infección; respecto a la gonococia, 436 diagnósticos de 1.903 con información (22,9%) tuvieron otras ITS. En torno a un 10% presentaron co-infección de dos o más de ITS.

Según la situación frente al VIH de los diagnósticos de sífilis, y excluyendo 88 casos (4,3%) sin información, el 22,3% de ellos estaban coinfectados con el VIH. La co-infección gonococia/VIH fue del 10,4%, excluyendo 314 casos (14,0%) sin esta información. La mayoría de los casos coinfectados (67,9%) conocían su situación frente al VIH con anterioridad al diagnóstico de estas ITS (tabla 4).

Situación frente al VIH	Sífilis		Gonococia	
	Nº	Porcentaje	Nº	Porcentaje
VIH +	441	21,4	200	8,9
VIH -	1.536	74,4	1.727	77,1
No consta información	88	4,3	314	14,0
<b>TOTAL</b>	<b>2.065</b>	<b>100</b>	<b>2.241</b>	<b>100</b>

*Tabla 4: Diagnósticos de los casos de sífilis y gonococia según co-infección con VIH Vigilancia epidemiológica en ITS 1995-2010. Instituto de Salud Carlos III <sup>46</sup>.*

La **transmisión** entre hombres que tienen relaciones con hombres (HSH), que agrupa hombres homosexuales y bisexuales, supuso la mayoría de los diagnósticos de sífilis y gonococia. En el caso de sífilis, el 69,2% de los pacientes (1.430 de 2.065 casos) y en el caso de infección gonocócica el 53,5% de los pacientes (1.199 casos de 2.241). Destacar que un tercio de los casos de gonococia se produjeron en hombres heterosexuales. Aproximadamente un tercio de los diagnósticos de sífilis y gonococia en HSH se atribuyen a sexo oral.

Al analizar la **prevalencia de coinfección** por el VIH en estas ITS según mecanismo de transmisión se observan mayores prevalencias en HSH que en heterosexuales (tabla 5) <sup>46</sup>.

Mecanismo de transmisión	Sífilis		Gonococia	
	Nº total casos	Prevalencia VIH (%)	Nº total casos	Prevalencia VIH (%)
Hombres que tienen sexo con hombres	1.428	28,2	1.193	15,1
Hombres Heterosexuales	373	5,6	739	1,8
Mujeres Heterosexuales	233	3,9	279	1,1

*Tabla 5: Prevalencia de infección por VIH en diagnósticos de sífilis y gonococia según mecanismos de transmisión. Vigilancia epidemiológica en ITS 1995-2010. Instituto de Salud Carlos III <sup>46</sup>.*

La infección por VIH sigue siendo de gran importancia en la actualidad y es importante continuar reforzando las medidas preventivas con el objeto de frenar la propagación de esta infección que afecta de manera global a todas las especialidades de la medicina, incluyendo la estomatología.

## 1.2 ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DEL VIH:

### Estructura del VIH-1

El VIH-1 es un retrovirus que pertenece a la familia de los lentivirus. Las infecciones típicas por lentivirus muestran un curso crónico de la enfermedad, con largos periodos de latencia clínica, persistencia de la replicación viral y generalmente involucran al sistema nervioso central.

Se distinguen el VIH-1 y VIH-2, los cuales son sorprendentemente semejantes. Sin embargo, difieren con respecto al peso molecular de sus proteínas y en los genes de proteínas accesorias. El VIH-1 se introdujo en la población humana a través de los primates. El VIH-1 y VIH-2 se replican en células T CD4+ y son considerados como patogénicos en personas infectadas <sup>48</sup>. Estos grupos VIH-1 y VIH-2 provienen del cruce de distintas especies y de los mecanismos de transmisión. Los virus VIH-1 se dividen en tres grupos: M (main, principal), N y O. El grupo M se ha diversificado en al menos 9 subtipos (A, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K) y además existen muchas formas recombinantes circulantes (Circulating Recombinant Forms, CFR) que guardan estructuras genéticas de 2 o más subtipos (ejemplo: A/E=CRF01, A/G=CRF02, A/B=CRF03) (figura 9) <sup>17</sup>.

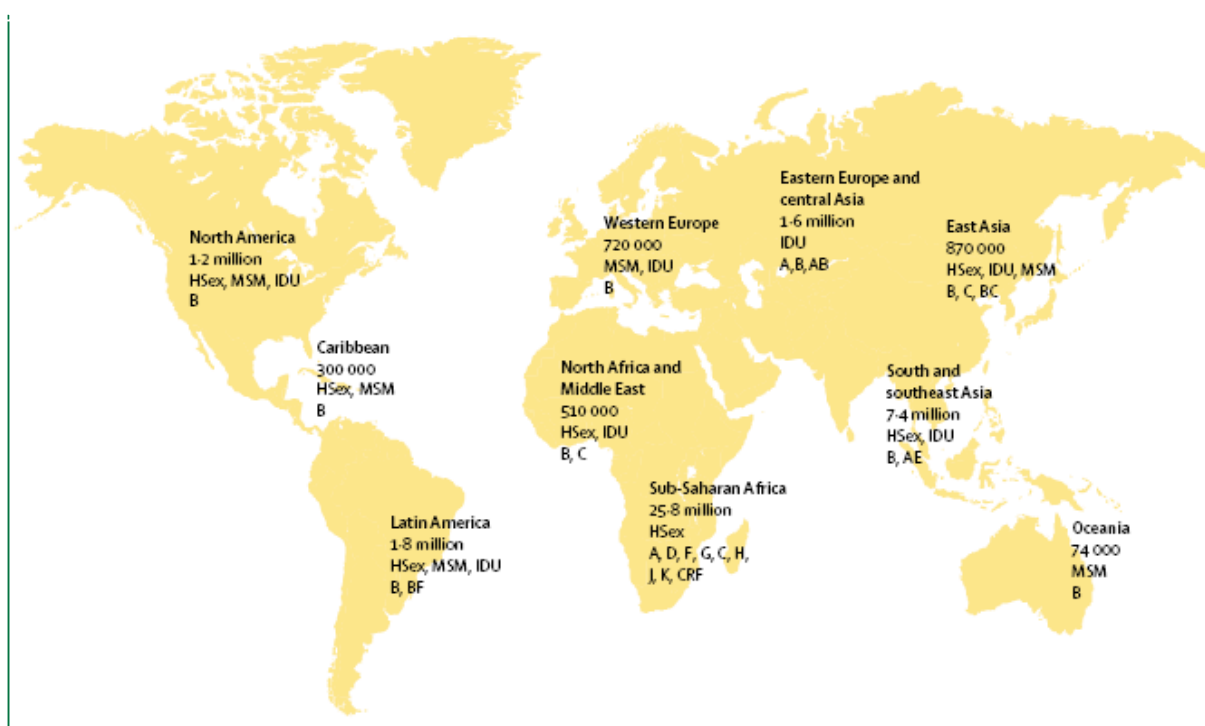


Figura 9: Distribución mundial de las infecciones por VIH-1, modos de transmisión y subtipos de VIH-1. HSex: heterosexual, HRH: relaciones homosexuales entre varones, UDVP: usuarios de drogas vía parenteral <sup>17</sup>.

La diversidad viral del VIH-1 está en continua evolución lo cual supone un auténtico reto para el desarrollo de cualquier tipo de tratamiento<sup>49</sup>.

En cuanto a la diversidad viral, el virus del subtipo C es el responsable del 55-60% de todas las infecciones del VIH a nivel mundial<sup>50</sup> (figura 10). Sin embargo, las consecuencias clínicas de los distintos subtipos puede dar lugar a nuevas recombinaciones de virus, las formas circulantes recombinadas suman el 20% de las infecciones en algunas regiones como el sudeste asiático<sup>51</sup>.

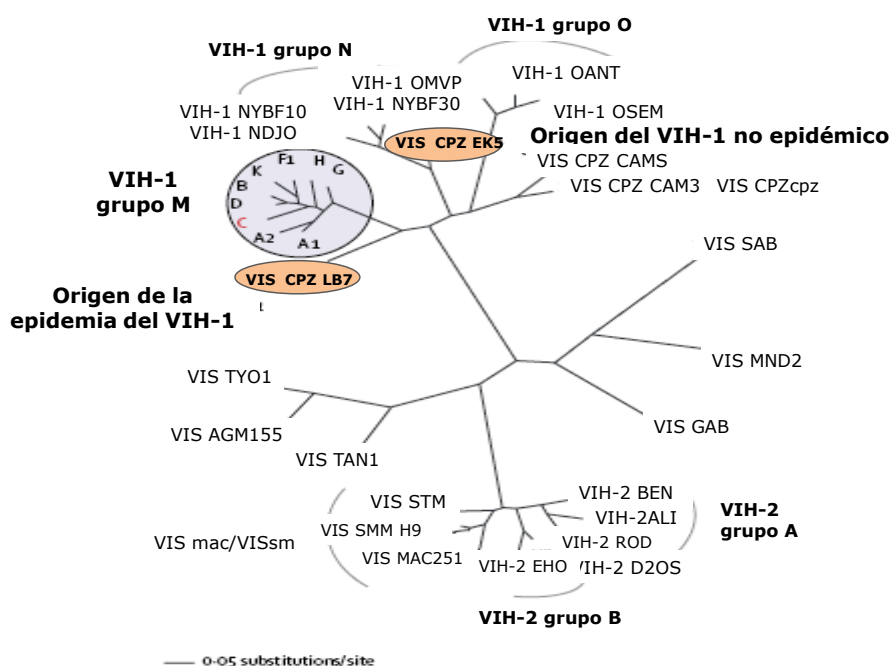


Figura 10: Relación filogenética de los lentivirus en hombres y en primates.

La pandemia del VIH-1 es debida principalmente a agregados virales pertenecientes al grupo M, siendo el subtipo C del VIH-1 el más prevalente (señalado en rojo). Señalamos el grupo VIH-1 M y las cadenas del virus de inmunodeficiencia en simios, VIS, que se han identificado en chimpancés salvajes de Camerún (VIS cpz LB7/EK5). Las secuencias de VIH-1 se agrupan muy cerca de los VIS de chimpancés (VIScpz), mientras que los VIH-2 se asemejan a los VIS de los macacos (VIS mac/VIS mangabeys) <sup>17</sup>.

## Morfología del VIH

A pesar de su pequeño tamaño a nivel genómico, 10 kilobases (Kb), y sus genes el VIH-1 aprovecha mecanismos celulares y al mismo tiempo neutraliza y se esconde de distintos componentes del sistema inmune<sup>52</sup>.

Las partículas virales del VIH-1 tienen un diámetro de 100 nanómetros (nm) y están rodeadas de una membrana lipoprotéica. Cada

partícula viral contiene 72 complejos glicoprotéicos que están integrados en la membrana bilipídica y cada uno está compuesto por trímeros de una glicoproteína externa (gp120) y una proteína transmembranal (gp41). La unión entre gp120 y gp41 es débil y puede deshacerse de manera espontánea en el ambiente local. La glicoproteína gp120 puede ser detectada en plasma<sup>53</sup> así como en tejidos linfáticos de pacientes infectados por VIH<sup>54</sup>. Durante el proceso de liberación, el virus puede incorporar de la membrana de la célula huésped a su capa lipoprotéica, diferentes proteínas celulares como antígenos de histocompatibilidad HLA clase I y II, o proteínas de adhesión como ICAM-1 que facilitan su unión a otras células diana <sup>55</sup>.

### 1.3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL:

La partícula viral contiene todo el conjunto enzimático necesario para la replicación, una transcriptasa inversa (RT), una integrasa denominada p32 y la proteasa p11 (figura 11) <sup>55</sup>.

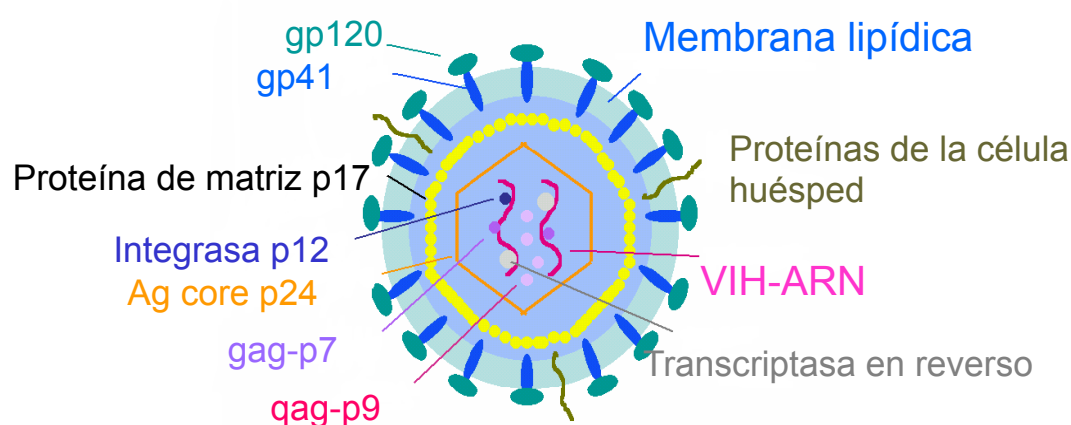


Figura 11: Estructura de un virión VIH <sup>55</sup>.



importantes codificadas por estos genes son Tat y Rev, esenciales en la replicación del virus. La proteína Tat, actúa como transactivadora de todas las proteínas. La proteína Rev, procesadora de ARN mensajero (ARNm) y su transporte selectivo en el citoplasma (tabla 6) <sup>57</sup>.

Gen	Proteína	Función
env	gp160 gp120 gp41	Precursor Proteína de la envoltura Interacción con receptores y correceptores. Fusión de membranas
gag	p55 p24 p17 p9 p6	Precursor Proteína de la nucleocápside Proteína de la matriz Ribonucleoproteínas asociadas al ARN viral.
pol	Transcriptasa inversa Integrasa Proteasa	Retrotranscripción del genoma viral Actividad RNAsa H Integración del genoma viral retrotranscrito Procesamiento de las proteínas virales que forman la estructura del virión.
tat	Tat	Transactivación
rev	Rev	Regulación del transporte y procesamiento de ARN
nef	Nef	Retrotranscripción. Infectividad
vif	Vif	Infectividad viral
vpr	Vpr	Transactivador
vpu	Vpu	Liberación de viriones
tev	Tev	Activador tat y rev

Tabla 6: Tabla de genes del VIH <sup>55</sup>.

#### **1.4 CICLO VITAL DEL VIH: mecanismo de entrada y replicación en las células de la mucosa bucal**

El VIH se caracteriza por la destrucción del sistema inmunitario. El virus entra en el organismo por tres vías principales: sexual, parenteral y vertical (transmisión madre-hijo). Independientemente de la vía de entrada, la infección por VIH origina unas manifestaciones neurológicas y tumorales debido a su doble tropismo, ya que infecta <sup>58</sup> componentes tisulares de estirpe macrofágica y además a diferencia de otros lentivirus, presenta una capacidad específica para infectar los linfocitos CD4 <sup>59</sup>.

Los dos tipos de células humanas, blanco principal de la infección por VIH, son por tanto, los linfocitos T CD4 y los macrófagos. Como consecuencia de la llegada a las células diana se ponen en marcha un conjunto de procesos que tienen como finalidad ocasionar la entrada del virus en la célula (fase temprana) y la utilización de los mecanismos bioquímicos de ella para poderse replicar y dar lugar a nuevos virus (fase tardía) <sup>60</sup>.

La expresión genética del virus se inicia con la expresión temprana de los genes reguladores y se completa con la expresión tardía de los genes estructurales. El fenómeno de latencia llega a frenar durante años la aparición de nuevos viriones <sup>61</sup>.

El genoma de los retrovirus es extremadamente compacto y por tanto requiere la cooperación y el reclutamiento de la maquinaria de la célula para realizar su ciclo biológico <sup>62</sup>.

Para que el VIH penetre en la célula se debe producir la fusión de las membranas viral y celular. La entrada del VIH-1 en la célula se produce

por la interacción del virus con al menos dos tipos de receptores. El receptor específico y común a todos los VIH-1 es una proteína que se encuentra en la superficie de las células diana y que se denomina molécula CD4. Se cree que esta molécula CD4 (no confundir con el linfocito CD4) es específica y que la afinidad de la glicoproteína viral gp120 por la molécula CD4 es mayor que la afinidad de ésta por su ligando natural, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (figura 12).

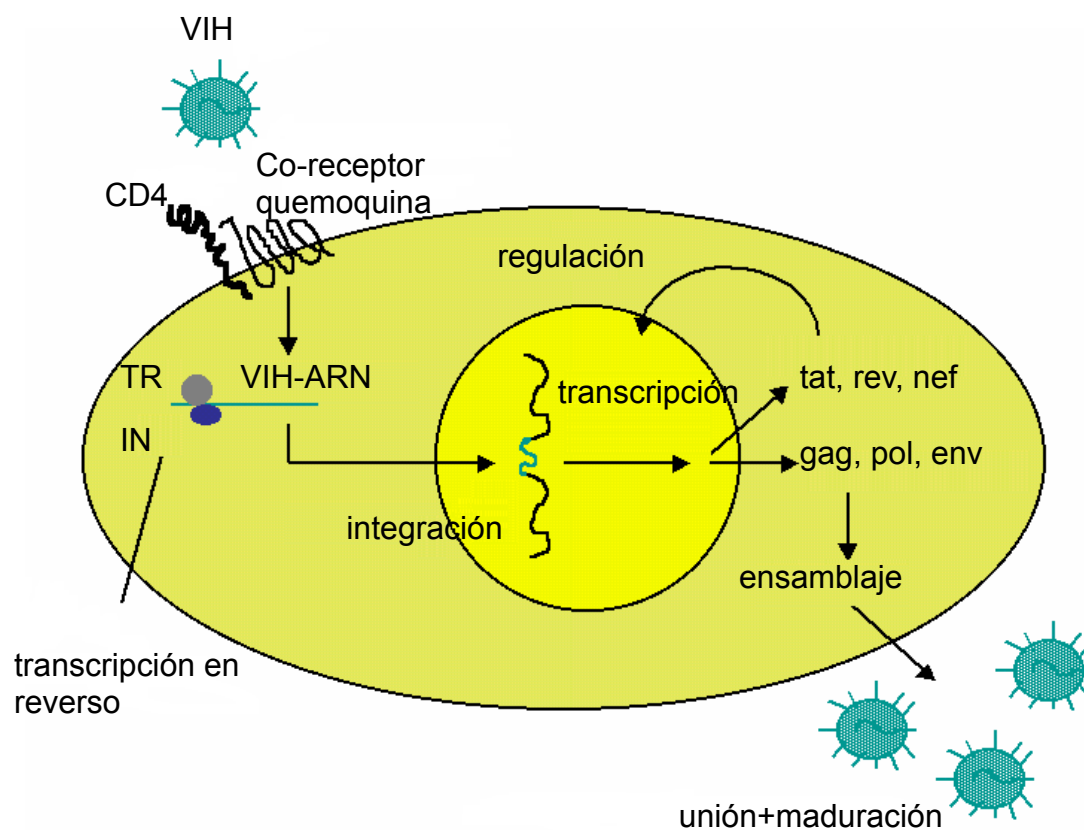


Figura 12: Ciclo vital del VIH en una célula T-CD4+.

Más recientemente se han caracterizado otros co-receptores del virus como son los receptores celulares del tipo CC o CXC de ciertas

quemoquinas. El correceptor CCR5 es fundamentalmente utilizado por las cepas del VIH con tropismo por los monocitos (monocitotrópicas) mientras que el CXCR4 es empleado por las que presentan linfocitotropismo <sup>63</sup>.

La molécula CD4 puede ser detectada sobre la superficie celular de aproximadamente el 60% de los linfocitos T, en precursores de células T dentro de la médula ósea y timo, y sobre monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas y de la microglia del sistema nervioso central.

Esta molécula CD4 se une al complejo del receptor de células T (T cell receptor, TCR) sobre las células T CD4+ y une a moléculas de HLA tipo II sobre células presentadoras de antígeno. La unión de gp120 a CD4 no sólo es crucial en el paso de entrada del virus, sino que también interfiere con las vías de transducción de señales intracelulares y promueve la apoptosis de las células T CD4+ <sup>64</sup>.

El ciclo vital del VIH es complejo. Su duración y sus resultados dependen de la activación celular y el tipo de célula diana. Al principio, el VIH-1 penetra en la célula huésped sin causar daños inmediatos letales pero genera señales intracelulares que facilitarán la replicación viral <sup>65, 66</sup>.

Las dos moléculas del gen Env del VIH-1: gp120 y gp41, forman los anclajes de la superficie del virión<sup>67</sup>. Durante el proceso de entrada, la proteína gp120 se une a la membrana celular a través del receptor CD4+. A continuación, tienen lugar una serie de interacciones entre el virus y los correceptores de quemoquinas CCR5 y CXCR4 que generan una serie de cambios irreversibles <sup>17, 68</sup>. La fusión tiene lugar minutos después mediante la formación de un poro a través del cual se libera el núcleo viral en el citoplasma de la célula huésped <sup>17, 69</sup>. Seguidamente, el genoma viral

mediante la enzima transcriptasa inversa del propio virus, se convierte en DNA proviral. En este proceso pueden generarse distintas variantes virales debido a errores en la enzima transcriptasa inversa <sup>70</sup>.

El ciclo biológico tiene 2 etapas <sup>61</sup>:

1.4.1 Fase temprana: culmina con la integración del ADN proviral en el genoma de la célula

- a. Entrada
- b. Decapsidación
- c. Retrotranscripción
- d. Integración

1.4.2 Fase tardía: transcripción del genoma viral, síntesis y ensamblaje de proteínas y generación de progenie infecciosa <sup>71</sup>

- E. Transcripción
- F. Procesamiento y transporte
- G. Traducción
- H. Ensamblaje
- I. Salida

#### **1.4.1 Fase temprana: Mecanismo de entrada del VIH en la célula huésped, interacción virus célula**

La piedra angular para la descripción de los eventos iniciales que permiten la entrada de VIH-1 fue la observación realizada por Cocchi et al., en 1995. Las células T CD8+ de pacientes infectados por VIH son capaces de suprimir la replicación viral en co-cultivos con células T CD4+ autólogas o alogénicas, y esta actividad es independiente de su actividad citotóxica <sup>72</sup>. Las quemoquinas (citoquinas quimiotácticas) y sus receptores son importantes por su papel en la promoción de la quimiotaxis de leucocitos y su actividad proinflamatoria.

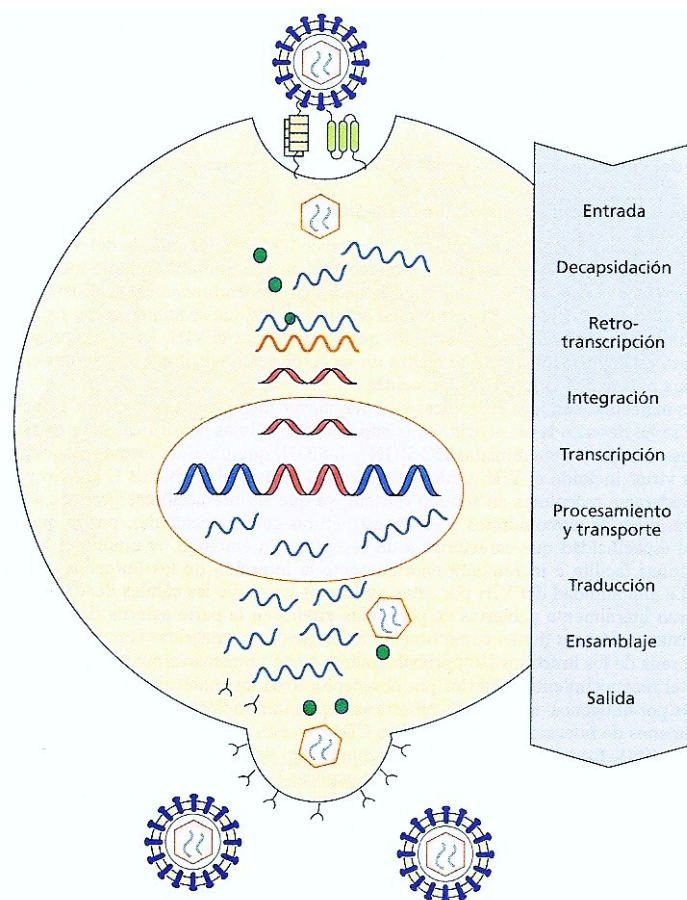


Figura 13: Ciclo biológico del VIH-1 <sup>61</sup>.

A. Entrada: Moléculas de adhesión, receptores y tropismo viral.

A.1 Moléculas de adhesión: aminoglucanos y lectinas tipo C (DC-Sign)

La entrada del VIH en la célula es un proceso secuencial que se produce mediante la interacción inespecífica y específica con distintas moléculas situadas en la membrana celular.

Los glucosaminoglucanos constituyen complejos a los que se adhieren con baja afinidad numerosos virus entre los que se encuentra el VIH.

En la superficie de las células dendríticas se encuentran otras moléculas más específicas con gran afinidad por el VIH y con mayor importancia patogénica, son unas lectinas de tipo C denominadas DC-Sign y L-Sign que unen de forma inespecífica distintos virus como el VIH y el VHC <sup>73</sup>.

Estas moléculas (glucosaminoglucanos y DC-Sign) no tienen la especificidad que caracteriza un receptor. Su interacción no se produce a través de estructuras conformacionales sino a través de residuos de carbohidratos, pero debido a la alta afinidad del VIH por estas moléculas las células dendríticas están cubiertas por partículas virales en la parte exterior de su membrana <sup>74</sup>. Tienen como función fisiológica unir integrinas como ICAM-3 en la membrana de los linfocitos como mecanismos de adhesión que permiten el posterior reconocimiento por el receptor T de las moléculas HLA de clase II ocupadas por antígenos extraños. Es en esta "sinapsis inmunológica" donde se producen los fenómenos de infección de los linfocitos CD4 que entran en contacto con células dendríticas <sup>61</sup>.

Este fenómeno es de vital importancia para explicar la propagación del VIH hacia los órganos linfoides y de las células dendríticas: gran reservorio donde se establece la infección y se transmite a los linfocitos CD4.

A.2 Receptores virales: CD4 y receptores de quemoquinas. La infección del linfocito CD4 se produce mediante la interacción con 2 tipos de receptores; por un lado la molécula CD4, proteína presente en la superficie de linfocitos T colaboradores y en células de estirpe mononuclear fagocítica. Otro receptor es la quemoquina, familia de

mediadores inmunológicos que están divididas en cuatro grupos: C, CC, CXC y CX3C.

Son moléculas de bajo peso molecular que actúan como mediadores inflamatorios en los procesos de migración y activación leucocitaria. Son moléculas producidas por monocitos, polimorfos nucleares (PMN) y linfocitos CD4 y CD8.

Las quemoquinas interactúan con distintos receptores situados en la membrana celular que se clasifican de acuerdo con su capacidad para unir las distintas familias de quemoquinas en receptores tipo C, CC, CXC y CX3C.

A.3 Correceptores del VIH y tropismo viral: existen 2 receptores fundamentales que son CCR5 y CXCR4. El primero es el principal receptor de las cepas R5 (anteriormente conocida como no sincitiales) y el receptor CXCR4 es el principal receptor de las cepas X4 (CXCL12 ó anteriormente conocidas como sincitiales). La conformación de las distintas regiones de la gp120 condiciona el tropismo de los distintos aislados virales. Así, existen virus con un tropismo estricto por CCR5 ó CXCR4 que son capaces de inhibir la infección por VIH <sup>75</sup>.

El CXCR4 es principalmente expresado sobre células T vírgenes, mientras que el CCR5 está principalmente sobre células T activadas efectoras ó memoria.

Cuando se emplean las cepas con tropismo R5 éstas están implicadas en la transmisión y en etapas tempranas de la infección. En el avance de la infección se desarrollan cepas con tropismo X4, inductores de sincitios

que están en relación con la depleción mayoritaria de linfocitos T CD4+ (figura 14)<sup>76</sup>.

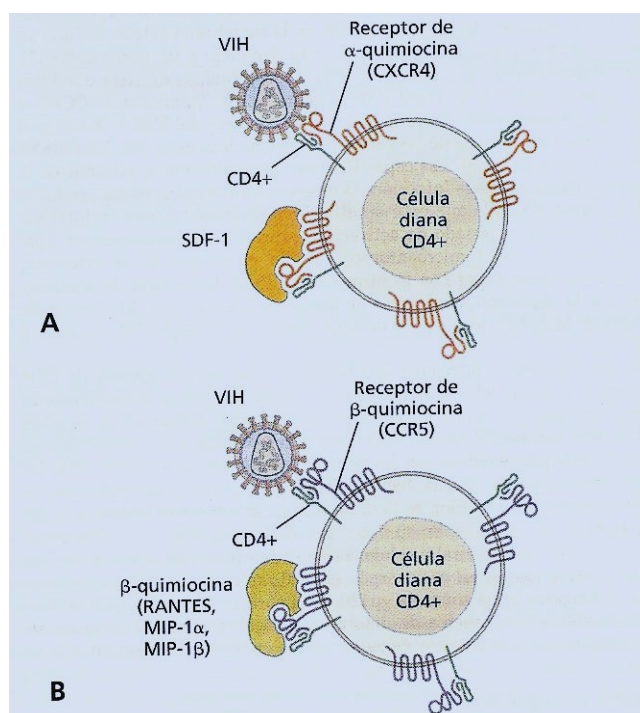


Figura 14: *Uso de co-receptores por cepas VIH-1 con tropismo por linfocitos ó por macrófagos. A) los linfocitos T CD4+, así como las líneas celulares T expresan CXCR4. La entrada de cepas VIH-1 con tropismo X4 en estas células es inhibida por SDF-1 (factor derivado de estroma) que es el único ligando natural descrito del receptor CXCR4. B) Las cepas del VIH-1 macrofagotrópicas utilizan preferentemente el correceptor CCR5 su entrada en células que expresan este receptor (macrófagos y linfocitos T) se inhibe con ligandos naturales del CCR5 como son las quemoquinas: RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . La selección entre linfocitos ó macrófagos tiene numerosas implicaciones en el desarrollo de la inmunodeficiencia (Principles of Virology, Flint SJ et al. Washington DC, ASM Press 2000:639)<sup>76</sup>.*

A.4 Mecanismo de entrada del VIH en la célula: El gen Env, codifica una proteína que se glucosila (gp160), cuya escisión da lugar a la glicoproteína superficial gp120 y la glicoproteína transmembranal gp41 <sup>61</sup>.

Una vez producido el proceso de unión de la gp160 a la molécula CD4 se producen una serie de cambios inducidos por la interacción sucesiva con sus receptores, permitiendo la interacción de la gp120 y la gp41 con el receptor y generando el llamado "péptido fusión" que induce la fusión entre la membrana plasmática y la envoltura viral <sup>77</sup>. La glicoproteína gp41 que se insertará en la membrana celular permitiendo la internalización de la nucleocápside del virus y la desencapsidación de su genoma <sup>60, 61</sup>.

B. Decapsidación: Internalización de la nucleocápside viral y la decapsidación del genoma vírico <sup>78</sup>. Este paso es inhibido por proteínas que generan así un mecanismo de protección frente a la infección por retrovirus. La más importante de estas proteínas se denomina TRIM5 $\alpha$ , esta proteína es diferente según la especie, así para infectar una especie determinada un retrovirus debe generar variantes en las proteínas de la cápside que le permitan eludir el TRIM5 $\alpha$  de esa especie.

C. Retrotranscripción: síntesis de ADN a partir de ARN viral mediante la enzima transcriptasa inversa.

En un linfocito en reposo, la retrotranscripción no finaliza la síntesis de ADN en el extremo 3' del genoma proviral, siendo necesario activar la célula infectada para que este proceso se complete <sup>79</sup>. Si esta activación no se produce, el ADN no integrado es degradado en un plazo de 3 a 15 días por las ADNasas celulares. Por tanto, existe un compartimento de ADN proviral no integrado que supone el 90% del ADN proviral existente en

linfocitos circulantes y que constituye un reservorio susceptible de integración si la célula es adecuadamente activada. Este ADN no integrado constituye un marcador de replicación viral en pacientes en tratamiento antirretroviral aunque éstos no presenten carga viral plasmática detectable.

D. Transporte e integración: El ADN proviral se acopla a una serie de factores celulares y virales (proteína Vpr) formando el complejo de preintegración. Este complejo se transporta al núcleo donde el ADN viral se integra en el genoma de la célula huésped constituyendo la forma proviral del VIH. Una célula infectada puede integrar entre 1 y 30 copias de ADN proviral (media de 3-4) <sup>80</sup>.

Tras la entrada se inicia la reproducción del virus (replicación) por transcripción en reverso o retrotranscripción mediada por la transcriptasa inversa del virión y que conduce a la formación de la primera cadena del ADN a partir del ARN viral. La segunda cadena del ADN requiere la acción de la ribonucleasa H. La doble cadena así generada es integrada por medio de la integrasa viral en el ADN de la célula, aunque parte del ADN formado puede persistir en el citoplasma de la célula sin integrarse dentro del genoma celular <sup>60, 61, 81</sup>.

La integración del ADN proviral en el genoma celular puede depender del estado de activación de la célula, pero parece ser inespecífica <sup>60</sup>.

El ADN que se introduce en el núcleo (complejo de integración) va acompañado de varias proteínas virales y alguna celular. Este transporte lo realiza la matriz viral, pero también participan la integrasa, la transcriptasa en reverso, la proteína viral Vpr y la nucleocápside. Puede ocurrir que la integración del ADN viral no suceda justo después de la

retrotranscripción y que el ADN se almacene en el citoplasma de la célula creando una latencia de preintegración que posteriormente se transporta al núcleo mediante estímulos celulares para ser integrada <sup>82</sup>.

#### **1.4.2 Fase tardía: transcripción del genoma viral, síntesis y ensamblaje de proteínas y generación de progenie infecciosa**

E. Transcripción: Los linfocitos CD4 albergan genoma viral en forma latente. A partir del estado de provirus integrado, la replicación del VIH comienza mediante la transcripción del genoma viral. Este proceso depende de factores celulares y se produce en ausencia de proteínas virales <sup>76, 83</sup>.

La replicación del VIH depende únicamente de la activación de los linfocitos infectados <sup>84</sup>. La estrategia de adaptación del VIH al entorno celular de los linfocitos CD4 se basa en que la replicación viral depende de factores celulares que son inducidos sólo cuando la célula es activada.

El linfocito CD4 representa un doble nicho en el ciclo biológico del VIH: en estado de reposo permite la latencia viral ya que carece de los factores necesarios para permitir la replicación del VIH; por el contrario, la activación celular induce en el linfocito CD4 las proteínas necesarias para iniciar la transcripción del genoma viral.

Este fenómeno de reactivación desde el estado de latencia es muy rápido y agresivo. Tras la activación linfocitaria, en dos horas se produce la síntesis de todas las proteínas virales de la célula, detectándose viriones viables entre cuatro y seis horas después de la reactivación <sup>76, 85</sup>.

F. Procesamiento y ensamblaje: El procesamiento y transporte de ARN es realizado por la proteína viral “Rev” que se encuentra localizada en el núcleo.

Una vez sintetizadas, las proteínas virales deben ser procesadas antes de ensamblarse en lo que constituirán las proteínas maduras. En este proceso participan distintas proteínas del virus, entre las que destacan *Vif*, *Vpu* y la proteasa viral (*Vpr*). El gen *Vpu* no es esencial para la replicación viral, pero en su ausencia se produce acumulación de proteínas en el citoplasma y una menor producción de viriones. Este gen aumenta la infectividad viral ya que bloquea la proteína tetherina, la cual actúa como secuestrador de viriones en la membrana celular, permitiendo la liberación de los viriones al espacio extracelular.

El producto del gen *Vif*, no es esencial para la replicación viral pero su delección disminuye la infectividad entre 100 y 1.000 veces <sup>76</sup>.

El procesamiento de gp160 en gp41 y gp120 se produce por medio de unas proteasas celulares.

La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce en el momento final del ciclo infeccioso, durante el proceso de gemación de los virus a través de la membrana celular, y permite constituir una partícula viral madura.

El ensamblaje de las partículas virales es un proceso complejo en el que participan numerosos factores celulares <sup>86</sup>.

La activación celular mediada por antígenos o citoquinas llevan a una nueva transcripción del genoma viral que supone la síntesis de ARN del virus a partir del ADN proviral integrado en la célula.

La expresión genética temprana comprende la transcripción de los genes reguladores Tat, Rev y Nef, mientras que la tardía incluye los genes estructurales y enzimáticos Gag, Pol y Env, así como los accesorios Vif, Vpr y Vpu (ver tabla 1) <sup>87</sup>.

El ensamblaje del core en la membrana celular parece comenzar con la asociación de la proteína p17 de la matriz con el dominio citoplasmático de la glicoproteína gp41. El virión maduro está compuesto por una membrana que incluye las proteínas virales gp120 y gp41 además de varias proteínas celulares, un core que contiene ARN viral, transcriptasa inversa e integrasa <sup>60</sup>.

La entrada del VIH en células T en reposo es semejante a la entrada en células T activadas, a excepción de la síntesis de ARN la cual es incompleta en este tipo de células <sup>88</sup>. La conversión de ARN viral en ADN proviral, mediado por la enzima viral transcriptasa inversa (Reverse Transcriptase, RT), ocurre en el citoplasma de la célula diana y es un paso crucial en el ciclo de replicación viral (ver figura 13 y 15).

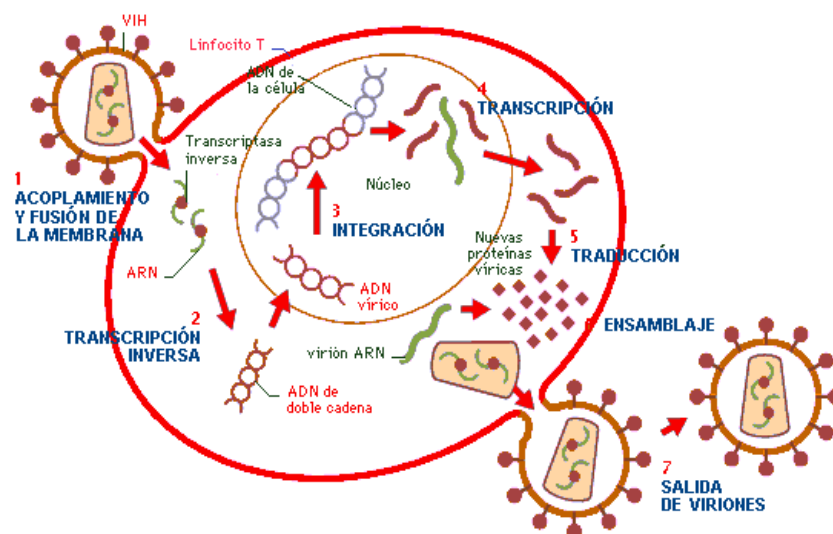


Figura 15: Ciclo de replicación del VIH.

Se piensa que la vida libre de los viriones es muy corta, aproximadamente de 0,3-0,5 días (8-12 horas) y la de un linfocito que replica activamente el VIH es de 1,2 días <sup>60, 76</sup>.

La activación celular in vitro puede ocurrir después de la estimulación con antígenos; sin embargo, la activación in vivo del sistema inmune se observa siempre después del contacto con antígenos o durante una infección oportunista.

Existe evidencia de que la glicoproteína gp120 del VIH-1 por sí misma puede activar células infectadas para incrementar la integración. Además de los monocitos, macrófagos y las células de la microglia, las células T CD4+ en reposo latentes infectadas que contienen DNA proviral no integrado, representan reservorios celulares del VIH <sup>56</sup>. La infección natural por VIH se caracteriza por ciclos continuos de replicación viral en células T CD4+ activadas. La replicación de los retrovirus es propensa a errores y está caracterizada por un alto grado de mutaciones espontáneas.

Independientemente de la ruta de transmisión, la mayoría de las nuevas infecciones se producen por variantes virales que utilizan el correceptor CCR5. Los virus con tropismo por el correceptor CXCR4 generalmente aparecen en estadios tardíos de la infección y han sido asociados a un aumento de la patogenicidad y de la progresión de la enfermedad. Otras vías de transmisión del virus incluyen: endocitosis, transcitosis y unión del virus a los receptores de manosa tipo C lectina (como DC-Sign, proteína de membrana tipo II que participa en la unión del VIH-1 a las células dendríticas y permite la infección de las células T) que se encuentran en las células dendríticas y los macrófagos <sup>89</sup>.

### **1.5 ETIOPATOGENIA DEL SIDA. La boca como fuente de infección**

Desde que se descubrió el virus del SIDA la mayoría de las investigaciones se han dirigido hacia la interacción del virus en las células mononucleares en sangre periférica (CMSP). El tejido linfoide, incluyendo aquel asociado a las mucosas, es la mayor fuente de linfocitos, macrófagos y células dendríticas en el organismo y por lo tanto un reservorio importante del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) <sup>90</sup>.

Los mecanismos de transmisión del VIH a través de la superficie mucosa, no son del todo bien conocidos. Existen distintas teorías sobre cómo puede tener lugar esta transmisión; la de mayor aceptación es aquella en la que el virus atraviesa la mucosa y es expuesto directamente a las células del tejido linfoide <sup>91</sup>. Otra hipótesis es que las células dendríticas infectadas transmiten el VIH-1 directamente a las células CD4+ situadas debajo del epitelio bucal <sup>92</sup>.

Las células epiteliales en sí participan en el proceso de infección del virus, pero el hecho de transmitir el virus estando infectadas o como meras transportadoras del mismo, aún no está determinado <sup>93</sup>.

Dezzutti et al., en 2001 realizaron estudios sobre células epiteliales del tracto urogenital y aunque estas no se infectaron por el VIH los resultados obtenidos sugieren que pueden transportar el virus a células inmunes activadas y por tanto participar en la infección por vía sexual del VIH.

Las células epiteliales del organismo (tracto orofaríngeo, urogenital, gastrointestinal) expresan una gran variedad de moléculas de adhesión y citoquinas que permiten la interacción entre estas células y las células mononucleares dendríticas así como linfocitos subyacentes, tanto intraepiteliales como de la lámina propia <sup>94</sup>. La interacción entre células epiteliales y células inmunes hace que exista una participación en la transmisión del VIH-1 <sup>95</sup>. Las células epiteliales pueden funcionar como un reservorio de VIH-1 y distintos estudios in vitro han demostrado que las células epiteliales pueden ser infectadas por el VIH-1 <sup>96</sup>. Sin embargo no se han obtenido datos concluyentes sobre la infección de células epiteliales in vivo. Las células epiteliales generalmente no expresan el receptor del VIH-1 CD4, expresan la galactosil ceramida (GalCer) que funciona como un receptor del VIH-1 <sup>97, 98</sup>. Algunas células epiteliales también expresan co-receptores del VIH-1 como CCR5 y/o CXCR4 <sup>97, 99, 100</sup>.

En 1999, en un estudio se observó que las células epiteliales del colon juegan un papel importante frente a los microorganismos y en las respuestas inflamatorias. Estas células epiteliales, presentan receptores para un gran número de citoquinas proinflamatorias como las interleuquinas IL-1 $\alpha$ , interferón IFN- $\alpha$  y el interferón IFN- $\gamma$  que pueden inducir la producción de citoquinas mediadoras de la inflamación. Aunque en un

principio las citoquinas se identificaron por su capacidad de activar y atraer células inmunes, se ha visto que tienen funciones importantes en la regulación y migración de leucocitos <sup>99</sup>.

Dentro de la familia de receptores de las quemoquinas, es importante el papel de los receptores CCR5 y CXCR4 en la infección por el VIH-1; por tanto la expresión de estos receptores por parte de las células epiteliales las implican en el mecanismo de infección del VIH-1 <sup>101</sup>.

En la actualidad no se conoce con exactitud la implicación de la mucosa bucal en el inicio de la propagación de la enfermedad.

Numerosos estudios han intentado clarificar la relación entre la mucosa y el VIH <sup>91, 102, 103, 104</sup>, ya que se ha visto que existe infección por el VIH aún en los casos en los que no exista una lesión oral que indique una rotura en la barrera epitelial a este nivel <sup>105</sup>.

Las defensas del huésped frente a la infección por VIH a nivel bucal dependen de la mucosa, las glándulas salivares, la saliva y el fluido crevicular <sup>106</sup>.

La mucosa bucal puede estar involucrada en la selección inicial del virus y ser uno de los lugares donde se lleva a cabo su replicación y donde pueden permanecer los virus resistentes al tratamiento con TARGA <sup>90</sup>.

La principal función del sistema inmune de la mucosa bucal es la de proteger los dientes, encía y mucosa de las infecciones. Este sistema inmune forma parte de un tejido linfoide especializado asociado a la mucosa (Mucosal Associated Lymphoid Tissue, MALT) <sup>107</sup>.

En la cavidad bucal, el epitelio escamoso estratificado de la mucosa, representa una barrera epitelial frente a los microorganismos. La continua descamación epitelial frena la colonización de la superficie por estos gérmenes además de los anticuerpos presentados por la mucosa y las células presentadoras de antígenos (como las células de Langerhans) las cuales son capaces de procesar antígenos en sus compartimentos intracelulares.

La cavidad bucal a diferencia de otras zonas revestidas de mucosa, como el tracto urogenital, no es un sitio frecuente de transmisión del VIH-1, debido principalmente a la escasez de células diana CD4+, a la presencia de anticuerpos anti-VIH y a factores salivares endógenos antivirales. Todos ellos en conjunto protegen los tejidos orales de la infección y reducen el riesgo de transmisión viral a través de las secreciones salivares <sup>108</sup>.

La saliva, tiene un efecto principalmente mecánico, arrastrando microorganismos de la mucosa y los dientes, aunque también tiene agentes antimicrobianos importantes. La inmunoglobulina más especializada del sistema inmune secretor es la IgA. Es el anticuerpo que está a mayor concentración en la saliva, constituyendo más del 80% del total de anticuerpos producidos en los tejidos linfoides asociados a la mucosa en seres humanos. Entre las propiedades de la IgA se han descrito: inhibición de la adherencia, la aglutinación de las bacterias y la neutralización de virus. Los anticuerpos IgA secretora (S-IgA) no sólo funcionan en las secreciones externas, sus propiedades antimicrobianas alcanzan a las células epiteliales durante el transporte de microorganismos a través del epitelio. De los subtipos de IgA, IgA-1 e IgA-2, el que predomina en saliva es el IgA-2 <sup>109</sup>.

El hecho de que prácticamente no se aíslen viriones infecciosos en la saliva, confirma la escasez de posibilidad de transmisión vía oral. Sin embargo, este hecho no indica la ausencia del virus en la cavidad bucal ni en la orofaringe; en las secreciones salivares de personas infectadas se detecta ADN proviral y células infectadas. Existen factores endógenos salivares que presentan una actividad anti-VIH, en especial una proteína mucosa que es el inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, SLPI). La actividad antiviral del SLPI viene dada por su unión a las células del huésped infectadas por el virus y no por su unión a las proteínas específicas del virus. Esto indica que su actividad frente al VIH es el factor fundamental de la actividad antiviral de la saliva e influye en la escasa transmisión oral del VIH. Estas proteínas solubles protegen a las células diana frente a la infección <sup>110</sup>.

También existen inmunoglobulinas específicas frente al virus, como son las glicoproteínas de elevado peso molecular, mucinas y trombospondina-1, las cuales lo neutralizan e inactivan, formando agregados que serán eliminados por el huésped <sup>111</sup>.

En el surco gingival, se detecta un flujo continuo de neutrófilos desde los capilares gingivales al surco gingival atraídos por los péptidos bacterianos. Existe un acúmulo de leucocitos en los tejidos gingivales procedentes del torrente sanguíneo en respuesta a la placa dental. También existe una migración de neutrófilos del torrente sanguíneo, mediante diapedesis, hacia el surco gingival, estos son funcionalmente activos y capaces de fagocitar y eliminar a los microorganismos <sup>112</sup>.

Han Y et al., han realizado estudios donde han realizado la infección de células epiteliales de glándulas salivales con viriones aislados del VIH-1 observando: la presencia del antígeno p24 en el sobrenadante con niveles

que alcanzaron el máximo entre el tercer y cuarto día desde la infección; presencia de viriones infecciosos en el sobrenadante y presencia de provirus en las células epiteliales mediante reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Todas las células epiteliales fueron positivas a la galactosilceramida (GalC) y al receptor CXCR4. Se demuestra la capacidad del VIH-1 de infectar determinando no sólo la infección de este tipo celular, sino también el papel como mediador de estas células en la infección sistémica <sup>113</sup>.

### **1.5.1 Replicación del VIH en las células de la mucosa bucal**

Desde que se descubrió el VIH, en 1985, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la patogénesis del virus en las células mononucleares en sangre periférica, pero se ha visto que el papel de la mucosa en la patogénesis del virus, es fundamental. Las mucosas, genital, rectal y otras, están implicadas en la captación del virus y se cree que la replicación sigue teniendo lugar en las mucosas en aquellos casos de virus resistentes a los fármacos antirretrovirales (TARGA) <sup>90</sup>.

Se ha visto que en estadios iniciales de infección, las células dendríticas presentan co-receptores fundamentales para la entrada del virus en la célula (CCR5, CXCR4) <sup>114, 115, 116</sup>. A estas células dendríticas se les denomina inmaduras ya que en esta etapa no expresan elevados niveles de moléculas de superficie (como CD40, CD54, CD86), los cuales son necesarios para la estimulación de las células T <sup>115, 117, 118</sup>.

Las células dendríticas maduras activan antígenos y células T-específicas, en los tejidos linfáticos <sup>119</sup>. Estas células T activadas permiten la replicación del VIH-1 y mueren por apoptosis <sup>120</sup>. Están relacionadas con la etapa inicial de la transcripción inversa del virus para lo cual se necesitan

receptores funcionales de quemoquinas en estas células dendríticas <sup>118, 121</sup>. En esta etapa, el virus tiene mucho potencial para infectar, es el primer ciclo de la replicación. Los siguientes ciclos tienen lugar en las células T <sup>122</sup>.

La replicación comienza en los nódulos linfáticos y de ahí lleva a una primera amplificación. Se produce una migración de los linfocitos T infectados y viriones al torrente sanguíneo que provoca una infección masiva de las células susceptibles. En la mucosa bucal son las células dendríticas, dando lugar a un pico de viremia característico en la infección aguda <sup>123</sup>.

Las células dendríticas pueden soportar la replicación bajo dos circunstancias: como células inmaduras <sup>115, 117, 118, 124</sup> cuando están en el proceso de captación de antígenos pero no han activado las células T; o como células maduras que están en asociación con las células T <sup>118, 125, 126, 127</sup>, en este caso la replicación tiene lugar en las células T CD3+ <sup>128</sup> ó en los sincitios de células dendríticas y células T <sup>129</sup>.

Se ha comprobado que estas células dendríticas pueden transmitir la infección del VIH-1 a las células T hasta 3 días después de la exposición al virus. El virus es capaz de producir un único ciclo de replicación debido a su forma quimérica <sup>118</sup>.

Existen tres posibilidades por las cuales las células dendríticas pueden iniciar la infección durante la asociación con las células T <sup>118</sup>:

- El virus se adhiere a la superficie de la célula dendrítica y entra en la célula T directamente;

- El virus se fusiona con la célula dendrítica pero permanece en la superficie y se transmite a la célula T mediante el contacto célula dendrítica-célula T;
- El virus sufre un ciclo de replicación en la célula dendrítica y luego infecta a la célula T.

La molécula CD40 es funcionalmente activa en las células dendríticas <sup>130</sup>, mientras que el CD40L se expresa en las células T activadas. La molécula CD40L es activa en la inducción de la replicación del virus en las células dendríticas por las células T.

Aunque la primera parte del ciclo de replicación ocurre en las células dendríticas, la mayor parte de la replicación ocurre en las células T activadas y esto es debido a que estas células tienen mayores niveles de co-receptores del VIH-1 (como CD4 y CCR5) que las células dendríticas <sup>116</sup>.

Si la transmisión oral del VIH es una realidad, se ha intentado averiguar qué estructuras epiteliales son las encargadas de esta transmisión y cuáles son las zonas anatómicas y células donde se produce la replicación del virus. Brodie et al., en un estudio sobre 70 pacientes VIH+ homosexuales y bisexuales masculinos, recogieron muestras de secreciones mucosas de la cavidad bucal y determinaron que un tercio de los pacientes presentaban muestras del VIH-ARN en cultivos del tracto orofaríngeo, independientemente de si estaban en tratamiento con fármacos antirretrovirales de gran actividad (TARGA). Además, un 25% de los cultivos VIH-ARN-positivos contenían virus con capacidad infectiva. En los pacientes bajo tratamiento, el virus encontrado en las biopsias del epitelio orofaríngeo presenta mayor diversidad que el virus presente en sangre de los mismos individuos <sup>90</sup>.

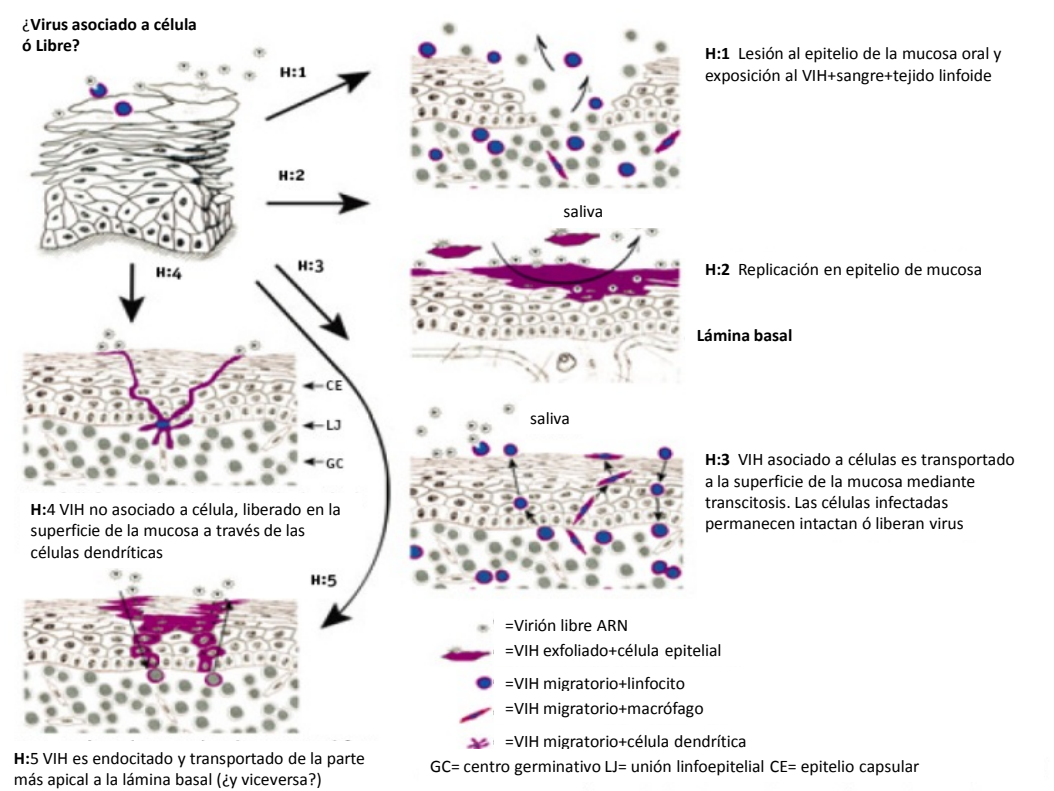


Figura 16: Hipótesis de la expresión oral del VIH <sup>90</sup>.

En estos estudios, se concluyó que en las células de la mucosa amigdalina, rica en tejido linfoide, tiene lugar la transcitosis de células ARN-positivas y es éste al menos uno de los mecanismos que explica los elevados niveles del VIH en los fluidos mucosos y en el tejido linfoide <sup>90</sup>.

En el epitelio de la amígdala, se encontraron células dendríticas ARN-positivas que expresaban la unión al VIH mediante la lectina (DC-Sign), pero no se sabe si en estas células se replica el VIH o sólo se unen al virus mediante receptores celulares de superficie actuando como meros transportadores del virus, llevándolo a órganos linfáticos donde hay un gran número de células permisivas al virus <sup>90</sup>.

Otros autores, investigaron las interacciones moleculares que permiten la unión de viriones de VIH a la superficie epitelial de la mucosa amigdalina y palatina en humanos. Estudiaron la distribución del principal receptor del VIH; la molécula de superficie CD4, y los receptores alternativos como el proteoglicano heparan sulfato (HSPG), la galactosil ceramida (GalCer) y los co-receptores CXCR4 Y CCR5 <sup>131</sup>.

El epitelio amigdalino está compuesto por epitelio escamoso estratificado, que a diferencia de la mucosa bucal presenta en su superficie aberturas que albergan las criptas amigdalinas. Estas criptas están tapizadas en su superficie por un epitelio plano reticular, formado sólo por una capa epitelial que separa el lumen de la cripta de los linfocitos intraepiteliales. Esta composición celular, donde las células epiteliales, los linfocitos y las células del estroma están en proximidad, se asocia con el mecanismo de presentación de antígenos que tiene lugar en el epitelio de la cavidad bucal <sup>132, 133</sup>.

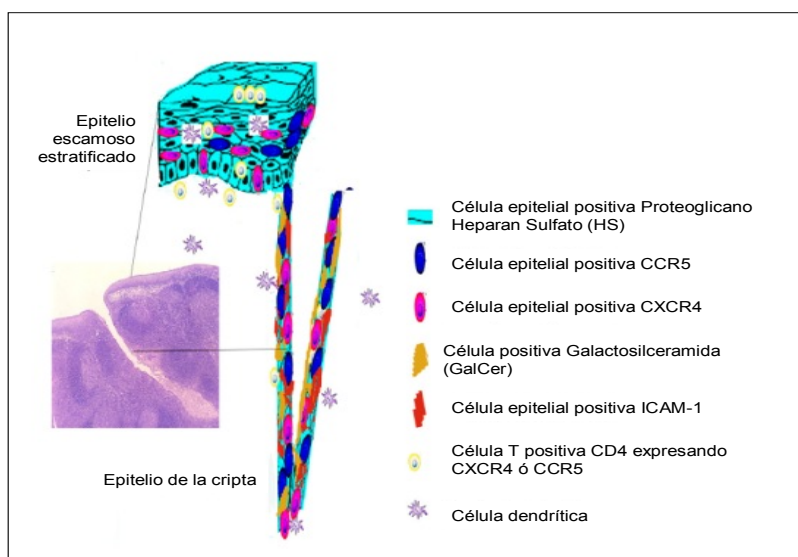


Figura 17: Representación de las macromoléculas de las células de superficie implicadas en la unión y captación del VIH. En la izquierda se muestra la magnificación fotomicrográfrica de una sección cortada de la

*superficie externa de la amígdala palatina (hematosilina-eosina). La mayoría del epitelio de la amígdala es escamoso estratificado, pero en la cripta cambia a epitelio reticulado* <sup>132</sup>.

Se han descrito muchos mecanismos a nivel de la mucosa bucal de protección frente al VIH <sup>134, 135</sup>, pero si la barrera epitelial es dañada o si los viriones invaden la capa epitelial, se produce la unión a alguno de los receptores del VIH en las células diana, CD4, CXCR5, GalCer, CCR4 <sup>136</sup>.

Diversos estudios sobre el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) han demostrado que la inoculación oral atraumática del VIS puede provocar la infección por VIS en epitelio amigdalino, siendo éste el primer lugar de infección, seguida de una infección sistémica por VIS <sup>137, 138, 139</sup>. El análisis de tejidos de pacientes infectados por VIH, implica a las amígdalas palatinas como reservorio y lugar de replicación del VIH <sup>140, 141</sup>.

Los bajos niveles de expresión de moléculas CD4 en células epiteliales de la amígdala infectadas por el VIH o la inexistencia de ellos, ha provocado la búsqueda de receptores alternativos en estas células y se ha comprobado que expresan los co-receptores CCR5, CXCR4, Heparan Sulfato (HS) y galactosil ceramida (GalCer) <sup>91, 100</sup>. Éstos han sido identificados como macromoléculas de superficie, responsables de la infección por VIH ante la ausencia de identificación de la molécula CD4 por parte de la proteína gp120 del virus <sup>142</sup>.

Por tanto, aseguran que la carga viral plasmática no es el único parámetro a tener en cuenta para determinar el potencial de transmisión del virus; individuos con carga viral indetectable, pueden tener elevadas concentraciones de virus VIH-ARN potencialmente infecciosos en la superficies mucosas <sup>90</sup>.

La concentración del VIH-1 en saliva suele ser menor que en sangre y que en secreciones genitales <sup>143</sup>. Las propiedades antivirales de la saliva limitan la infectividad del VIH en la mucosa bucal <sup>144, 145</sup>. In vitro, se ha encontrado que la infección de los linfocitos disminuye gracias a la actuación de distintos mecanismos como son <sup>108</sup>: anticuerpos virales específicos <sup>146</sup>; agregación de partículas virales por las mucinas salivares <sup>147</sup> y la actividad de proteínas endógenas inhibitorias <sup>148</sup>.

La infección oral del virus también se ha comprobado a través de estudios del virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) en los que partículas víricas libres son capaces de generar infecciones sistémicas en macacos cuando se introduce vía oral de manera no traumática <sup>139</sup>.

Para determinar los mecanismos moleculares por los que las células de la mucosa bucal contribuyen a la infección del VIH-1, se ha estudiado la capacidad de los queratinocitos orales en seres humanos para ser infectados a través de las moléculas de superficie CXCR4, la CCR5 y cadenas del VIH-1 in vitro. También se ha comprobado si los queratinocitos transfieren los viriones-VIH a las células T de los tejidos linfoides sin estar infectados <sup>103</sup>.

En estudios realizados sobre mucosa bucal de pacientes infectados por el VIH-1 se han observado señales de hibridación positivas en células de la mucosa bucal no quedando muy bien definidas la morfología de estas células, siendo compatibles con las células de Langerhans. Confirmando así la capacidad replicativa del virus en mucosa bucal <sup>149</sup>.

## **1.6 VIH y el sistema inmune: células presentadoras de antígeno en la patogénesis de la infección por VIH.**

### **Los tejidos linfáticos como sitios de replicación viral.**

Los viriones son atrapados en la red de las células dendríticas foliculares (Follicular Dendritic Cell, FDC) dentro de los tejidos linfoides. Los macrófagos, las células T CD4+ activadas y en reposo son los principales blancos de la infección <sup>150</sup>.

Durante la fase inicial de la infección por VIH-1 existe una gran liberación del virus hacia el plasma, seguido de una disminución relativa de la viremia durante la cual, se genera una fuerte respuesta de células T citotóxicas específicas de VIH-1, lo que coincide con la supresión temprana de la viremia en la mayoría de los pacientes. La replicación viral dentro de los tejidos linfoides es extensa en los estadios tempranos de la enfermedad <sup>141, 151</sup>.

Las células dendríticas se encargan del proceso y presentación de antígenos extraños y como otros macrófagos titulares, producen citoquinas y factores de crecimiento que facilitan una respuesta inmunitaria eficaz en linfocitos T y B. Son esenciales en la propagación del VIH a los linfocitos CD4<sup>152</sup>.

Actualmente algunos autores, han demostrado que la infección de macrófagos "in vitro" produce una serie de fenómenos importantes para la patogenia de la infección por VIH. Sin embargo, la infección "in vivo" de estos tipos celulares en una porción relevante no ha sido demostrada <sup>153</sup>.

Los linfocitos CD4 son la principal diana del VIH, esto hace que sea un lentivirus atípico. Para analizar la inmunopatología del Sida, es necesario situar la relación entre virus y huésped en un doble contexto <sup>154</sup>:

- Interacción virus-célula: mecanismo de adaptación del virus a su célula diana, mecanismos celulares de protección frente a la infección y cómo el VIH es capaz de sobrepasarlos.
- Interacción poblaciones virales-sistema inmunitario: el VIH debe ser capaz de adaptarse mediante mecanismos de escape que permiten eludir la respuesta inmunológica.

### CICLO DE INFECCIÓN DEL VIH IN VIVO

Mediante las técnicas de biología molecular, se demostró que la replicación viral es detectable en todos los estadios de la enfermedad. En un sujeto infectado, diariamente se producen  $10^9$  y  $10^{10}$  partículas virales, siendo la vida media de un virión de 0,3 días y la de un linfocito infectado que replica activamente el VIH de 1,2 días <sup>155</sup>.

## **2. ESTRUCTURA DEL EPITELIO BUCAL**

Sabemos que la mucosa bucal es muchas veces la primera zona de contacto de agentes patógenos con nuestro organismo y de ahí la importancia de la barrera protectora que existe a este nivel. Es importante conocer los mecanismos de defensa de la mucosa bucal para entender las vías de entrada de ciertos patógenos, como el virus del sida, su mecanismo de acción a este nivel, así como su posterior propagación al resto del organismo.

La mucosa bucal carece de capa muscular. En muchas regiones (como mejillas, labios y zonas del paladar duro) existe un tejido conectivo glandular que contiene los vasos y nervios que la irrigan e inervan y que separa la mucosa bucal del hueso o músculo subyacente. Existen zonas de la cavidad bucal como la encía queratinizada y paladar duro donde la mucosa está unida directamente al periostio del hueso subyacente, sin que exista submucosa; es lo que se conoce como mucoperiostio <sup>156</sup>.

En la mucosa bucal destacaremos la presencia de una barrera epitelial compuesta por un epitelio escamoso estratificado, el cual forman células íntimamente unidas unas a otras y distribuidas en capas o estratos distintos. Estas células sufren continuamente un proceso de renovación de las capas más profundas del epitelio hacia las más superficiales y esto hace que se mantenga la integridad celular <sup>157</sup>.

Los principales componentes tisulares de la mucosa bucal son el epitelio escamoso estratificado, conocido como el epitelio bucal y una capa de tejido conectivo subyacente llamado lámina propia o corion. La interfase entre epitelio y tejido conectivo es irregular, formándose unas proyecciones de tejido conectivo hacia el epitelio conocidas como papilas de tejido conectivo.

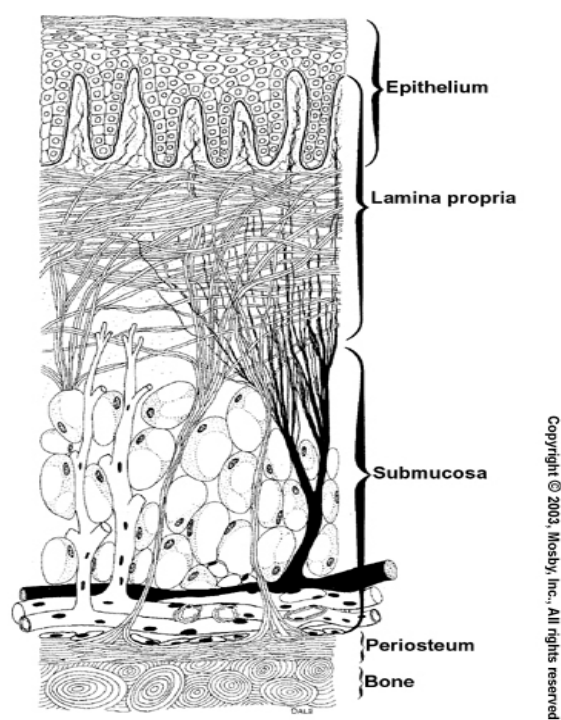
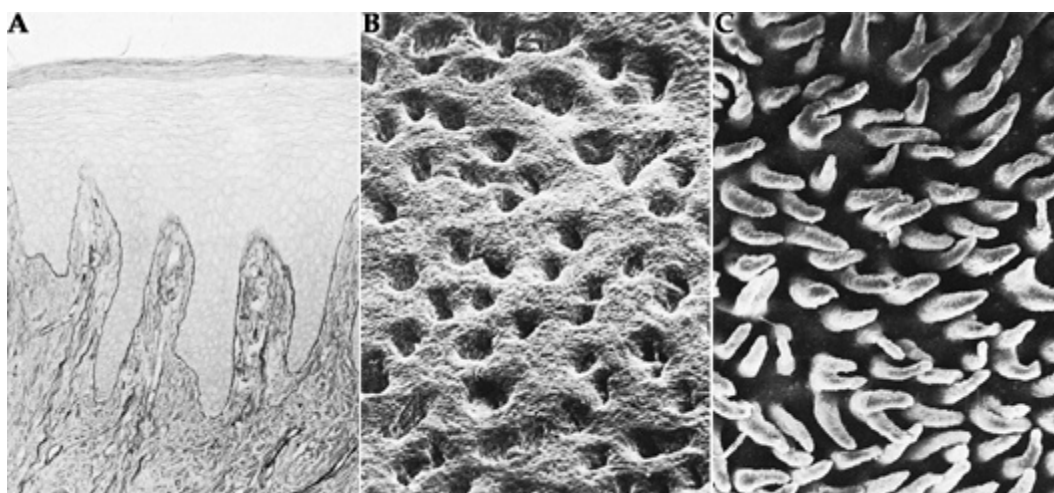


Figura 18: Capas de la mucosa bucal <sup>156</sup>.



Copyright © 2003, Mosby, Inc., All rights reserved.

Figura 19: Invaginaciones del epitelio al tejido conectivo: A- epitelio gingival con tinción de PAS; B y C- microscópico electrónico de barrido, imagen de la interfase del epitelio bucal con las invaginaciones del tejido conectivo (B) y las prolongaciones del tejido conectivo sobre el epitelio bucal (C) <sup>156</sup>.

Debido a estas invaginaciones del epitelio hacia el tejido conectivo se forman nódulos linfoides que tienen una vascularización muy importante, constituyendo una zona muy rica en linfocitos y células plasmáticas, las cuales tienen un papel primordial en la actividad de la respuesta inmune. En las zonas posteriores de la mucosa es donde existe mayor cantidad de tejido linfoide <sup>156</sup>.

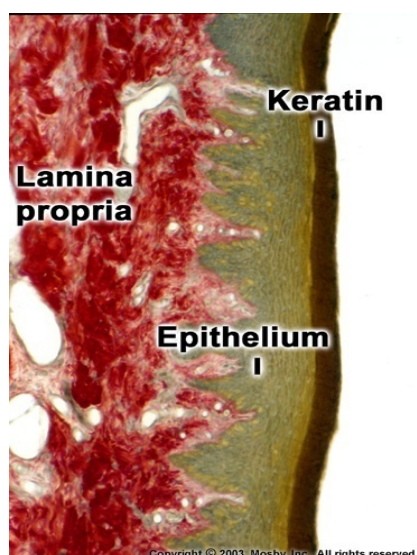


Figura 20: Capas de la mucosa en la región de encía insertada (presenta capa de queratina) <sup>156</sup>.

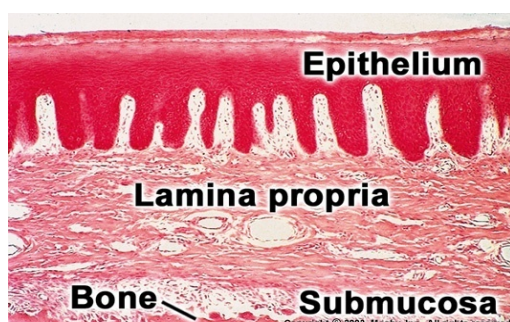


Figura 21: Capas de la mucosa masticatoria que recubre el paladar <sup>156</sup>.

El epitelio bucal, está formado por células íntimamente unidas, las cuales están divididas en 2 poblaciones distintas <sup>156</sup>:

- población progenitora, encargadas de dividirse y proporcionar nuevas células. Esto suele ocurrir en grupos y generalmente tiene lugar en la zona más profunda de la capa epitelial; y
- población de maduración, cuyas células están sufriendo continuamente un proceso de maduración o diferenciación para formar una capa superficial protectora; la cual puede seguir dos patrones: queratinización o no queratinización.

Las capas principales de un epitelio queratinizado son: capa basal ó estrato proliferativo (formado por células basales capaces de dividirse); por encima de esta capa se encuentra una capa de células que se conoce como estrato espinoso, estas dos capas constituyen dos tercios del grosor total del epitelio. Por encima se encuentra la capa granular y los gránulos se conocen con el nombre de gránulos de queratohialina. La capa más superficial está compuesta por células muy aplanadas denominadas escamas que se caracterizan por la ausencia de núcleo; esta capa se conoce con el nombre de estrato córneo. No es usual que la mucosa masticatoria presente una variante de la queratinización que se conoce con el nombre de paraqueratinización, en la que la capa superficial tiene los núcleos picnóticos (disminuidos de tamaño) <sup>156</sup>.

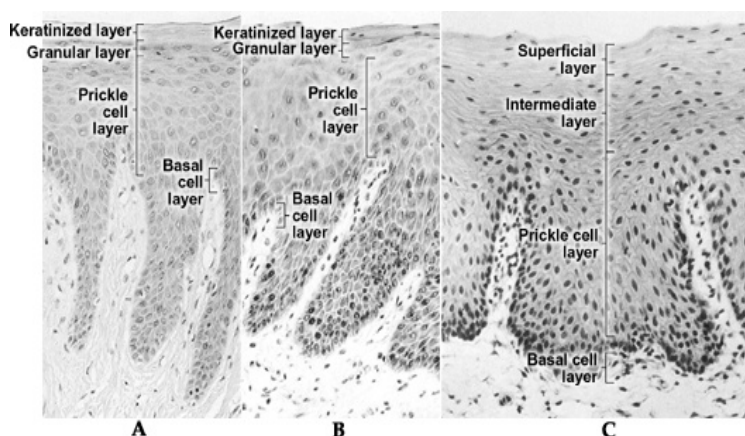
Cuando el epitelio es no queratinizado, como es el caso de la mucosa de revestimiento, la capa basal y el estrato espinoso son similares al del epitelio queratinizado; sin embargo, se caracteriza por la ausencia

de capa granular y por la presencia en la capa superficial de núcleos que generalmente están más engrosados de lo normal <sup>156</sup>.

En la cavidad bucal nos encontramos con distintos tipos de epitelio según la zona anatómica; así, podemos distinguir principalmente tres tipos de mucosa <sup>156</sup>:

- Mucosa masticatoria: encía adherida, paladar duro.
- Mucosa de revestimiento: mucosa yugal, mucosa alveolar, suelo de boca, zona ventral de la lengua, zona labial interna. Se trata de un epitelio más grueso que el de la mucosa masticatoria.
- Mucosa especializada: zona dorsal de la lengua (la cual es completamente distinta al del resto de la cavidad bucal ya que posee distintos tipos de papilas linguales y tiene gran cantidad de nódulos de tejido linfoide) y mucosa labial.

El epitelio de la mucosa masticatoria es generalmente un epitelio ortoqueratinizado (aproximadamente de 250µm de grosor a nivel de la encía), en el cual se distinguen los siguientes estratos: capa queratinizada, capa granular, epitelio espinoso estratificado y membrana basal <sup>156</sup>.



Copyright © 2003, Mosby, Inc., All rights reserved.

Figura 22: Secciones histológicas de los distintos tipos de maduración del epitelio humano bucal: A- ortoqueratinización en encía, B- paraqueratinización en encía, C- epitelio bucal No queratinizado.

El papel de la respuesta inmune de la mucosa viene determinado principalmente por las células de langerhans y las células inflamatorias.

Las células de langerhans de la mucosa bucal, se generan en la médula ósea pero se localizan principalmente en la parte alta del epitelio y se caracterizan por la presencia de un gránulo alargado que se conoce con el nombre de gránulo de Birbeck. Son responsables de la captación de antígenos a nivel de la superficie epitelial mediante macropinocitosis y mediante una serie de receptores celulares de superficie. Tras el contacto con el antígeno abandonan el epitelio van a los ganglios linfáticos donde se diferencian en células dendríticas maduras, las cuales activarán a linfocitos T inmaduros. <sup>156</sup>.

Las células inflamatorias, se encuentran en la capa nucleada, no se reproducen en el epitelio a diferencia de otros queratinocitos. Los más frecuentes son los linfocitos, aunque también se pueden encontrar con relativa frecuencia mastocitos y leucocitos <sup>156</sup>.

### 3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN POR VIH

Respuesta Humoral	Respuesta Celular
<b>Específica (antigénica)</b>	<b>Específica (restringida por el sistema HLA)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticuerpos frente a proteínas estructurales y reguladoras</li> <li>• Anticuerpos neutralizantes (gp120, gp41)</li> <li>• Anticuerpos facilitadores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respuesta citotóxica CD8 (CTL)</li> <li>• Respuesta <i>helper</i> CD4</li> </ul>
<b>Inespecífica</b>	<b>Inespecífica</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Complemento</li> <li>• Interferones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)</li> <li>• Actividad citotóxica NK</li> <li>• Factores solubles: quemoquinas, citoquinas, otras. Actividad CAF</li> </ul>

Tabla 7: Respuesta inmunitaria en el paciente seropositivo <sup>122</sup>.

#### 3.1 RESPUESTA HUMORAL

**3.1.1 Inmunidad específica:** La infección por VIH induce una respuesta de anticuerpos frente a todas las proteínas reguladoras y estructurales del VIH<sup>158</sup>.

Algunos anticuerpos están especialmente dirigidos frente a gp41 y gp120 y tienen capacidad neutralizante "in vitro", aunque son muy escasos<sup>159, 160</sup>.

**3.1.2 Inmunidad inespecífica:** Existen muchos factores solubles activos frente a la infección por el VIH. Los virus en general y el VIH son sensibles a la inhibición por complemento.

Los interferones también tienen actividad antiviral frente al VIH, pero estos mecanismos no son suficientes para permitir un control completo de la replicación viral.

## **3.2 RESPUESTA CELULAR**

En la infección por VIH se produce una respuesta celular antiviral en distintas poblaciones: linfocitos CD4 colaboradores, linfocitos CD8 citotóxicos (CTL) y células NK.

Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que la respuesta CD4 y CD8 constituye probablemente el mecanismo más importante de protección frente al VIH<sup>161</sup>.

### **3.2.1 Inmunidad específica:**

En el estudio de la respuesta citotóxica "in vitro" (CTL) se ha demostrado que en los pacientes seropositivos existe una expansión de linfocitos CD8 con actividad citotóxica <sup>162</sup>.

Existe también una respuesta CD4 y CD8 anti-VIH en algunos pacientes en el contexto de la reconstitución inmune obtenida tras el tratamiento antirretroviral <sup>163</sup>.

La respuesta celular específica no se limita a los linfocitos CD8, sino que se ha demostrado que una respuesta CD4 específica es importante

por la puesta en marcha de una respuesta inmune eficaz frente al VIH y por su actividad antiviral <sup>164</sup>.

Todos los datos sugieren que las respuestas celulares helper y citotóxica son esenciales para contener la replicación viral en estadios precoces de la enfermedad en que el sistema inmune permanece relativamente indemne <sup>165, 166</sup>.

### **3.2.2 Inmunidad inespecífica:**

Estos mecanismos de inmunidad celular no están restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad ó sistema HLA (Human Leukocyte Antigen, HLA), conjunto de genes implicados en el reconocimiento inmunológico y señalización entre células del sistema inmunitario. Se ha descrito la existencia de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC), una actividad citotóxica natural (NK) frente al VIH en pacientes seropositivos.

Tanto en la respuesta celular específica (CTL) como en la no restringida por el sistema HLA (ADCC y NK), la actividad antiviral es más intensa en los estadios asintomáticos de la infección y se ha postulado que el mantenimiento de la respuesta citotóxica en niveles elevados sería un factor de buen pronóstico en la evolución a Sida.

Factores solubles: Se sabe que los linfocitos CD8 de pacientes seropositivos inhiben la replicación del VIH y que esta actividad supresora corresponde a factores solubles presentes en el sobrenadante generado a partir de linfocitos CD8 activados <sup>167</sup>, serían quemoquinas CC y CXC como: RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y SDF-1/CXCL12 <sup>168, 169</sup>.

Las células dendríticas en los órganos linfoides producen SDF-1 y regulan negativamente el receptor CXCR4 <sup>170</sup>. Esto explica que las variantes R5 se propagan en la primoinfección y en la fase crónica de la enfermedad.

Otros autores postulan la existencia de otros factores supresores que no son las quemoquinas sino los denominados CAF (factores producidos por linfocitos activados) <sup>171</sup>. Estos factores son  $\alpha$ -defensinas, proteínas producidas por células polinucleares y por linfocitos T.

#### **4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL VIH-1**

No existe ninguna manifestación clínica que sea específica de la infección VIH o del SIDA y, aunque la presencia de alguna de ellas pueda sugerir la presencia de la infección, no es posible establecer un diagnóstico clínico de seguridad de la enfermedad por lo que éste solo se puede establecer de un modo definitivo apoyándose en técnicas de laboratorio. Por medio de ellas es posible detectar al propio virus o algunos de sus componentes, como proteínas y ácidos nucleicos (mediante PCR: reacción en cadena de polimerasa, cultivos víricos, etc...) <sup>172</sup>.

La práctica habitual es detectar los anticuerpos específicos que el organismo produce como respuesta a la presencia del virus (métodos indirectos) <sup>172</sup>.

Por lo tanto, en la mayoría de los casos la seropositividad frente al VIH se detecta a partir de una extracción sanguínea del sujeto con la que se realiza la determinación de anticuerpos anti-VIH mediante técnicas serológicas <sup>172</sup>.

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, en las que la detección de anticuerpos refleja usualmente una exposición previa al agente patógeno y su erradicación en un tiempo pasado; en la infección VIH/SIDA la presencia de anticuerpos expresa un estado de portador del virus y por consiguiente la posibilidad de transmitirlo a otros, aún en ausencia de manifestaciones clínicas de la infección <sup>172</sup>.

#### **4.1 Pruebas de cribado y confirmación**

La búsqueda de anticuerpos específicos frente al VIH-1 es lo más empleado actualmente para detectar a las personas infectadas por este virus. Lo más frecuente es el empleo del suero o del plasma obtenido de una extracción sanguínea del sujeto; pero también pueden emplearse diferentes líquidos orgánicos, especialmente orina y saliva, con los que también pueden realizarse pruebas confirmatorias <sup>172</sup>.

##### **4.1.1 Pruebas de cribado ó screening**

Para la detección de anticuerpos las más empleadas son pruebas de aglutinación: ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay) ó análisis inmunoenzimático (EIA), para las pruebas masivas de cribado o en los inmunoblots para las pruebas de confirmación <sup>172</sup>.

Habitualmente, si se obtienen resultados positivos, se utiliza al menos otra técnica ELISA para confirmar la positividad, a ser posible con un diseño de reconocimiento de anticuerpos diferente. Cuando la positividad se repite con un segundo EIA se confirman los resultados con otras técnicas de alta especificidad, usualmente con técnicas de inmunoblot ó inmunofluorescencia indirecta (IFI) <sup>172</sup>.

#### 4.1.2 Pruebas de confirmación

Tienen como objetivo verificar que los resultados obtenidos con las pruebas de cribado son correctos <sup>172</sup>.

La principal prueba confirmatoria es el **Western Blot** (WB), cuya base principal es una discriminación de los antígenos del VIH frente a los que se dirigen los anticuerpos presentes en la muestra. Por lo general se considera una prueba sensible para las proteínas del core y algo menos para las de la envoltura.

Mediante este test se confirman las reacciones a las proteínas gp160, gp120 del VIH-1 en fluidos orales; sin embargo no se observan ningún otro tipo de proteínas específicas del virus <sup>173</sup>.

#### 4.2 Detección de la proteína p24

La detección de la proteína p24, antígeno del VIH-1, generalmente, es un marcador directo de la presencia del virus en el organismo a diferencia de las pruebas de detección de anticuerpos previamente vistas. Aunque teóricamente el antígeno debería detectarse en cualquier fase de la infección, la presencia de anticuerpos anti-p24 con los que forma inmunocomplejos suele enmascararlo, por lo que su utilidad ha quedado reducida a unas cuantas situaciones entre las que destaca la detección de la infección antes de la seroconversión <sup>172</sup>.

En general solo es posible detectar antígeno p24 entre el 10-25% de los pacientes seropositivos asintomáticos y en el 70% de los pacientes con SIDA. En la primoinfección no se detecta en más del 25% de los casos <sup>172</sup>.

En la actualidad el empleo de la carga viral como marcador de progresión y control de los tratamientos ha relegado la utilización de la

detección del antígeno p24 al diagnóstico precoz de la infección VIH y en algunos casos al reconocimiento de la replicación viral en cultivos celulares <sup>172</sup>.

#### **4.3 Pruebas de diagnóstico indirecto. Detección del VIH en fluidos orales: anticuerpos y proteínas salivares específicos del VIH-1**

Especial atención se ha dado en los últimos años a la importancia de los fluidos orales para el diagnóstico de la infección por VIH <sup>173</sup>.

Archibal et al. fueron los primeros en publicar la presencia de anticuerpos VIH en fluidos orales <sup>174, 175</sup>.

Malamud y Friedman, en estudios realizados entre 1986-1991, afirmaron la relación existente entre el test + de suero y de saliva para la detección de Ac-VIH en un porcentaje que oscila entre el 70-100%. Habrá que tener en cuenta el tipo de muestra, el volumen de Ig G, cómo se manipula la muestra y el tipo de método diagnóstico empleado <sup>176</sup>.

Actualmente se tiende a tomar muestras de fluido crevicular y transudados mucosos ya que aquí existen mayores niveles de Ig G en saliva (siendo estos anticuerpos los que están relacionados con la primera respuesta inmune humoral) <sup>177, 178</sup>.

La concentración de Ig G en transudados mucosos es menor que en plasma pero mayor que en saliva <sup>179</sup>.

Gaudette et al. demostraron que algunos conservantes de determinados dispositivos inhiben el crecimiento microbiano y mantienen

niveles de IgG durante un tiempo, y cuando no existen estos conservantes existe una disminución de los niveles de Ig G en la muestra recolectada <sup>180</sup>.

Entre los tipos de análisis empleados en muestras de saliva y en plasma cabe destacar: EIA (enzimo-inmuno análisis convencional, explicado anteriormente), GACRIA (inmunoanálisis absorbente ligado a enzima), GACELISA, este último optimizado para la detección del VIH en muestras con un bajo contenido de inmunoglobulinas <sup>181</sup>.

Gallo et al. han demostrado que el procedimiento Western Blot, tiene una sensibilidad y especificidad similar a las obtenidas con muestras de plasma para encontrar anticuerpos anti-VIH. Dentro de las ventajas de ésta técnica destaca: que es menos invasiva, no necesita personal de laboratorio, el propio paciente puede recolectar la muestra, no se enfrenta al miedo de un análisis de sangre, disminuye el riesgo del personal sanitario al manipular la muestra, ya que se ha comprobado que la saliva y los fluidos orales poseen menos viriones con capacidad infectiva y pueden inactivarlo <sup>173, 182</sup>.

Estas técnicas nos demuestran la presencia del VIH en saliva de personas infectadas. Shugars y Wahl en 1998, detectaron niveles de ARN viral en el 56% de las muestras de saliva y en el 100% de las muestras de plasma de pacientes seropositivos, incluso en 5 casos el nivel de ARN viral de las muestras de saliva era muy superior al nivel encontrado en el plasma de esos pacientes. Sin embargo, la cavidad bucal es raramente un sitio donde se produzca transmisión del VIH <sup>108, 183</sup>. Esto es debido principalmente a la presencia de una gruesa capa epitelial, al bajo número de células CD4+ y a factores endógenos mucosos antivirales: anticuerpos específicos, mucinas, proteínas solubles, trombospondinas, los

cuales están presentes en la saliva, la cual actúa como barrera protectora de la cavidad <sup>176, 183</sup>.

Dentro de los **anticuerpos salivales** destacamos la función de las inmunoglobulinas A, G y M (IgA, IgG, IgM) las cuales se han aislado en saliva de pacientes seropositivos. La infección de VIH está asociada a una disminución de los niveles de IgA <sup>184, 185, 186</sup>

Con respecto a las **proteínas salivales**, se ha descrito su capacidad inmunológica inhibitoria frente al VIH (ver respuesta inmune innata) <sup>187, 234</sup>.

En la glándula submandibular se encuentran glicoproteínas de elevado peso molecular, mucinas y aglutininas salivales (SAG), que desplazan a la proteína de superficie gp120 del VIH impidiendo su unión al receptor CD4, se unen al VIH formando complejos que pueden ser eliminados por el huésped <sup>238</sup>.

Otra proteína salival, la trombospondina-1 (TSP-1), se adhiere a la proteína de superficie gp120 inhibiendo la capacidad del virus de penetrar en las células mononucleares <sup>188</sup>.

No sólo tienen capacidad inhibitoria las proteínas de elevado peso molecular, el factor C1q del complemento en presencia de fibronectina secuestra partículas virales <sup>239</sup>.

Las defensinas, son péptidos que impiden la entrada del virus en los linfocitos T humanos impidiendo por tanto su destrucción <sup>189</sup>. Son importantes mediadores en la inmunidad innata de la mucosa frente a las infecciones <sup>190</sup>.

Actualmente además existe el leucocito inhibidor secretor de la proteasa (**SLPI**) el cual es una proteína no glicosilada que se encuentra en las secreciones serosas. En un mismo individuo infectado las concentraciones de SLPI son más bajas en saliva que en sangre o secreciones genitales <sup>191</sup>.

El SLPI está formado por una cadena simple polipeptídica aislada y localizada principalmente en las secreciones a nivel parotídeo en humanos <sup>192, 193</sup>, se encuentra en fluidos que revisten ciertas superficies mucosas y se origina en las células epiteliales <sup>194, 195</sup>. La actividad anti-VIH-1 del SLPI viene dada por la acción directa sobre los monocitos (la célula huésped del virus) ya que no actúa directamente sobre el virus <sup>196, 197</sup>.

En concentraciones fisiológicas, el SLPI inhibe la infección por VIH-1 de monocitos en seres humanos (1-10 µg/ml) y su disminución en saliva resulta en una pérdida significativa de actividad antiviral <sup>196</sup>.

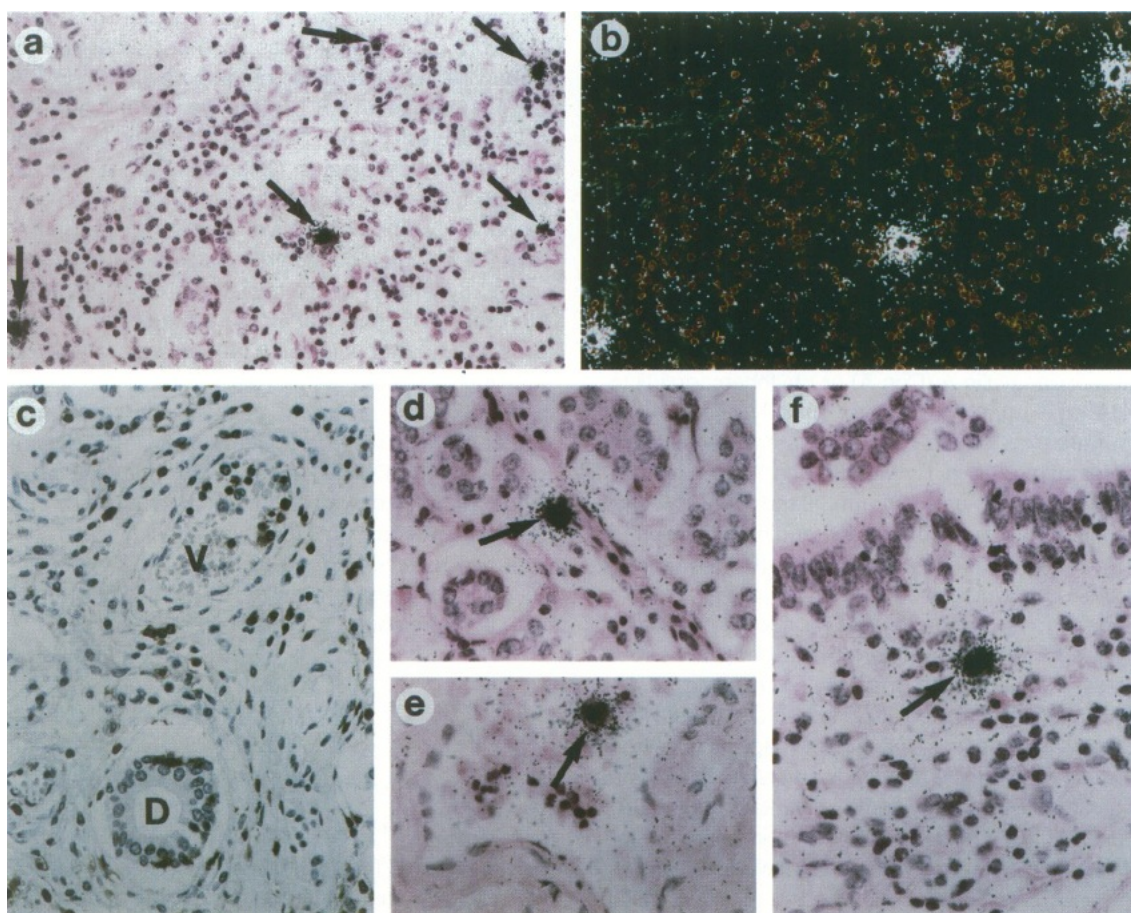
Ha sido comprobada la capacidad de bloqueo del SLPI mediante serino-proteasas, como la catepsina G, protegiendo a las superficies mucosas del ataque de leucocitos durante la inflamación <sup>198</sup>.

El bloqueo del SLPI se produce mediante su unión a la célula huésped y no a las proteínas gp120 o gp160 del virus; por tanto no interfiere con el primer paso de la infección celular: unión del virus y la célula huésped <sup>196</sup>.

Se ha comprobado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) que el SPLI produce el bloqueo previo a que ocurra la transcripción inversa viral <sup>199</sup>.

El SPLI no interviene en estadios avanzados de la infección celular: como la transcripción inversa, actividad de la proteasa o unión al virus en células infectadas <sup>200, 242</sup>. Sin embargo, bloquea la incursión del virus en las primeras células CD4 que lo expresan mediante un mecanismo que involucra la entrada del virus: interacción con co-receptores de quemoquina o desenvoltura de la cápside <sup>199, 191</sup>, así como inhibición de la proteasa que se requiere para la entrada e infectividad del virus de la célula huésped <sup>201</sup>.

Los estudios realizados in vitro por Wahl SM et al. <sup>202</sup>, se centraron en la localización de la molécula SLPI en células acinares o del epitelio ductal de las glándulas salivares, sin embargo, sólo se encontraron transcripciones del VIH-1 en las células mononucleares situadas en el estroma de la glándula salival. Comprobaron que la producción del SLPI en las glándulas salivares, su presencia en tejidos así como en fluidos de pacientes infectados por el VIH-1 era mayor que en pacientes seronegativos; aunque el SLPI no se localiza junto con el virus en el tejido glandular sino cuando llega a la cavidad bucal donde realizará su función antiviral sobre la célula huésped. Las células que expresan el VIH-RNA se localizaron en el tejido conectivo del septo que divide la glándula en lóbulos y que contiene las arteriolas, vénulas y los conductos excretores interlobulares. Mediante hibridación in situ se comprobó que son células mononucleares que infiltran las glándulas y tejido linfático adyacente. Las células mononucleares infectadas por VIH-1 entran en la cavidad bucal a través de la contaminación por vía sanguínea debido a lesiones orales o infecciones. Aproximadamente  $10^4$  o  $10^5$  leucocitos migran por minuto a la cavidad bucal desde los vasos existentes a nivel gingival y el número de células linfoides aumenta durante la inflamación y la gingivitis<sup>203</sup>.



*Figura 23: Identificación del VIH-1 en la glándula salival mediante hibridación in situ. En los tejidos de individuos infectados por VIH-1 se identificó la presencia del virus mediante una sonda que presentaba 9 Kb del genoma del VIH-1. Determinando células con señales positivas (flechas), imágenes (a) y (b). Las muestras se tiñeron mediante métodos inmunohistoquímicos con el anticuerpo específico de la célula T UCHL-1 (c), para identificar las localizaciones de los infiltrados de células T; septo, vasos (v) y en la periferia de los conductos (D). Las células VIH-positivas se encuentran en localizaciones similares en el septo (d), vasos (e) y en la periferia de los conductos (f). Magnificaciones x20 (a a c) y x40 (d a f). Sharon M. Wahl, Paula Worley, Wen Wen Jin, Tesie B. McNeely, Steve Eisenberg, Claudia Fasching, Jan M. Orenstein, and Edward N. Janoff. Anatomic dissociation between HIV-1 and its endogenous inhibitor in mucosal tissues. Am J Pathology, Vol. 150 n° 4, April 1997.*

Ya que el SLPI tiene influencia en la transmisión alcanzando a las células huésped susceptibles, puede representar un nuevo mecanismo de prevención que está presente tanto en el sujeto infectado por VIH-1 y en el

potencial huésped, pudiendo inactivar el virus que se encuentre libre en la cavidad bucal <sup>197</sup>.

El SLPI inhibe claramente la formación de ADN viral; por tanto, su actividad anti-VIH-1 engloba la inhibición del proceso infeccioso justo después de la unión del virus al CD4 (como la fusión de membranas entre el virus y la célula huésped o la desvoltura de la cápside). Su actividad antiviral en consecuencia, no dependería de su conocida actividad antiproteasa <sup>199</sup>.

En pacientes infectados, existe una alteración de la respuesta inmune durante el proceso de infección de la enfermedad: se elevan los niveles séricos de IgA, IgA1, IgA2, e IgG, produciéndose una hipergammaglobulinemia. Sin embargo, existe una disminución de los niveles totales de IgA secretora (S-IgA), isotipos IgA1, IgA2 en secreción salivar a nivel parotídeo <sup>204</sup>.

Es característica la existencia de anticuerpos específicos de S-IgA para p24 y gp160 al principio de la enfermedad, los cuales disminuyen cuando la enfermedad progresa<sup>205</sup>; así como también se observa un descenso de la inmunoglobulina disponible porque existe una disminución del flujo salival asociado a la progresión de la enfermedad además de la xerostomía consecuencia de la medicación y de la alteración glandular por causa de la enfermedad <sup>204, 205</sup>.

Otra posibilidad de inactivación del virus es mediante agregación a causa de las glicoproteínas de elevado peso molecular, como son las mucinas (secreciones mucosas: glándulas submaxilar y sublinguales) y la trombospondina-1. Ambas moléculas aniónicas se unen al virus por la

proteína gp120 creando una interacción y bloqueo a la infección celular evitando el complejo formado por la proteína gp120 y el receptor CD4 <sup>147</sup>.

A nivel parotídeo la secreción es serosa, no contiene mucinas y sin embargo también existe bloqueo del VIH-1 in vitro, con lo cual existen más factores que influyen en la inhibición del virus en mucosa bucal. Con esto se ha comprobado que cuando se eliminan moléculas de elevado peso molecular en saliva existe una reducción del efecto inhibitorio del virus <sup>196</sup>.

En saliva también existen moléculas solubles que tienen actividad anti-VIH como son la defensinas, péptidos cíclicos antimicrobianos, que se ha comprobado que disminuyen la citopatogenicidad de VIH-1 en las células T y las proteínas ricas en prolina, las cuales se encuentran en los fluidos parotídeos <sup>189,148</sup>.

Diversos autores destacan la posible interacción entre microorganismos presentes en la cavidad bucal y el VIH. Se ha demostrado que la presencia de virus del herpes humano (VHH) regula la replicación del VIH-1, y concretamente la presencia del VHH-8 produce un aumento considerable en la replicación del VIH-1 in vivo e in vitro <sup>183</sup>.

Sin embargo, la escasez de la transmisión del VIH a nivel oral y las diferencias en la arquitectura de la mucosa bucal respecto de otras zonas del organismo, refuerzan el papel antiviral endógeno de las moléculas salivales <sup>197, 206</sup>.

#### **4.3.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEL VIH-1 EN SALIVA**

Existen multitud de test rápidos de diagnóstico del VIH-1, la mayoría de ellos utilizan la sangre, el plasma ó los test de punción en el dedo,

únicamente unos cuantos tests emplean otros fluidos no convencionales tales como: saliva, secreciones orales mucosas u orina <sup>207, 208</sup>.

Los tests rápidos basados en fluidos orales presentan múltiples ventajas frente a los tests rápidos basados en sangre, debido a su técnica nada invasiva, facilidad para la recogida de las muestra, aceptación cultural, alto grado de acierto y rapidez, difícil de sufrir alteraciones, estable sin necesidad de refrigeración y sin capacidad de infectar al profesional sanitario <sup>207, 209, 210</sup>.

Actualmente el Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), recomienda los tests rápidos para la detección del VIH-1 en aquellas poblaciones de riesgo y en lugares relacionados con el sistema sanitario para todos los adultos desde los 13 a los 64 años <sup>211</sup>.

Estos tests diagnóstico rápido, se caracterizan por tener el resultado en menos de 30 minutos.

La saliva está siendo empleada cada vez con más frecuencia para diagnosticar VIH-1, tumores sistémicos, enfermedades cardiovasculares y sustancias adictivas. Cada vez se está empleando más el análisis de la saliva en investigaciones y se está comparando con el análisis de otros medios tales como la sangre y la orina <sup>212</sup>.

La saliva es la secreción de las glándulas salivales, que se encargan del equilibrio en la cavidad bucal. El fluido oral está compuesto de saliva, fluido crevicular del surco gingival, transudados mucosos, detritus celulares, bacterias y restos de comida. La base de la saliva es el fluido intersticial de la sangre a los capilares, que entran a través de los acinos de las glándulas salivales donde pasa de ser un fluido isotónico a un fluido hipotónico <sup>213</sup>.

La saliva está compuesta en un 98% por agua, el 2% restante lo componen electrolitos (sodio, potasio, calcio...) mucopolisacáridos, glicoproteínas, sustancias antisépticas (peróxido de hidrógeno, IgA) y distintas enzimas (alfa-amilasa, lisocimas, lipasa lingual). La producción media diaria de saliva es de 500 a 1000ml. La glándula submandibular produce el 70% del volumen total, la glándula parótida el 25% y la glándula sublingual alrededor del 5%. Del volumen total el generado por las glándulas salivales accesorias es insignificante <sup>212</sup>.

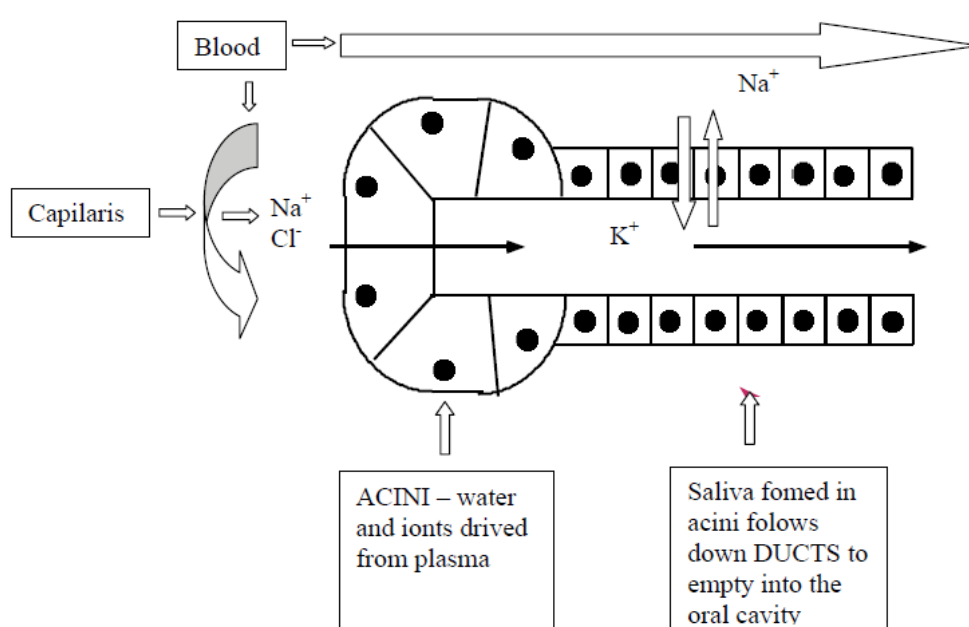


Figura 24: Mecanismo de transporte de iones desde el suero al canal salival. (Pink R., Simek J., Vondrakova J. Saliva as a diagnostic medium. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomuc Czech Repub 2009, 153(2):103-110.)

El VIH es muy difícil de encontrar en la saliva de individuos infectados, sin embargo, son los anticuerpos específicos del virus los que sí se pueden detectar. En la primera mitad de la década de los 80, se emplearon las primeras pruebas para anticuerpos de VIH que usaban fluidos orales <sup>214</sup>. Desde entonces se han ido desarrollando una serie de

ensayos serológicos para detectar el VIH usando distintos tipos de fluidos bucales y así se ha ido mejorando y simplificando el método para la toma de muestras y el medio de transporte <sup>215</sup>.

Los mediadores de la respuesta inmune que se pueden encontrar en el medio bucal son las inmunoglobulinas A (IgA), G (IgG) y M (IgM). Los dos anticuerpos empleados en las pruebas para el diagnóstico del VIH son la IgA e IgG. La IgA deriva de las glándulas salivales y la IgG llega a la cavidad bucal por el transudado de los componentes del suero a los componentes de la mucosa bucal <sup>216</sup>. La IgA específica para el VIH, en la saliva, es un marcador importante de la infección por VIH en la infancia y puede estar relacionado con el estado de la enfermedad. La IgG, con concentraciones 4 veces menores en los fluidos bucales que en el suero, se ha convertido en la diana de los tests de detección rápida actuales <sup>215</sup>.

En el estudio realizado por Stekler J.D. et al., los tests de diagnóstico de VIH-1 tipo EIA de primera ó segunda generación diagnosticaron un 92% de los casos en el grupo de hombres homosexuales que tienen sexo con hombres (HSH) y sin embargo los tests de diagnóstico rápido identificaron un 91% del grupo HSH que tuvieron anticuerpos positivos y un 80% de todos los HSH que estaban infectados. Aparte de las ventajas antes mencionadas de los tests rápidos, estos tests se consideran que tiene una sensibilidad similar a la de los tests de EIA de segunda generación <sup>217</sup>.

En cualquier caso los tests de diagnóstico rápido tienen más falsos negativos si se emplean en pacientes de reciente infección (en los primeros dos meses desde la infección) ó en pacientes en tratamiento con TARGA que presentan una gran fluctuación en los niveles de anticuerpos <sup>218</sup>. Sin embargo, el uso generalizado de estos tests pueden aumentar significativamente el número de individuos con una infección establecida

que son conscientes de su estatus VIH+ <sup>217</sup>. Estos tests requieren una confirmación con el empleo de los tests convencionales tales como ELISA y/o Western Blot <sup>217, 219</sup>.

#### **4.4 Cultivo viral y diagnóstico molecular en saliva y otras muestras orales**

Las pruebas de diagnóstico directo de la infección VIH proporcionan mayor certeza que las pruebas indirectas.

El **cultivo viral** se considera como la técnica más específica para el diagnóstico de la infección VIH aunque en la actualidad su utilización puede quedar relegada a estudios de variabilidad genética, sensibilidad a antirretrovirales y epidemiología molecular, además de que puede ser necesario en el diagnóstico de la infección en el recién nacido y en las infecciones silentes.

Existen distintos métodos de diagnóstico del VIH-1 utilizando técnicas de **biología molecular**, como <sup>220</sup>:

- Amplificación del ADN del organismo patógeno (técnica de PCR, LCR, etc...)
- Hibridación: Southern blots, dot blots, sondas moleculares, etc... .
- Hibridación *in situ* con sondas moleculares (ADN ó ARN) ó amplificación del ADN *in situ*.

La detección de material genético del VIH puede hacerse a partir de moléculas de ADN o de ARN que ofrecen información diferente de acuerdo con sus características funcionales. El ADN detectado se trata de ADN proviral presente en las células infectadas (principalmente en células T) y por la incorporación del VIH a los cromosomas de la célula, ésta se

detecta de modo irreversible, mientras que el ARN expresaría el grado de la replicación viral e indirectamente permite valorar la funcionalidad de las células infectadas en cuanto a la producción de viriones <sup>172</sup>.

En general, las técnicas más usadas son las de detección directa por hibridación, usando un segmento de ADN marcado, y las técnicas de amplificación <sup>221</sup>.

La técnica que más se está utilizando en nuestro país es la RT-PCR y es una técnica basada en la amplificación del ARN del VIH-1 <sup>172</sup>.

Con la metodología de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) es posible también la cuantificación tanto de ADN como de ARN del VIH (carga proviral y carga viral) <sup>172</sup>.

Las indicaciones fundamentales actuales de la carga viral son <sup>172</sup>:

- Predecir la progresión clínica de la infección VIH-SIDA
- Monitorizar el tratamiento con antirretrovirales:
  - Cuándo se debe iniciar el tratamiento.
  - Cuándo están siendo eficaces los antirretrovirales.
  - Cuándo están fracasando (resistencias) y se deben cambiar.
- Estimar el riesgo de transmisión, especialmente la materno-fetal.

## **5. VIH Y SUS MANIFESTACIONES EN MUCOSA BUCAL**

El VIH es una infección caracterizada por una alteración del sistema inmune cuya principal característica es la disminución progresiva de los linfocitos CD4 <sup>222, 223</sup>.

La patogénesis del VIH, se caracteriza por afectar a las células del sistema inmune que presentan en su superficie la molécula CD4 (linfocitos CD4, linfocitos B, células "natural killer", células de Langerhans, macrófagos, etc...). Estas células coordinan numerosas funciones inmunológicas y cuando disminuyen notablemente, aumenta exponencialmente el riesgo y la gravedad de las infecciones oportunistas y ciertos tumores que de otro modo no se producirían.

Las lesiones orales se observan en un 60-80% de los pacientes infectados por el VIH en un momento u otro de su evolución y su presencia puede ser un signo precoz que permita al clínico y al dentista sugerir el diagnóstico, y por tanto, anticipar la progresión de la enfermedad <sup>223</sup>.

<b>Etapas en la progresión del VIH</b>	<b>Manifestaciones clínicas</b>
<b>Síndrome retroviral agudo</b>	2-6 semanas después de la infección por VIH Síntomas agudos de catarro de la vía aérea superior que pueden durar 10-14 días Fiebre, linfadenopatía generalizada, faringitis, hipertrofia amigdalara, mialgia y artralgia Niveles altos de carga viral que se detecta en plasma Descenso de células T CD4+ Seroconversión
<b>Infección crónica temprana</b>	Puede durar una década o más Linfocitos T CD4+ normales ó ligeramente disminuidos Carga viral baja Fase asintomática, pero puede estar asociada a

	fatiga intermitente, dolores de cabeza, sudores nocturnos, candidiasis oral, diarrea
<b>Infección crónica intermedia</b>	Progresión de la enfermedad por VIH Disminuyen linfocitos T CD4+ Aumenta la carga viral Lesiones orales La infección crónica se vuelve persistente
<b>Infección crónica tardía (SIDA)</b>	Aparición de infecciones oportunistas (víricas, bacterianas, fúngicas ó protozoarias) Aumento de carga viral Linfadenopatía generalizada, pérdida notable de peso, diarrea crónica, fiebre crónica, sudores nocturnos Linfocitos T CD4+ <200 céls/mm <sup>3</sup> Neoplasias oportunistas (SK, carcinoma cervical, linfoma de Burkitt, etc...) Demencia

*Tabla 8: Etapas en la progresión del VIH <sup>223</sup>.*

Ninguna lesión oportunista está únicamente ligada a la infección por VIH, sin embargo la presencia de una o más lesiones hace que se considere la infección por VIH como causa subyacente de dichas lesiones. Algunas lesiones orales como la candidiasis ó la leucoplasia vellosa, están tan íntimamente asociadas a la infección por VIH que están incluidas en la clasificación de las enfermedades asociadas a la enfermedad del Centro de Control de Enfermedades (Centers for Disease Control, CDC) <sup>223, 224</sup>.

Las lesiones orales que frecuentemente se observan en pacientes infectados por VIH normalmente se clasifican de acuerdo a factores

etiológicos: lesiones causadas por hongos, virus, bacterias y lesiones neoplásicas. Con frecuencia estas lesiones son los primeros síntomas clínicos de la infección por VIH y su diagnóstico es un método auxiliar que puede incrementar la sospecha temprana de Sida <sup>223, 224, 225</sup>.

Manifestaciones orales en pacientes infectados por el VIH <sup>224, 225</sup> :

### **Infecciones bacterianas:**

Grupo 1:

- Eritema lineal gingival (ELG), diagnóstico clínico y se observa el margen gingival intensamente enrojecido con tendencia al sangrado.
- Gingivitis necrosante (GNA), se presenta en pacientes infectados por el VIH con una prevalencia del 4-16%. La encía presenta enrojecimiento e inflamación difusos con afectación de la papila interdental. El cuadro clínico se asocia además con dolor, sialorrea y hemorragia espontánea o al cepillado.
- Periodontitis necrosante (PNA), más agresiva que en la población seronegativa, tiene una mayor prevalencia en hombres homo y bisexuales, va acompañada de dolor intenso y destrucción de tejidos periodontales y de hueso. En el 95% de los pacientes con PNA los valores de CD4 son menores de 100 céls/ $\mu$ l.

Grupos 2 y 3:

- Infecciones producidas por patógenos oportunistas debido al déficit inmunitario, lesiones orales ulceradas con necrosis central, de gran tamaño, pueden afectar al hueso y se suelen localizar en paladar duro y encía. Para *Mycobacterium tuberculosis* las localizaciones más frecuentes son en borde lateral de lengua, paladar y comisuras bucales. La estomatitis necrosante está asociada a pacientes con sida con inmunosupresión grave, se presentan como lesiones en mucosa ulcerosas, dolorosa, aguda que deja el hueso expuesto, tendiendo a extenderse y que produce una rápida destrucción de hueso alveolar.

### **Infecciones víricas:**

#### Grupo 1:

- Virus de Epstein Barr (VEB), está relacionado con algunas úlceras esofágicas y con la leucoplasia vellosa; ésta última está frecuentemente sobreinfectada por *Candida*. El diagnóstico es clínico, la falta de respuesta al tratamiento antifúngico y los hallazgos histológicos. La probabilidad de desarrollar sida en un paciente infectado por el VIH con leucoplasia vellosa sin tratamiento antirretroviral es del 4% a los 16 meses y del 83% a los 30 meses del diagnóstico de la leucoplasia <sup>226, 227</sup>.

#### Grupo 2:

- Virus del herpes simple (VHS), afecta entre el 5 y 10% de los pacientes infectados por el VIH, el más frecuente es el VHS-2, pero a veces puede haber co-infección del VHS-1 y VHS-2. Puede producir gingivoestomatitis herpética de síntomas muy floridos y llamativos. Clínicamente afecta a la mucosa labial y bucal produciendo pequeñas vesículas que tienden a confluir originando úlceras muy dolorosas que suelen ir acompañadas de fiebre y linfadenopatía cervical. Las lesiones de repetición asientan en paladar duro y encía pudiendo durar hasta un mes. Diagnóstico clínico e histológico <sup>228</sup>.
- Virus del papiloma humano (VPH), asociado a infección por VIH está relacionado con la verruga vulgar, el condiloma y la hiperplasia epitelial focal. Diagnóstico histopatológico.
- Virus varicela zoster (VVZ), se puede manifestar como varicela primaria, varicela crónica y diseminada ó como herpes zoster localizado ó diseminado. Diagnóstico clínico e histológico <sup>229</sup>.
- Citomegalovirus (CMV), es el más frecuente de los virus oportunistas patógenos en pacientes con sida. Produce úlceras orales y se puede manifestar como síndrome de mononucleosis, neumonitis, hepatitis y ulceración gastrointestinal. Las úlceras orales asociadas a citomegalovirus se caracterizan por aparecer de forma unitaria, sin la formación de vesículas previas y con márgenes poco indurados. Pueden oscilar desde los pocos milímetros a 1 ó 2 centímetros de diámetro. Diagnóstico histológico, en el que se visualizan inclusiones intranucleares, pruebas serológicas con anticuerpos monoclonales y mediante cultivo <sup>230</sup>.

### Infecciones micóticas:

#### Grupo 1:

- Candidiasis oral, más del 75% de los pacientes infectados presenta candidiasis durante el transcurso de la enfermedad. Se pueden clasificar en: pseudomembranosa (aguda ó crónica), eritematosa (aguda ó crónica), hiperplásica, lesiones orales asociadas (queilitis angular, glositis rómbica y estomatitis protética), candidiasis mucocutáneas.
  - Candidiasis pseudomembranosa, puede suponer hasta el 50% de las candidiasis y es más frecuente en pacientes con menos de 200 linfocitos CD4/ $\mu$ l. Clínicamente se presenta como placas blanquecinas ó amarillentas que se deprenden al raspado. Se localizan en cualquier zona de la cavidad bucal aunque es más frecuente mucosa yugal, paladar, orofaringe y bordes laterales de la lengua.
  - Candidiasis eritematosa ó atrófica, es más común en los estadios iniciales de la enfermedad con más de 200 linfocitos CD4/ $\mu$ l. Clínicamente se presenta como un área rojiza en el dorso de la lengua y paladar y en paladar duro.

#### Grupo 2:

- Micosis profundas, son poco frecuentes y se adquieren por inhalación de esporas, En los pacientes infectados por VIH las

más frecuentes son: histoplasmosis, criptococosis, aspergilosis y mucormicosis.

### **Neoplasias asociadas:**

Grupo 1:

- Sarcoma de Kaposi (SK), según Robert C. Gallo podría ser un proceso maligno, una respuesta proliferativa ó ambos. Las distintas formas epidemiológicas de la enfermedad muestran la presencia del virus del herpes humano-8 (VH-8). La infección por VIH-1 está asociada con un gran incremento, por un factor de 20.000 a 50.000, en la incidencia del sarcoma de Kaposi en parejas con el VH-8. Las evidencias epidemiológicas del sarcoma de Kaposi hacen pensar que este tumor tiene un origen infeccioso, ya que su frecuencia de aparición es mayor en sujetos homosexuales y bisexuales que en hemofílicos, receptores de transfusiones ó adictos a drogas por vía parenteral (ADVP).
- Linfomas orales, los linfomas más habituales en los pacientes infectados por el VIH son los no hodgkinianos (60 veces más frecuentes que en pacientes no infectados). Entre ellos aparecen linfomas de células B (más frecuentes) y linfomas de células T ó NK.

Otras

Grupo 2:

- Hiperpigmentación melanótica, en forma de manchas bien definidas. Su aparición se ha relacionado con el virus de Epstein Barr (VEB) y con la administración de fármacos como la zidovudina, antifúngicos y antibacterianos <sup>231</sup>.
- Inflamación de glándulas salivares principales, presentando infiltrado linfocítico difuso que unido a la toma de medicamentos produce xerostomía.
- Púrpura trombocitopénica, presenta como antígeno desencadenante del proceso la proteína p24 del VIH. En la cavidad bucal las lesiones que se pueden observar son: petequias, equimosis ó hemorragia gingival espontánea.
- Úlceras aftosas, son más agresivas y persistentes que en los pacientes seronegativos y pueden ser más refractarias a los tratamientos convencionales. Las lesiones encontradas con más frecuencia son las úlceras mayores, luego las menores y las herpetiformes.

### Grupo 3:

- Reacciones medicamentosas, como el desarrollo de úlceras orales se producen debido a que muchos de los pacientes infectados por VIH están sujetos a tratamientos poliquimioterápicos, como zidovudina, foscarnet, interferón, ganciclovir, bleomicina, metotrexato, adramicina, vincristina y vinblastina. Estas úlceras afectan principalmente a zonas de encía no queratinizada <sup>232</sup>.
- Angiomatosis epiteloide bacilar, causad por *Rochalimaea henselae*, es una enfermedad proliferativa vascular que puede manifestarse con úlceras orales. Clínicamente se

puede confundir con el sarcoma de Kaposi, por ello es necesaria la biopsia para el correcto diagnóstico <sup>232</sup>.

<b>LESIONES ORALES SEGÚN ETIOLOGÍA</b>				
	<b>Inf. Bacterianas</b>	<b>Inf. Víricas</b>	<b>Inf. Micóticas</b>	<b>Neoplasias</b>
<b>G. 1</b>	EGL, GNA, PNA	VEB	Candidiasis oral	SK, Linfomas orales (No H)
<b>G. 2</b>	Lesiones ulceradas	VHS, VPH, VVZ, CMV	Micosis profundas	Hiperpigmentación melanótica Inflamación glándulas salivales Púrpura trombocitopénica
<b>G. 3</b>	Lesiones ulceradas			Reacciones medicamentosas Angiomatosis epitelioide bacilar

*Tabla 9: Manifestaciones orales en el paciente adulto infectado por el VIH <sup>232</sup>.*

Actualmente existen una serie de lesiones que con mayor frecuencia se asocian a una infección por el VIH. Raini S. y cols, clasifican el grado de asociación de las distintas lesiones orales con el VIH (tabla 10).

Grado de asociación con el VIH	Lesiones orales
<b>Fuerte</b>	Candidiasis Leucoplasia vellosa Sarcoma de Kaposi Linfoma No-Hodgking Enfermedad periodontal
<b>Moderada</b>	Infección bacteriana Hiperpigmentación Estomatitis necrotizante Alteraciones de glándulas salivales Infecciones víricas
<b>Ligera</b>	Reacciones medicamentosas Infecciones por hongos Alteraciones neurológicas

*Tabla 10: Lesiones orales y su asociación con el VIH <sup>223</sup>.*

En 9 de cada 10 pacientes van a aparecer manifestaciones orales que en algunos casos serán el primer signo de la enfermedad <sup>233</sup>.

Actualmente las manifestaciones orales del VIH se han cronificado, sobre todo desde la aparición del TARGA hace más de 10 años <sup>233, 234</sup>.

Se ha insistido en la necesidad de obtener datos actuales sobre la prevalencia de lesiones orales asociadas al VIH, ya que los avances en el tratamiento de la enfermedad, especialmente desde la aparición del tratamiento anti-retroviral de gran actividad (TARGA), hace que el porcentaje de aparición de estas lesiones se haya modificado sustancialmente <sup>235, 236, 237</sup>.

Estudios recientes han observado una disminución de la prevalencia de las manifestaciones orales cercana al 30% <sup>238, 239</sup>.

La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) reduce la concentración de ARN viral, aumentando el número de linfocitos CD4 y potencia las respuestas inmunológicas del huésped frente a los patógenos oportunistas <sup>233, 240</sup>.

Según un estudio realizado en una población de enfermos infectados por el VIH y en tratamiento con TARGA (que incluía el uso de 2 inhibidores de la transcriptasa inversa y de un inhibidor de la proteasa), se observó una disminución considerable en la candidiasis oral, sobre todo de tipo pseudomembranoso, y la leucoplasia vellosa se observó en una minoría de pacientes. Ambas lesiones están íntimamente relacionadas con el estado inmunológico del paciente; considerándose por tanto, lesiones indicativas de la presencia de VIH, de ahí la disminución significativa de este tipo de lesiones <sup>233</sup>.

El aumento de lesiones orales asociadas al VPH, tales como: papilomas, condilomas e hiperplasia epitelial focal (HEF), así como alteraciones de glándulas salivales, se ha observado desde la aparición del TARGA <sup>241, 242</sup>.

En un estudio realizado por Reznik et al. en 2005, se sugiere que el desarrollo de verrugas orales (sobre todo de aquellas producidas por el VPH) pueda estar relacionado con una mejora en el estado inmunológico del paciente infectado por VIH. Este estudio concluyó que la prevalencia de verrugas orales entre pacientes infectados por VIH era del 3%, similar al del estudio realizado por Patton et al. en 2002.

El mecanismo por el cual una reducción en la carga viral y en el número de linfocitos CD4 conlleve un aumento del riesgo de aparición de verrugas orales, aún no está definido <sup>243, 244, 245</sup>.

La respuesta inmune mediada por células es un elemento fundamental en el control de la infección por el VPH <sup>246, 247</sup>.

Hay otra serie de lesiones en pacientes infectados por VIH que se asocian a una mejora de su estado inmunológico, como aquellas producidas por MAI, meningitis, etc... <sup>245, 248</sup>.

Las células de Langerhans, fundamentales en la presentación de antígenos, se ha visto que están en menor número en la mucosa de pacientes infectados por el VIH. Un aumento del número de células de Langerhans y de linfocitos CD4 en la mucosa bucal debido a una disminución de la carga viral, puede fomentar un aumento del reconocimiento del antígeno del VPH y por tanto de su presentación al sistema inmune provocando una respuesta inflamatoria <sup>59, 245</sup>.

Esto indica la importancia del papel de la mucosa bucal como reservorio de virus. En mucosa bucal de pacientes infectados por VIH, se ha demostrado mediante reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) una prevalencia de infección latente del VPH del 16% <sup>249</sup>.

Una enfermedad tropical con afectación a nivel oral que ha sido subestimada es la leishmaniasis, con 12 millones de personas infectadas a nivel mundial y 2 millones de casos nuevos recogidos cada año <sup>250</sup>. Esta enfermedad afecta las poblaciones más pobres, sobre todo en países en

vías de desarrollo. De las dos formas clínicas, leishmaniasis cutánea y leishmaniasis visceral ó kala-azar, ésta última es la más frecuente <sup>251</sup>.

La infección por VIH incrementa el riesgo de desarrollar leishmaniasis visceral, reduce la posibilidad de una respuesta favorable al tratamiento y aumenta la posibilidad de una reactivación <sup>252, 253</sup>. La leishmaniasis visceral aumenta la progresión clínica del VIH <sup>254</sup>. Ambas enfermedades ejercen un efecto sinérgico negativo sobre la respuesta inmune celular, ya que ambas enfermedades actúan sobre células diana similares del sistema inmune (los macrófagos) <sup>254</sup>. La leishmania aumenta la producción de citoquinas afectando a la producción viral en macrófagos y en las células T CD4+ infectadas por VIH-1<sup>255</sup>.

El primer caso de leishmaniasis asociado a VIH se notificó en 1985 y desde entonces el número de casos ha aumentado rápidamente en el sur de Europa, siendo 35 los países que han notificado coinfección leishmaniasis-VIH. Aunque desde la introducción del TARGA esos casos han disminuido de manera notable en aquellos países de Europa donde la enfermedad es endémica (Francia, Italia, Portugal y España) <sup>250</sup>.

La coinfección leishmaniasis-VIH se da en un 2-9% de todos los casos de leishmaniasis visceral de países donde la enfermedad es endémica <sup>256</sup>.

En 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró 1911 casos de coinfección, de los cuales el 57% provenían de España <sup>257</sup>.

El principal problema de esta coinfección es que la infección por el parásito puede inducir la activación del virus que se encuentre en forma latente. Algunos estudios observan que la leishmaniasis provoca un aumento en la carga viral del VIH-1 y una progresión más rápida a Sida <sup>258, 259</sup>.

Estudios experimentales han demostrado la participación de la Leishmania en la patogénesis del VIH-1 a través de la inducción de la replicación viral y la progresión de la enfermedad <sup>260</sup>.

En cuanto a las manifestaciones orales de la leishmaniasis visceral son características las infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos infectados por VIH-1 <sup>261, 262</sup>.

### **TRANSMISIÓN DEL VIH EN LA CLÍNICA DENTAL**

Hace 20 años se publicó el único caso de transmisión del VIH a un paciente en una clínica dental, sin embargo se han realizado muchos estudios epidemiológicos y estudios retrospectivos sobre la transmisión del virus del profesional de la salud VIH positivo (HIV-infected Oral Health Care Professionals, OHCPs+) al paciente, en el curso de un tratamiento médico u odontológico <sup>263, 264, 265</sup>.

Croser en 2006, analizó la base científica por la que un profesional de la salud VIH positivo (OHCPs+) debe limitar la realización de tratamientos dentales. Actualmente, en la era del TARGA se plantean 2 cuestiones:

a) si los OHCPs+ tienen riesgo de transmisión a los pacientes durante la realización de tratamientos dentales;

b) si los controles de infección actuales son adecuados para proteger tanto al paciente como al profesional en la clínica dental.

Las conclusiones dieron lugar a la declaración de Beijing de 2009.

Desde 1990, la introducción del TARGA y la mejora de los protocolos de control de la infección han jugado un papel importante en la prevención de manera satisfactoria la transmisión de patógenos vía parenteral en la clínica dental de manera bidireccional, del odontólogo al paciente y del paciente al odontólogo.

En una encuesta realizada en 2008 por el Consejo Europeo de Dentistas, se vio que aproximadamente la mitad de los países europeos tenían estipuladas restricciones en el desempeño de la profesión de los OHCPs+, mientras que la otra mitad de los países permitían trabajar sin restricciones a este colectivo. Gran Bretaña es el país con restricciones más severas, impidiendo a cualquier persona de este colectivo tratar pacientes <sup>266</sup>.

Actualmente, en la era del TARGA, se ha de estipular si es seguro para un OHCPs+ trabajar como odontólogo. La carga viral es considerada un valor predictivo del riesgo de transmisión del VIH. Existe una fuerte relación entre el aumento de los niveles del VIH-RNA en sangre y el aumento del riesgo de transmisión del VIH.

En estudios publicados sobre hombres que tienen sexo con hombres, se ha demostrado que la introducción del TARGA reduce la infectividad y por tanto impide la transmisión del VIH <sup>267</sup>. Debido a estos hallazgos, se ha visto que el TARGA es eficaz produciendo una supresión viral y favoreciendo una restitución del sistema inmune; por tanto el riesgo de transmisión en la clínica dental en el caso de un profesional VIH+ al paciente es realmente bajo. En la era del TARGA, se consigue durante períodos de tiempo prolongados una carga viral indetectable.

Hay que estipular si los OHCPs+, pueden realizar dentro del ámbito de la clínica dental todo tipo de tratamientos invasivos. El riesgo de la transmisión depende también del tamaño de la herida. El riesgo de transmisión de un profesional infectado a un paciente durante un procedimiento invasivo, es imposible de cuantificar. En 1991, el CDC estableció que el VHB se transmite de manera más rápida y eficaz que el VIH.

El CDC, ha estipulado una serie de tratamientos considerados como invasivos, donde existe riesgo de que una herida en el profesional resulte en el contacto de la sangre del profesional con la mucosa expuesta del paciente durante la realización de una intervención quirúrgica oral <sup>268</sup>.

El riesgo de transmisión del VIH a través de instrumentos punzantes (vía parenteral) es inferior a un 0,3%, aunque en el caso de odontólogos en los que las agujas empleadas para anestesia local son de un calibre muy fino (30G, 27G) este porcentaje es aún menor. Sólo han existido 4 posibles casos de transmisión del VIH de un profesional sanitario VIH positivo a un paciente durante una intervención y entre ellos sólo uno pertenecía a un odontólogo. La transmisión en el entorno de la clínica dental es muy rara y se puede reducir y prevenir significativamente con los protocolos estándar de control de infección, un adecuado manejo de los instrumentos y el uso de dispositivos de seguridad en la aplicación del anestésico local. Estos protocolos se han de aplicar siempre y en todos los pacientes porque los portadores de infecciones de transmisión vía parenteral, suelen estar asintomáticos y no son conscientes de su estado. El CDC ha elaborado unas guías de desinfección y esterilización en el entorno de la sanidad en las que se clasifican los instrumentos empleados en cirugía bucal como críticos, en función de si atraviesan tejido blando y hueso durante el

tratamiento, ó semicríticos, si no penetran tejidos y por tanto entrañan menor riesgo.

El VIH está presente en el 46% de las muestras de saliva de pacientes VIH positivos que no están en tratamiento con TARGA, el riesgo desciende cuando están en tratamiento antirretroviral, llegando a conseguir una carga viral indetectable y por tanto minimizando el riesgo de transmisión. Basados en estos hechos se elaboró la Declaración de Beijing, en la Sexta Reunión Mundial de Salud Oral y Enfermedades en SIDA <sup>269</sup>.

Dentro del campo de la odontología casi la mitad de los incidentes en tratamientos dentales se produce durante la administración del anestésico local (46%), aunque en la mayoría de los casos estos accidentes son considerados de bajo riesgo ya que no hay evidencia de restos de sangre en el instrumento. Los daños por instrumentos punzantes como elevadores, bisturís y agujas de sutura suponen los accidentes más frecuentes dentro del grupo de lesiones de alto riesgo, donde se produce una exposición directa de sangre tras el incidente <sup>270</sup>.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Las **Hipótesis** que barajamos en base a la iconografía y bibliografía existente son las que detallamos a continuación:

1. Valorar la presencia y localización del VIH en mucosa oral, al considerar la cavidad bucal como potencial reservorio del virus y eventual fuente de infección.
2. Actualmente existen un gran número de pacientes infectados por el VIH que lo desconocen, debido en muchos casos a un diagnóstico tardío de la enfermedad. Nuestra hipótesis es determinar si el empleo de pruebas no invasivas que detectan anticuerpos anti-VIH en saliva es una alternativa diagnóstica frente a métodos convencionales más agresivos.
3. Hemos comprobado también la existencia de un elevado porcentaje de infecciones bacterianas. Dada la frecuencia creciente de enfermedades venéreas como la gonorrea en nuestra comunidad en hombres VIH+ que tienen sexo con hombres, nuestra hipótesis es considerar si la colonización asintomática de la boca y faringe por *Neisseria gonorrhoeae* pudiera ser un hecho frecuente y factor favorecedor de la extensión de la gonorrea en nuestro medio.

Para probar estas hipótesis, nos planteamos los siguientes **Objetivos**:

1. Determinar la presencia del VIH en mucosa oral mediante hibridación in situ;
2. Comprobar la sensibilidad y especificidad del test de saliva, Oraquick Advanced de Orasure, como método diagnóstico indirecto y no invasivo del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH);
3. Determinar si existe relación entre el resultado del test y el estado inmunológico del paciente ó el tratamiento antirretroviral;
4. Evaluar el tipo de lesiones orales que presentan los pacientes VIH positivos, asociados o no al tratamiento antirretroviral;
5. Demostrar la existencia, mediante estudio analítico con frotis faríngeo, de una posible infección gonocócica asintomática en un porcentaje importante de pacientes VIH positivos homosexuales;
6. Determinar si existe relación entre la presencia de infección gonocócica y algunos de estos tres factores: ingesta de drogas, presencia de alguna enfermedad de transmisión sexual previa y el tratamiento antirretroviral;
7. Finalmente, estudiar prospectivamente la patología oral de pacientes VIH+ que asisten a una consulta para el control de dicha infección.

### **III. PACIENTES Y MÉTODOS**

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

### **1. PACIENTES**

#### **1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Desde 2005 hemos realizado varias líneas de investigación (3 estudios) para intentar averiguar el papel del virus de la inmunodeficiencia humana en boca. En una primera fase del estudio, en 2005, estudiamos el comportamiento del VIH en mucosa bucal; valoramos la utilidad de los tests rápidos de diagnóstico de VIH en cavidad bucal y la presencia de infección gonocócica asintomática en boca de pacientes VIH positivos homosexuales, que son el colectivo que más está aumentando en los últimos años.

Es un estudio observacional y prospectivo. Sobre 312 pacientes diagnosticados con infección por VIH en la consulta del Servicio de Enfermedades Infecciosas de la Fundación Jiménez Díaz (FJD) de Madrid, donde realizaban las revisiones pertinentes de su enfermedad y seguían tratamiento. El protocolo de actuación fue aprobado por el Comité Ético del hospital. Al tratarse de un estudio observacional y de recogida de datos sin interferencias en la evolución clínica, sin aplicaciones de técnicas invasivas o agresivas para los pacientes, no fueron precisos permisos especiales por parte de la Comisión de Investigación y Ética del hospital.

La mayor parte de los pacientes que intervinieron en el estudio eran de un nivel socioeconómico medio, siendo la mayoría de ellos homosexuales y nos dieron su consentimiento para colaborar en el estudio.

El período de recogida de muestras ha sido de Junio a Diciembre de 2011, y se ha realizado en la consulta del Servicio de Enfermedades Infecciosas del hospital.

Sólo fueron seleccionados aquellos pacientes que estaban conformes en la participación del estudio y que tras ser informados aceptaron y entregaron su consentimiento (anexo, tabla 1).

Los **criterios de inclusión** propuestos son:

- Pacientes infectados por el VIH (independientemente de que estuvieran o no en tratamiento antirretroviral)
- Pacientes que otorgaban su consentimiento a participar en el estudio
- Pacientes que no estuvieran en tratamiento con antimicrobianos en el momento de la recogida de las muestras.

Los **criterios de exclusión** son:

- No cumplir el protocolo de visitas y revisiones
- Pacientes en tratamiento con antimicrobianos

## 1.2 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se establecieron 3 líneas de estudio:

- **Estudio 1:** realizado en 2005, sobre 20 pacientes VIH positivos, se realizó el estudio anatomopatológico, para ver la presencia del virus en mucosa bucal sana, y serológico (ver linfocitos en sangre periférica); la toma de las muestras se realizó el mismo día. De estos

20 pacientes sobre los que se tomaron las muestras de mucosa bucal para el análisis anatomopatológico y extracciones de sangre para el estudio serológico, hubo 3 en los que la biopsia de mucosa bucal no pudo considerarse para su posterior estudio por no conseguir una buena preparación de las mismas que permitiera su análisis anatomopatológico, pudiendo haberse contaminado. Por tanto, el estudio anatomopatológico y serológico finalmente se realizó sobre 17 pacientes.

- **Estudio 2:** Se realizó el test de saliva Oraquick Advanced de Orasure; el cual está compuesto por:
  - o grupo A, formado por 312 pacientes VIH positivos a los que se les realizó una historia clínica y la exploración odontológica (ver anexo ficha clínica);
  - o grupo B, control, compuesto por 70 pacientes sanos, no VIH positivos, a los que también se les realizó la historia clínica.

A ambos grupos, A y B, se les realizó el test rápido de saliva Oraquick Advanced de Orasure.

- **Estudio 3:** de la muestra total, compuesta por 312 pacientes VIH positivos, se escogieron aquellos pacientes VIH positivos, homosexuales y varones, con lo cual la muestra resultante fue de 265 pacientes, a los que se les realizó la historia clínica y dental descrita anteriormente. En este grupo se realizó un frotis faríngeo para estudiar la existencia de una infección gonocócica subclínica.

El rango de edad de los pacientes estudiados es de 20-70 años. La edad media de los pacientes es de 43 años, un 93% eran hombres y un 7% mujeres.

## 2. MÉTODOS

Para dichos estudios se ha realizado la toma de datos a partir de la historia clínica y dental del paciente; como información adicional de esta patología se contrastaban los datos obtenidos con unas tablas que relacionan la presencia de determinadas enfermedades con la incidencia de sida (anexos: tablas 4 y 5).

- **Estudio 1:** Sobre los 20 pacientes se realizó además de la historia clínica y dental (anexos: tabla 2), una biopsia de mucosa bucal de la zona alveolar, la cual una vez obtenida se incluía una parte en formol, otra en parafina y en el mismo momento se le extraían 20cc de sangre al paciente, de los cuales 10cc se heparinizaban y 10cc no se heparinizaban.

La mucosa bucal de la muestra no presentaba alteraciones clínicas aparentes.

Se anotaba el estadio clínico según la clasificación del CDC de Atlanta. El estado inmunológico del paciente, era valorado de acuerdo al estudio de poblaciones linfocitarias CD4 y CD8 por citometría de flujo en un citómetro FACS-Calibur (Beckton-Dikison) utilizando anticuerpos monoclonales directamente marcados (Tritest DB). La determinación de la carga viral plasmática RNA-VIH1 se realizó con Roche Amplicor Ultrasensible (sensibilidad del método 20 copias/ml).

- **Estudio 2:** Se estudió la sensibilidad del test Oraquick Advanced de Orasure sobre el total de la muestra, 312 pacientes, así como la especificidad del test sobre el grupo control, 70 pacientes.

El test Oraquick Advanced es un inmunoensayo cualitativo de flujo lateral, de un solo uso, para detectar anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 y VIH-2 en muestras de fluido oral. El test contiene péptidos sintéticos que representan la región del sobre del VIH y un control de procedimiento de IgG antihumano de cabra.

En aquellos pacientes en los que el test de saliva Oraquick Advanced fue positivo, se estudiaron distintas variables como: historial médico previo, presencia de enfermedades de transmisión sexual (ETS) como herpes simple, gonorrea, sífilis, condilomas, proctitis, etc..., presencia de hábitos tóxicos como el consumo de tabaco, alcohol ó drogas, estar en tratamiento antirretroviral (Tto ARV) y presencia de lesiones en mucosa bucal.

Se compararon los resultados de la analítica de estos pacientes con la positividad del test, se compararon con la carga viral, el cociente CD4/CD8, el valor de los CD4, el valor de los CD8, el valor de plaquetas y la hemoglobina.

- **Estudio 3:** Sobre el grupo de pacientes VIH+, homosexuales, varones, se estudió la existencia de una infección gonocócica subclínica. Estos pacientes debían estar asintomáticos y no haber padecido enfermedades de transmisión sexual (ETS) en los seis meses previos a la realización del estudio, con lo cual la muestra inicial se redujo de 312 pacientes a 265 pacientes.

Se estudiaron las siguientes variables: presencia del virus de la hepatitis C (VHC), presencia del virus de la hepatitis B (VHB), mantoux positivo, presencia de alguna enfermedad de transmisión sexual (ETS): herpes simple, sífilis, proctitis, gonorrea, condilomas, etc... aunque nunca en los seis meses anteriores a la realización del estudio; presencia de hábitos tóxicos: tabaco, alcohol, drogas (cocaína, heroína), estar en tratamiento antirretroviral (Tto ARV), existencia de alguna patología bucal asociada.

Para valorar la presencia de la infección gonocócica subclínica, se realizaron frotis faríngeos en los pacientes siempre que no estuvieran en tratamiento con algún antimicrobiano en el momento del estudio.

Se valoraron las especies de *neisseria gonorrhoeae* aisladas y se estudiaron las distintas sensibilidades a los distintos antimicrobianos: penicilina, tetraciclinas, ciprofloxacino y ceftriaxona. En aquellos pacientes en los que el resultado del frotis fue positivo y volvieron a consulta dentro de los quince días posteriores al resultado, se les instauró tratamiento antimicrobiano con una dosis de ceftriaxona 250mg vía intramuscular. En la repetición del frotis faríngeo el resultado en todos los pacientes fue negativo.

## **2.1 TOMA DE LAS MUESTRAS**

### **Estudio 1:**

- Biopsia de mucosa bucal: se realizaba con hoja de bisturí del nº15, de encía queratinizada de la zona alveolar posterior, el tamaño mínimo era de 0.5x0.5 cms y la mucosa no presentaba alteraciones clínicas aparentes. La sutura de la zona de extracción se realizó con seda

trenzada 2-0. La muestra obtenida se metía en parafina para su posterior preparación y fijación.

- Extracción de sangre: se tomaban 20cc con una aguja tipo mariposa, y se depositaban 10cc de sangre en un tubo estéril y otros 10cc en otro tubo estéril con heparina para evitar la coagulación y así poder analizar en laboratorio la presencia del VIH-1.

### **Estudio 2:**

- Test de saliva: se obtiene una muestra de fluido oral utilizando la paleta del dispositivo de prueba, con la que se impregna la saliva en la zona de mucosa yugal derecha e izquierda de los pacientes y la zona de fondo de vestíbulo superior e inferior a continuación se inserta el dispositivo de prueba en el frasco de solución reveladora. Se tomaba la muestra de una zona que no presentara lesiones en la mucosa (figura 1). Esta prueba se debe llevar a cabo en temperaturas dentro del margen de 15°C-37°C.



Figura 1: Toma de muestra de saliva con el test Oraquick Advanced.

### **Estudio 3:**

- Frotis faríngeo: con un hisopo estéril se realiza un escobillado y se impregna de saliva la zona posterior de la faringe, a nivel de las amígdalas, siempre que el paciente no hubiera utilizado colutorios 30 minutos antes de la prueba, no presentara alteraciones en la mucosa a ese nivel ni estuviera en tratamiento con antimicrobianos (figura 2).



Figura 2:Frotis faríngeo.

## 2.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

### Estudio 1:

#### **HIBRIDACIÓN IN SITU SOBRE MUCOSA BUCAL**

Para la hibridación *in situ* se realizaron cortes histológicos de 4 $\mu$ m de espesor de los bloques de mucosa incluidos en parafina. En primer lugar se desparafinaron las preparaciones mediante un tratamiento con xilol durante 10 minutos y posteriormente se rehidrataron en una serie de diluciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 50%, 30%) y finalmente en H<sub>2</sub>O. Posteriormente se procedió a un pretratamiento de las preparaciones con proteinasa K (1 $\mu$ g/ml) durante 20 minutos para permeabilizar las membranas celulares y permitir una mayor accesibilidad de las sondas

para su hibridación con la secuencia complementaria. A continuación, las preparaciones se postfijaron durante 20 minutos con formaldehído al 4% en PBS 1x (NaCl 0,1M; KCl 3mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM pH 7,0) a temperatura ambiente, tras lo cual se acetilaron en anhídrido acético al 0,5% en trietanolamina 100mM durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones se deshidrataron en etanol al 70% y 100% durante 5 minutos cada uno y se dejaron secar al aire.

La sonda para el VIH se generó a partir del plásmido pVIH<sub>gag</sub> que contiene un injerto de 115 pares de bases de longitud, correspondiente a la región del gen *gag* del VIH, clonado en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este plásmido se linearizará y se transcribirá *in vitro* utilizando la RNA polimerasa del fago T7 (Roche Molecular Biochemicals Indianapolis, IN) en presencia de digoxigenina 11-UTP (Roche Molecular Biochemicals). Para cada hibridación se emplearon 5 ng de sonda marcada resuspendida en la mezcla de hibridación (50% formamida desionizada, 0,5 mg/ml t-RNA, 0,1 mg/ml de polyA, solución Denhardt 1x, 10% sulfato dextrano, 2x TE, y 300mM NaCl) desnaturalizada a 95°C. La hibridación se llevará a cabo en cámara húmeda durante 16 horas en un horno de hibridación a 50°C.

Tras la hibridación, para eliminar el exceso de sonda se realizaron 3 lavados en 3xSSC (0,5M NaCl, 40mM Citrato sódico; pH 7) durante 30 minutos cada uno. Posteriormente las preparaciones se digirieron con RNAsa A (20µg/ml) (Roche Molecular Biochemicals) en 500mM NaCl, 1xTE, pH 8, durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se realizaron lavados en 1,5xSSC y 0,75xSSC. La detección de la hibridación se realizó con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y el revelado se llevó a cabo con un sustrato cromogénico (NBT-BCIP, Roche Molecular Biochemicals) que mediante una reacción enzimática produce

un precipitado azul que permite visualizar las moléculas hibridadas. Las preparaciones se contratiñeron con safranina al 0,2%.

Asimismo, en todos los experimentos se incluyeron los siguientes controles para asegurar la especificidad de las señales de hibridación:

- Hibridación con un plásmido marcado que no portaba secuencias derivadas del VIH (un fragmento de 360-pb correspondiente al gen cloranfenicol acetil transferasa, generado por PCR y clonado en el vector pCRII-TOPO).
- Tratamiento de las preparaciones con RNAsa (0.2 mg/ml) (Sigma Corporation, St Louis, Mo) or DnasA I (20 U/ml) (Sigma) durante 2 horas a 37°C previo a la hibridación
- Omisión de la sonda en la mezcla de hibridación.

Las preparaciones se visualizaron empleando un microscopio óptico Nikon ECLIPSE E400 con los objetivos de 20x, 40x y 100x aumentos (Nikon Co. Tokio, Japón). Las imágenes se captaron usando una cámara CCD monocromática de alta resolución (DIC-N, World Precision Instruments, Cambridge, UK).

## **INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO S-100**

La inmunohistoquímica para la detección del antígeno S-100 se realizó de manera automática (Tech Mate 500, Dako, Glostrup, Denmark) con un anticuerpo policlonal (Dako) en una dilución 1/2000 después de la recuperación antigénica por calor (durante 2 minutos en 10 mM tampón citrato [pH 6.0]) utilizando el procedimiento de tinción de Dako Envision y el diaminobencidina como cromógeno.

La inmunohistoquímica se realizó en la misma muestra en la que previamente se realizó la hibridación in situ.

### **HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (CMSP)**

Las células mononucleares en sangre periférica (CMSP), se aislaron a partir de 20 ml de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de ficoll. Tras lavar las células con PBS 1x, se resuspenden en 5 ml de Kcl 0,56% durante 10 minutos a 37°C, con objeto de producir un choque hipotónico en las células y provocar que éstas se hinchen. Tras cinco minutos de centrifugación a 1300 rpm se quita el sobrenadante y el precipitado de células se resuspenden en PBS 1x. A continuación se mezclan 15 µl de las células resuspendidas con 35 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y la mezcla se deposita sobre portaobjetos, previamente recubierto con una fina capa de agarosa convencional al 0,65%. Posteriormente, se coloca un cubreobjetos y se deja gelificar a 4°C sobre una bandeja metálica durante una hora. A continuación, se quitan los cubreobjetos sumergiendo las preparaciones en PBS 1x e incubándolas en etanoles al 30% y al 70% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones se incuban en etanol absoluto durante 30 minutos a temperatura ambiente para permeabilizar las membranas celulares y se dejan secar durante al menos 30 minutos.

La hibridación se realizó con la misma sonda empleada para la detección de VIH en mucosa bucal (generada a partir del plásmido pVIH<sub>gag</sub>) y se llevó a cabo en cámara húmeda durante 16 horas a 42°C.

Tras la hibridación, el exceso de sonda se eliminó mediante 2 lavados en 2xSSC. Posteriormente se incuban las preparaciones en RNasa A (20µg/ml) (Roche Molecular Biochemicals) para eliminar el RNA que no haya hibridado. Finalmente, realizaron lavados en concentraciones decrecientes de SSC.

La detección de la hibridación in situ se llevó a cabo mediante microscopía de fluorescencia. Los híbridos se detectaron incubando las preparaciones con un anticuerpo antidigoxigenina conjugada con fluoresceína (fluoresce en luz verde) en cámara húmeda a 37°C durante una hora (Roche Molecular Biochemicals). En algunos casos, el revelado se realizó con estreptavidina conjugada con rodamina (fluoresce en rojo) en cámara húmeda a 37°C durante una hora (Roche Molecular Biochemicals).

Finalmente, las preparaciones se contrateñían con DAPI (5-10ng/ml) y eran montadas en solución antifade.

En todos los casos se realizaron los siguientes controles para asegurar la especificidad de las señales de hibridación:

Hibridación con un plásmido marcado que contiene secuencias no relacionadas del VIH; tratamiento previo de las preparaciones con Rnasa o Dnasa; omisión de la sonda en la mezcla de hibridación.

## **Estudio 2:**

- Test de saliva: la paleta en la cual se tomaba la muestra de saliva, se insertaba en el frasco con la solución reveladora, la cual permite la detección de anticuerpos anti VIH1/2. Se dejaba en reposo la paleta durante un mínimo de 20 minutos pero no sobrepasando los 40 minutos. La paleta tiene una ventana en la cual se ve el resultado de la prueba. Siempre debe aparecer una línea de color púrpura junto al triángulo que dice "C" (control), esto indica la validez de la prueba. El resultado es reactivo (positivo), si aparece una línea de color púrpura junto al triángulo que dice "C" y también si aparece otra línea de color púrpura junto al triángulo que dice "T" (test), lo cual nos indica que la muestra de saliva contiene anticuerpos que reaccionan con los antígenos. El resultado es negativo, si aparece una línea de color púrpura únicamente donde dice "C" y no donde dice "T".



Figura 3: Interpretación del resultado del Test Oraquick Advanced.

### Estudio 3:

- Frotis faríngeo: Se tomaron las muestras faríngeas con hisopo estéril, con un medio de transporte se llevaron al laboratorio y se cultivaron dentro de las siguientes 2 horas en un medio selectivo de agar chocolate suplementado con PolyVitex VCAT3 (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France). Se

realizó la identificación mediante métodos convencionales y API NH (Biomérieux®). Se determinó la susceptibilidad antibiótica mediante E-test.

### **2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El estudio estadístico se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Proceso de Datos de la Universidad Complutense. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 19.0 para Windows.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (SPSS, 2010):

#### **Estudio 1:**

- Sobre los 20 pacientes que intervinieron en el estudio anatomopatológico y serológico, se empleó el test de Pearson para ver las correlaciones entre las distintas variables: CD4, CD8, cociente CD4/CD8 y el porcentaje de virus en mucosa. Se empleó el test de Anova de un factor para estudiar la relación entre el estado inmunológico del paciente con el porcentaje de virus en mucosa.

- También se empleó el test de la T de Student para analizar datos cuantitativos y el test de Spearman para ver la correlación. El valor se consideró estadísticamente significativo para una  $p > 0,05$ . Todos los análisis se realizaron utilizando el programa SPSS (SPSS para Windows 9.0, SPSS Inc. Chicago IL).

#### **Estudios 2 y 3:**

- Estadística descriptiva de las variables cuantitativas: edad, carga viral, células CD4, células CD8, cociente CD4/CD8, plaquetas, hemoglobina, etc... (procedimiento DESCRIPTIVE) para la descripción de las muestras: media, desviación estándar, máximo, mínimo, mediana, desviación estándar de la media, etc.
  
- Estadística descriptiva de las variables cualitativas: sexo, vía de contagio, estadio CDC, enfermedades de transmisión sexual (ETS), hábitos tóxicos, tratamiento antirretroviral, lesión oral, presencia de gonococo, sensibilidad a antibióticos, test de saliva, etc... (procedimiento FREQUENCIES), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías.
  
- Test de la *T* de Student (procedimiento T-TEST) para la comparación de dos medias (hombre y mujer) en variables cuantitativas, asumiendo o no igualdad de varianzas (método paramétrico). Se asume la normalidad en los datos. La igualdad de varianzas se contrasta con el test de Levene (lo que nos indicará si es más adecuado el test asumiendo varianzas iguales o desiguales).
  
- Tablas de contingencia para la relación entre variables cualitativas (procedimiento CROSSTABS). Test de la chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas, donde se emplea el test de la chi-cuadrado de Pearson con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila y los residuos corregidos no tipificados para ayudar a descubrir las tramas en los datos que contribuyen a una prueba de chi-cuadrado significativa.

## **IV. RESULTADOS**

## Resultados

### Epidemiología descriptiva:

#### Estudio 1:

De los 17 sobre los que finalmente se realizó el estudio anatomopatológico y serológico, 3 eran mujeres (17,65%) y 14 eran hombres (82,35%) (figura 1).

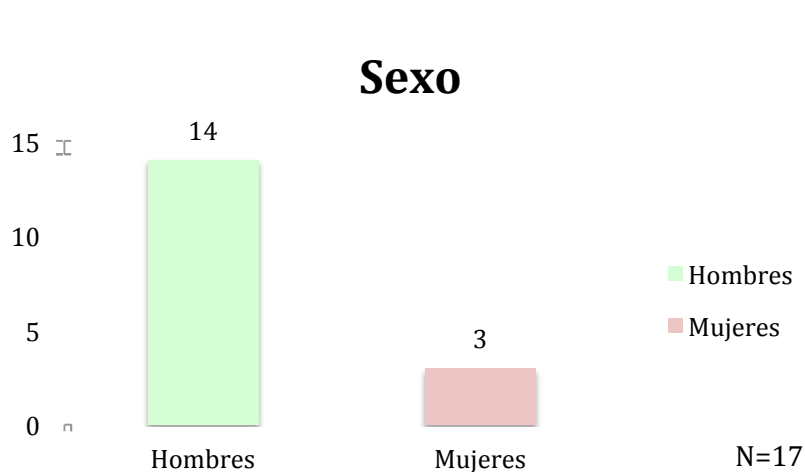


Figura 1: Afectación del VIH-1 en función del sexo.

La edad media de afectación del VIH es de 38,25 años en el grupo de los hombres y de 35,33 años en las mujeres. El rango de edades de los pacientes estudiados: 27-67 años.

La forma de contagio de los pacientes estudiados es (figura 2):

- ADVP: 65,52%, 11 pacientes, 9 hombres y 2 mujeres.
- Homosexual: 20,69%, 4 pacientes hombres.

- Heterosexual: 13,79%, 2 pacientes, una mujer y un hombre.

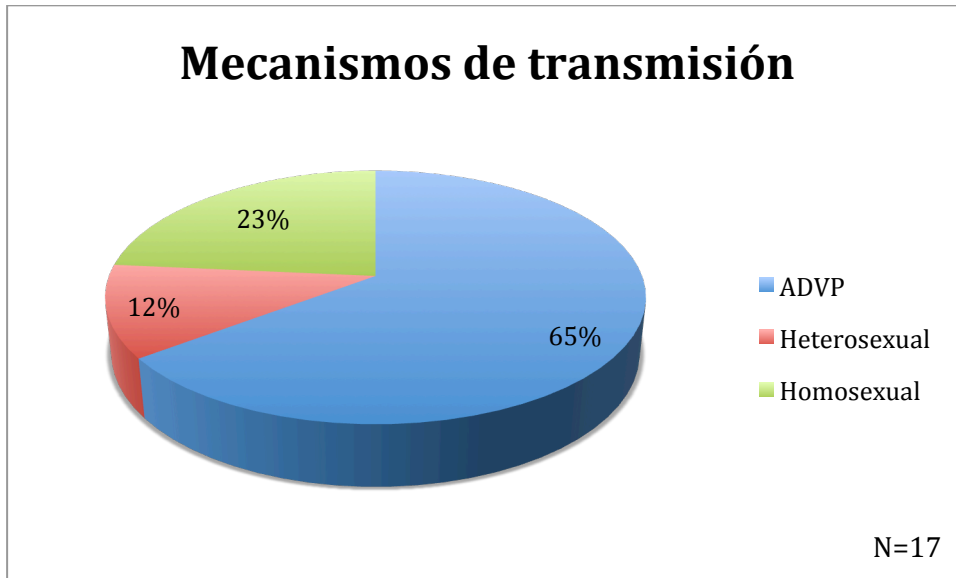


Figura 2: Porcentajes de los mecanismos de transmisión del VIH.

8 de los 17 pacientes presentaban manifestaciones orales relacionadas con la infección por VIH (figura 3).

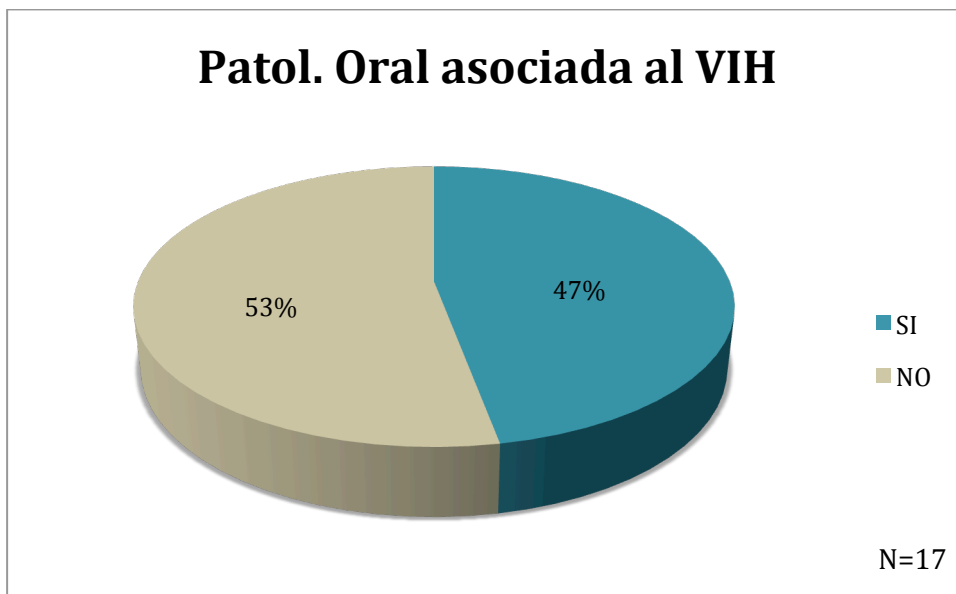


Figura 3: Patología oral asociada al VIH.

15 de 17 pacientes, estaban recibiendo tratamiento antirretroviral (figura 4).

□

## Tto. Antirretroviral

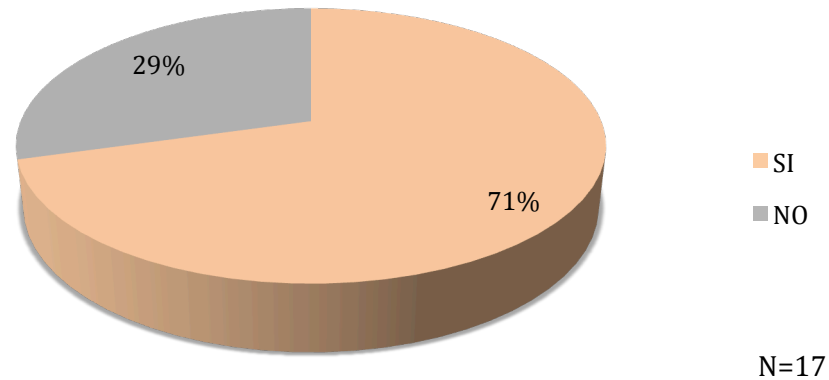


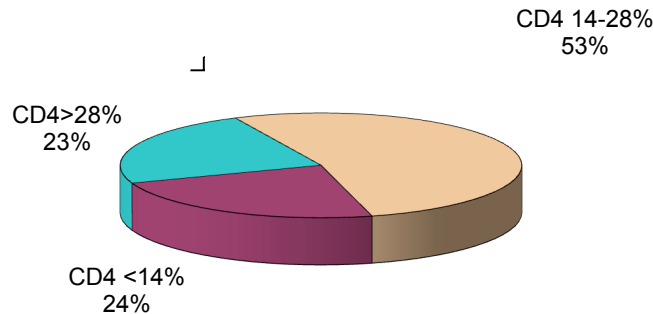
Figura 4: pacientes en tratamiento antirretroviral.

### Datos Inmunológicos:

#### Porcentaje de linfocitos CD4

El análisis del porcentaje de linfocitos CD4 dio el siguiente resultado: un 23,52% (4/17) de los pacientes, 100% hombres, tenían un porcentaje de linfocitos superior al 28%; un 52,94% (9/17) de los pacientes, 22,22% (2/9) mujeres y 77,77% (7/9) hombres, presentaban un porcentaje de linfocitos de 14-28%; y un 23,52% (4/17) de los pacientes, 25% (1/4) mujeres y 75% (3/4) hombres, presentaban un porcentaje <14% (figura 5) (ver anexo, clasificación del CDC de Atlanta).

## Porcentaje de CD4



N=17

Figura 5: Porcentaje de linfocitos CD4 según clasificación inmunológica del CDC.

### Datos del VIH-1 RNA en plasma: carga viral

De los pacientes incluidos en el estudio anatomopatológico y serológico (17), un 52,94% (9/17), 22,22% (2/9) mujeres y 77,78% (7/9) hombres, presentaban una carga viral indetectable, menor de 20 copias/ml.

Un 11,76% (2/17), presentaban una carga viral de 20-10.000 copias/ml; y un 35,29% (6/17), 16,66% (1/6) mujeres y 83,33% (5/6) hombres, presentaban más de 10.000 copias/ml.

Del estudio, 11 de los 17 pacientes (64,70%), que presentaban una carga viral en el momento del estudio inferior a 10.000 c/ml, 8 (47,06%), estaban en tratamiento con terapia antirretroviral en el momento del estudio (figura 6).

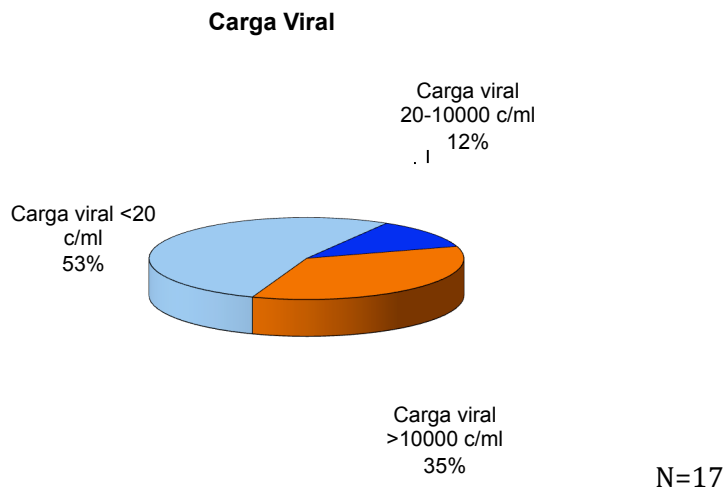


Figura 6: Carga viral de los pacientes del estudio.

#### **Epidemiología analítica:**

Se utilizó el test de correlación de Pearson mediante el programa de análisis estadístico SPSS13, para valorar si existían correlaciones entre el porcentaje de linfocitos CD4 y el porcentaje de virus presente en mucosa; entre el porcentaje de linfocitos CD8 y el porcentaje de virus presente en mucosa; entre la carga viral y el porcentaje de virus presente en mucosa y entre el estadio de la enfermedad y el porcentaje de virus presente en mucosa.

No se observaron valores significativos de correlación ( $p=0,05$ ) entre el CD4 y el porcentaje de virus en mucosa ( $p=0,349$ ), ni entre el cociente CD4/CD8 y el porcentaje de virus en mucosa ( $p=0,465$ ). Sin embargo entre el CD8 y el porcentaje de virus en mucosa se encontraron valores más próximos a la significación ( $p=0,221$ ) (tabla 1).

Tablas de correlación entre el porcentaje de CD4, porcentaje de CD8, cociente CD4/CD8 y el porcentaje de virus presente en mucosa.

## Correlaciones

		CD4	CD8	CD4_C D8	mucos a
CD4	Correlación de Pearson	1	-,291	,937(**)	-,271
	Sig. (bilateral)		,258	,000	,349
	N	17	17	17	14
<b>CD8</b>	Correlación de Pearson	-,291	1	-,546(*)	<b>,350</b>
	Sig. (bilateral)	,258		,023	<b>,221</b>
	N	17	17	17	14
CD4_C D8	Correlación de Pearson	,937(**)	-,546(*)	1	-,213
	Sig. (bilateral)	,000	,023		,465
	N	17	17	17	14
mucos a	Correlación de Pearson	-,271	,350	-,213	1
	Sig. (bilateral)	,349	,221	,465	
	N	14	14	14	14

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

*Tabla 1: Correlación de Pearson: relación entre los CD4, CD8 y el porcentaje de virus presente en mucosa.*

Relación entre el porcentaje de CD4 y el porcentaje de virus presente en mucosa

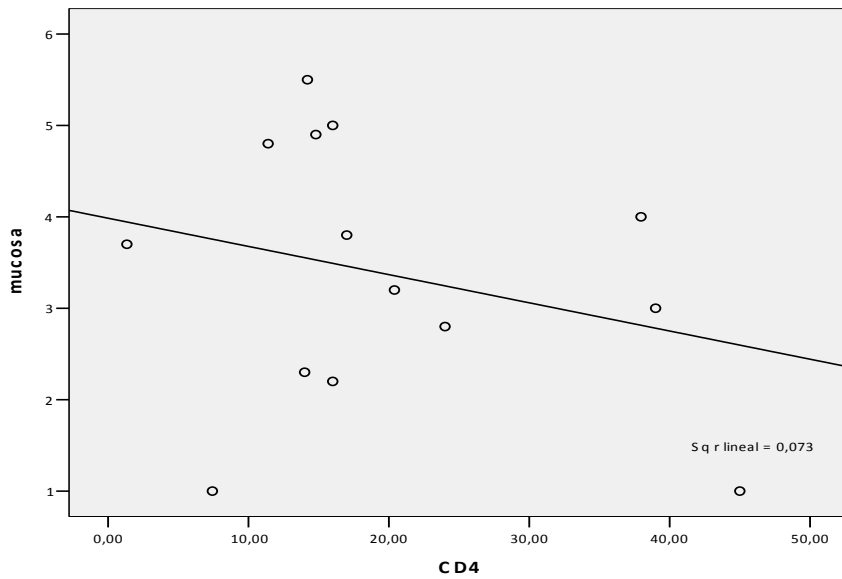


Tabla 2: Relación entre los CD4 y el porcentaje de virus presente en mucosa.

Relación entre el porcentaje de CD8 y el porcentaje de virus presente en mucosa

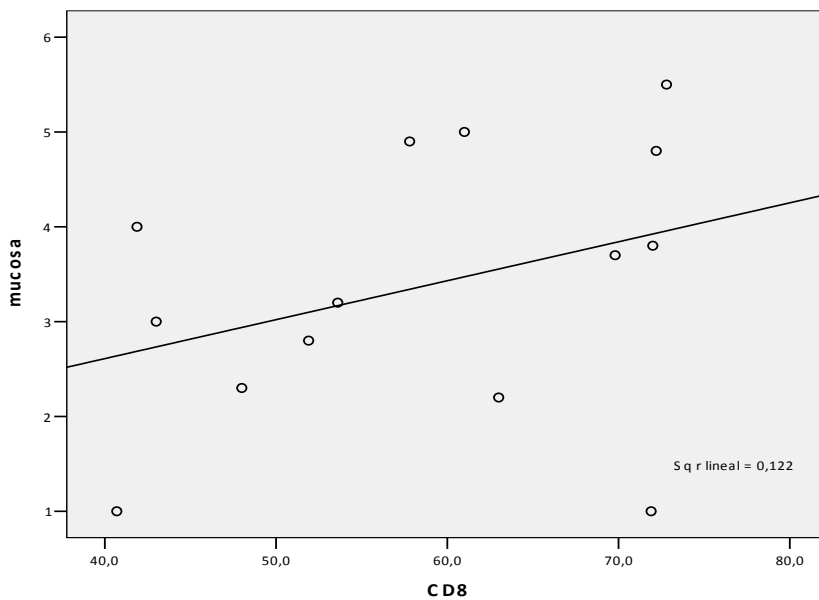


Tabla 3: Relación entre los CD8 y el porcentaje de virus presente en mucosa.

Se empleó el test de Anova de un factor, de comparación de medias, para comprobar si existía relación entre el estadio inmunológico del paciente con el porcentaje de virus en mucosa, obteniendo un valor  $p=0,831$ , no hallando por tanto diferencias significativas.

Tabla de relación entre el estadio inmunológico del paciente y el porcentaje de virus presente en mucosa:

Anova de un factor  
mucosa

ESTAD3	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Míni mo	Máxi mo
					Límite inferior	Límite superior		
1	8	3,21	1,224	,433	2,19	4,24	1	5
2	1	3,00	.	.	.	.	3	3
3	5	3,70	1,946	,870	1,28	6,12	1	6
Total	14	3,37	1,428	,382	2,55	4,20	1	6

mucosa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	,880	2	,440	,189	<b>,831</b>
Intra- grupos	25,629	11	2,330		
Total	26,509	13			

*Tabla 4: Relación entre el estadio inmunológico de paciente y el porcentaje de virus presente en mucosa.*

#### **Detección del VIH-1 mediante hibridación in situ:**

De los 17 pacientes sobre los que realizamos biopsias de mucosa bucal, en 14 se observaron señales de hibridación positiva (82,35%) (figura 6.a), los 3 pacientes sobre los que no se observaron señales de hibridación estaban en tratamiento antirretroviral en el momento del estudio y no presentaban carga viral detectable en el momento de la obtención de la biopsia.

En 6 de los 14 pacientes sobre los que se encontraron muestras positivas de hibridación, no presentaban VIH-RNA detectable en plasma.

La especificidad de la hibridación in situ se demostró por la ausencia de señales en las biopsias de mucosa bucal de los pacientes anti-VIH negativos; por la hibridación de las muestras con una sonda específica y por la ausencia de la sonda específica en la mezcla de hibridación. Ninguna señal de hibridación se observó en las biopsias de mucosa bucal que previamente habían sido digeridas con RNasa; sin embargo la digestión de DNasa de las muestras previas a la hibridación no modificó los patrones de hibridación (figura 7).

En las biopsias de mucosa bucal, las células teñidas se distribuían de manera aleatoria por el estrato basal, espinoso y granular. Las señales positivas se localizaron en el citoplasma de las células epiteliales, no observándose ninguna alteración patológica en estas células infectadas.

Se empleó el test de la T de Student para analizar los datos cuantitativos y el test de Spearman para ver las correlaciones; los valores se consideraron significativos para una  $p < 0,05$ .

La media de las células que mostraban VIH-RNA era de  $2,64\% \pm 1,77\%$  (rango 1%-5%). No se encontraron relaciones significativas entre el porcentaje de las células epiteliales que mostraban señales positivas y los niveles de viremia de VIH-1.

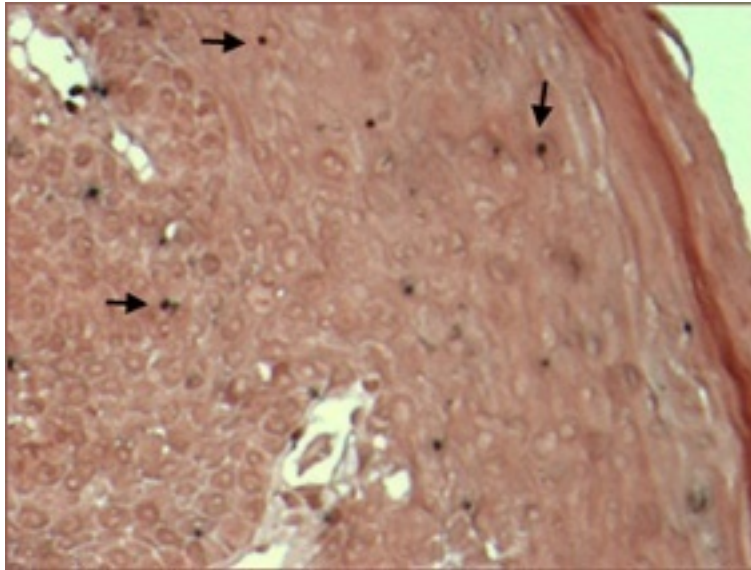
No se encontraron diferencias en la media del porcentaje de las células infectadas por VIH-1 de pacientes que presentaban VIH-1 RNA detectable e indetectable en plasma ( $3,01\% \pm 1,57\%$  vs.  $3,4\% \pm 1,27\%$  respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre pacientes en tratamiento con terapia antirretroviral y sin tratamiento ( $2,83\% \pm 1,63\%$  vs.  $3,42\% \pm 1,29\%$ , respectivamente).

Tampoco hubo diferencias significativas en la media del porcentaje de células infectadas en función del estado inmunológico, basados en la clasificación del CDC (categoría 1:  $2,49\% \pm 0,66\%$ ; categoría 2:  $3,50\% \pm 0,23\%$ ; categoría 3:  $3,98\% \pm 0,66\%$ )

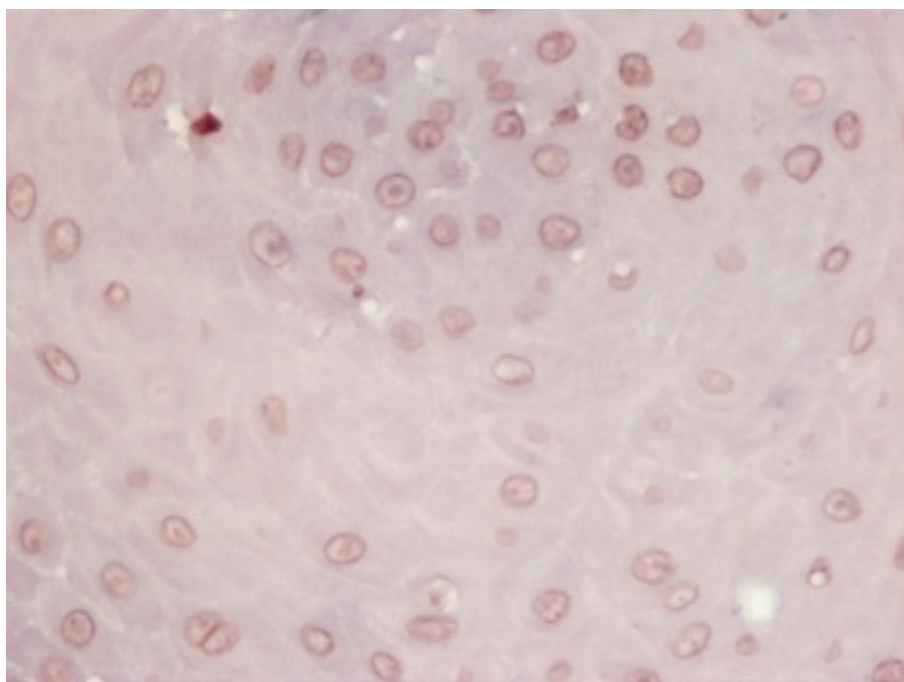
#### **Detección del Antígeno S-100, citoqueratinas y CD4:**

Para determinar los tipos celulares infectados por el VIH-1 en la mucosa bucal, se procedió a detectar el antígeno S-100 (un marcador de las células dendríticas) los queratinocitos y las células CD4, en las mismas muestras de mucosa donde previamente se realizó la hibridación in situ.

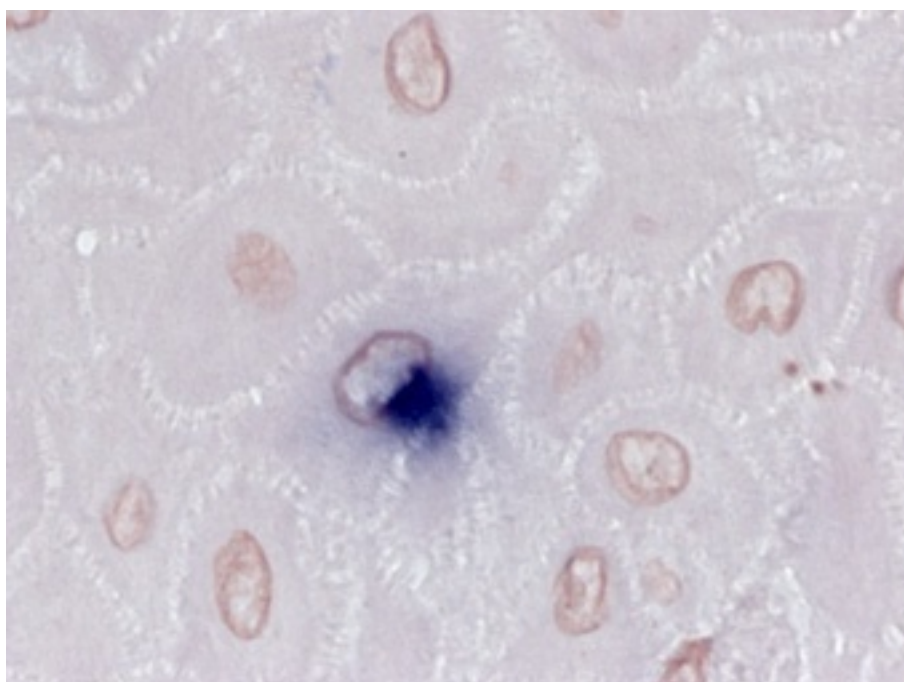
Como se muestra en la figura (figura 8) las señales de hibridación se localizaron en células que fueron positivas para citoqueratinas, así como en las células CD4+, pero no en las células positivas para el antígeno S-100.



*Figura 6.a: Hibridación in situ del VIH-1 ARN en biopsias de mucosa bucal de pacientes anti-VIH-1 positivos, x400.*



*Figura 6.b: Hibridación in situ del VIH-1 ARN en biopsias de mucosa bucal de pacientes anti-VIH-1 negativos, x400.*



*Figura 6.c: Señales de hibridación positivas, teñidas con safranina x1000.*

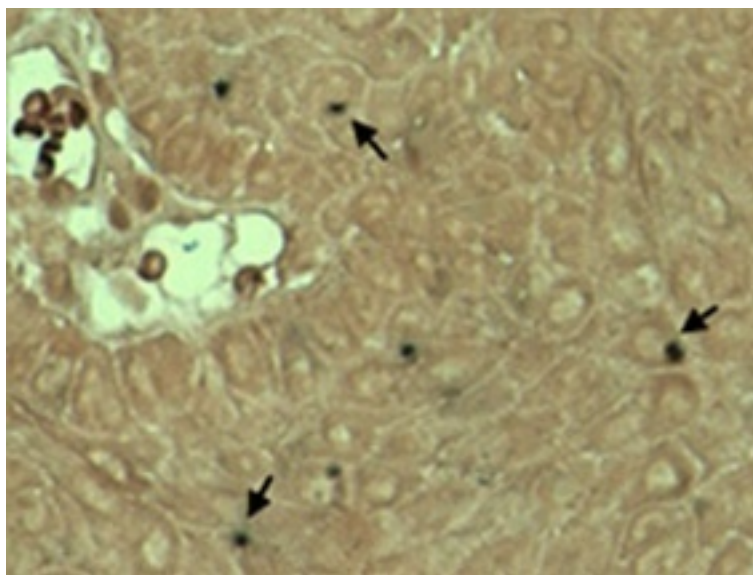
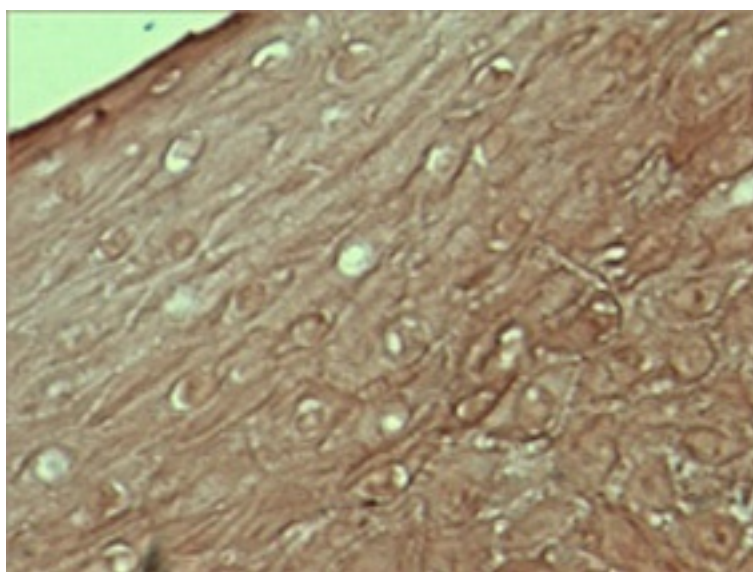
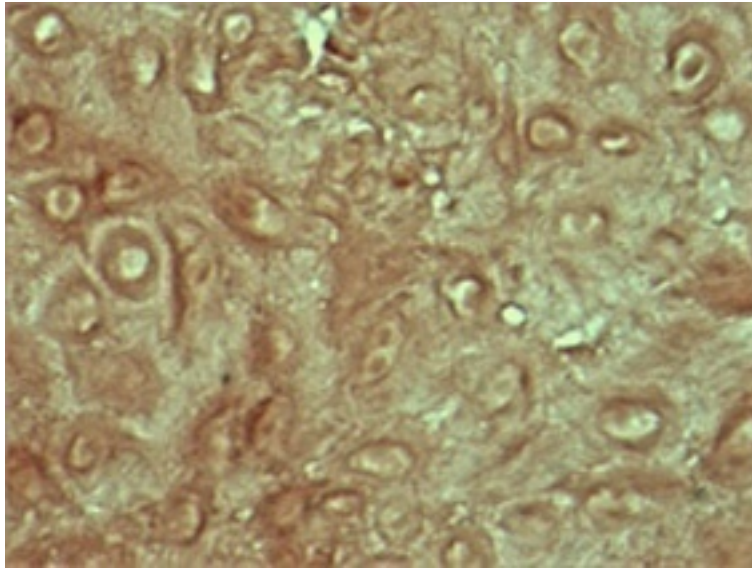


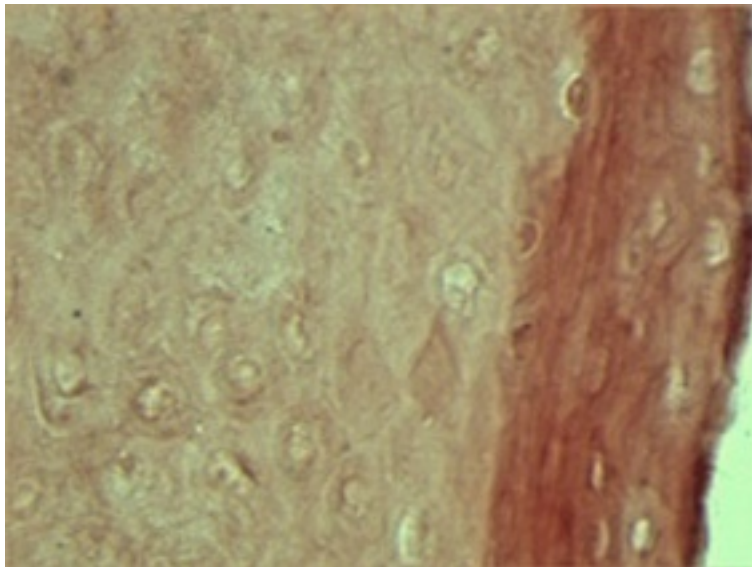
Figura 7: Controles específicos de la técnica de hibridación in situ:  
7.a) Digestión de DNAsa



7.b) Digestión de RNAsa



7.c) Hibridación con una sonda no relacionada:



7.d) Hibridación con ausencia de la sonda VIH-1 RNA:

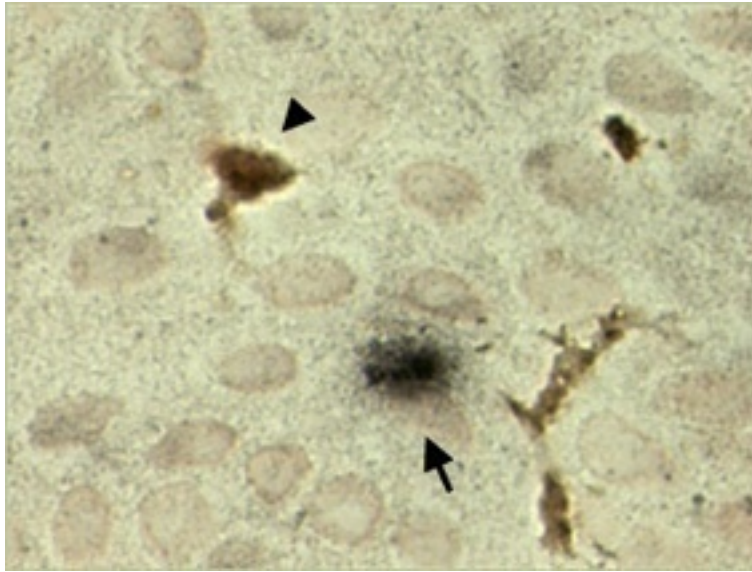
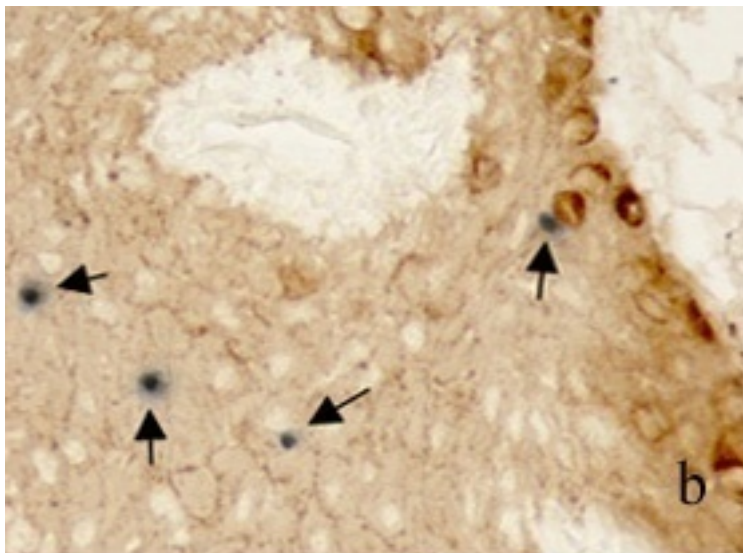
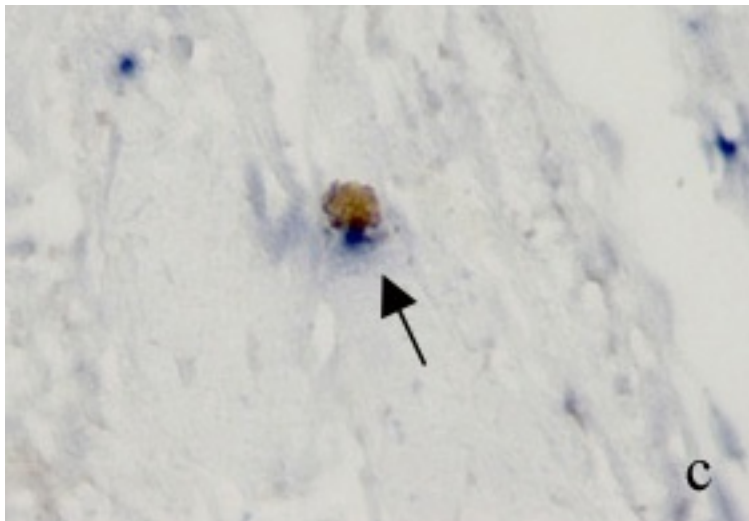


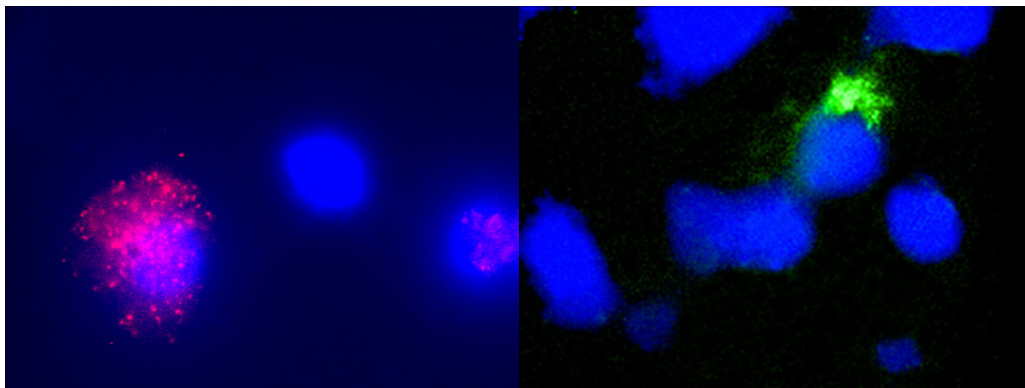
Figura 8:  
8.a) Detección simultánea del antígeno S-100 (triángulo) y del VIH-1 RNA (flecha), en secciones de mucosa bucal de pacientes infectados por el VIH-1. Magnificación original x1000:



8.b) Detección del VIH-1 RNA (flechas) en células positivas para citoqueratinas. Magnificación x400:



8.c) Detección del VIH-1 RNA en células CD4 positivas (flecha) en la mucosa bucal. Magnificación x400.



8.d) VIH en linfocitos en sangre periférica (rojo y verde).

## **Estudio 2: Pacientes VIH positivo y test de saliva Oraquick Avanced de Orasure.**

### **Datos de la infección por VIH**

Edad-Sexo:

De la muestra, 312 pacientes, un 92,95% eran hombres y un 7,05% mujeres (figura 9).

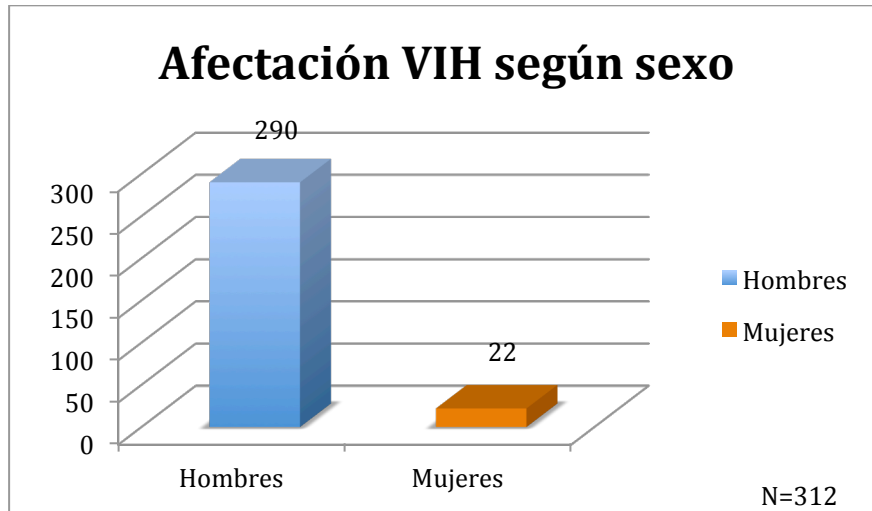


Figura 9: Afectación del VIH en función del sexo.

La edad media de afectación del VIH es de 43 años.

#### Mecanismos de transmisión:

Los mecanismos de transmisión del total de la muestra estudiada fueron (figura 10):

- Hombres que tienen sexo con hombres (HSH): 85,90% (268 pacientes)
- UDVP: 7,37% (23 pacientes)
- Heterosexuales: 6,41% (20 pacientes)
- Transmisión vertical: 0,32% (1 paciente)

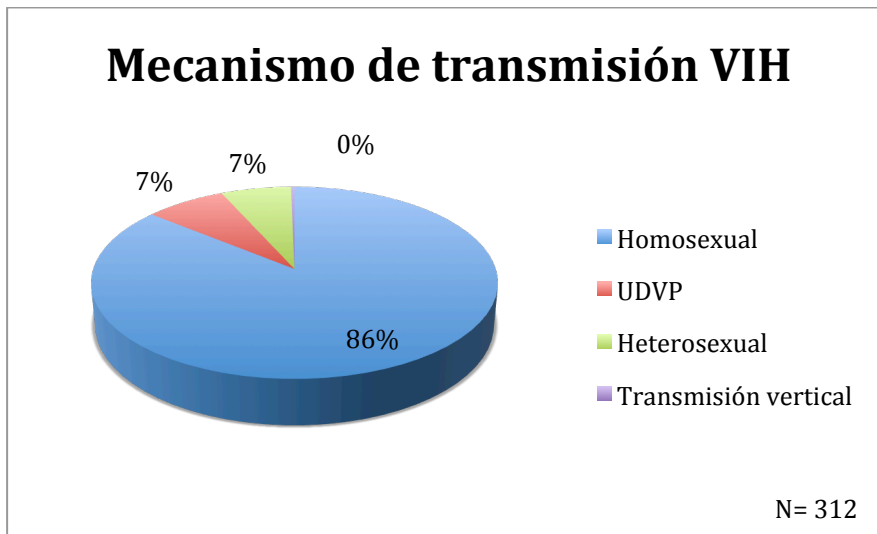


Figura 10: Mecanismos de transmisión del VIH.

El test resultó con una sensibilidad del 86,2% (269/312 pacientes) y una especificidad del 100% (70/70 pacientes) (figuras 11 y 12).

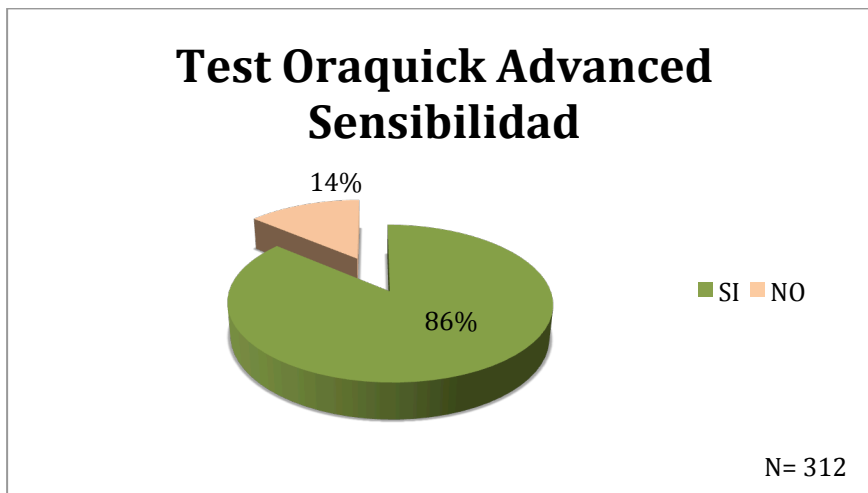


Figura 11: Sensibilidad del test Oraquick Advanced.

□

### Test Oraquick Advanced Especificidad

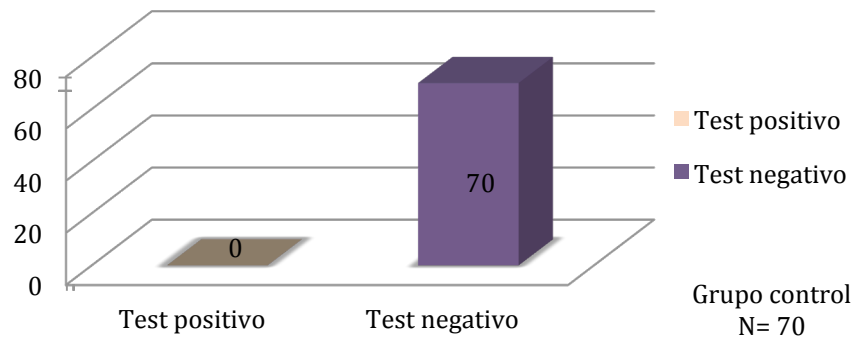


Figura 12: Especificidad del test Oraquick Advanced.

En cuanto al grupo de pacientes en los que el test de saliva fue positivo (269/312): un 45,3% de los pacientes (122/269) presentaban historial previo de al menos una enfermedad de transmisión sexual ( $p=0,740$ ) (figura 13); un 10% de estos pacientes habían padecido herpes simple ( $p= 0,881$ ), un 11,9% habían padecido sífilis ( $p= 0,960$ ), un 6,7% habían cursado gonorrea ( $p= 0,266$ ), un 2,6% proctitis ( $p= 0,285$ ), un 5,9% otras enfermedades de transmisión sexual , como proctitis, condilomas, etc... ( $p= 0,404$ ) (figura 14).

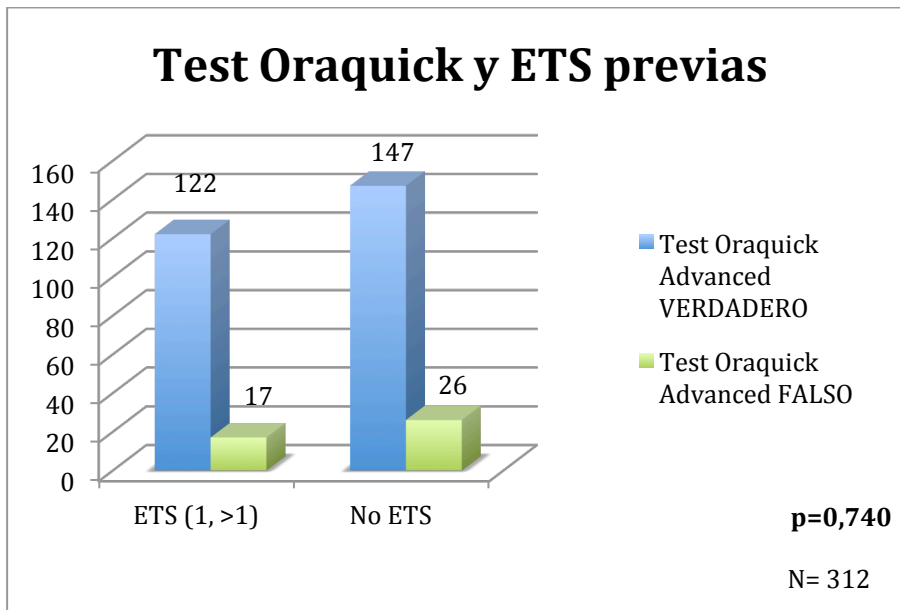


Figura 13: Enfermedades de transmisión sexual previas (ETS), en pacientes con test Oraquick Advanced positivo y negativo.

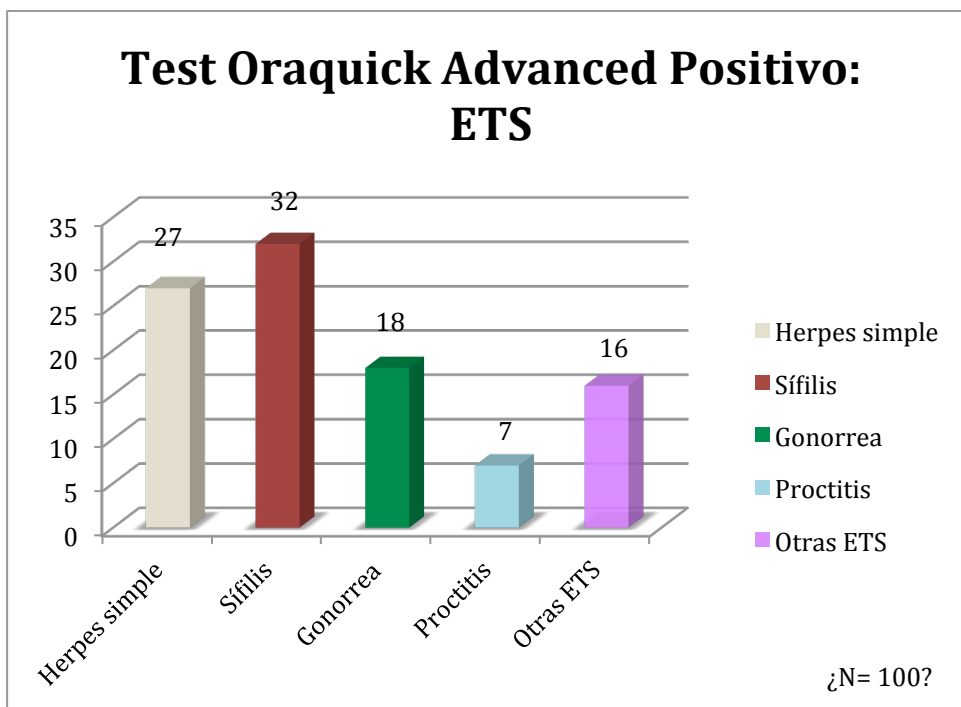


Figura 14: Tipos de enfermedades de transmisión sexual (ETS) en el grupo de pacientes con test Oraquick Advanced positivo.

Un 29,7% de los pacientes que presentaron el test positivo (80/269) eran fumadores ( $p= 0,384$ ) (figura 15). Un 6,7% de los pacientes con test positivo presentaban historial de consumo de otras drogas (18/269) como cocaína, heroína, etc... ( $p= 0,945$ ).

### Test Oraquick Advanced Positivo: Fumador

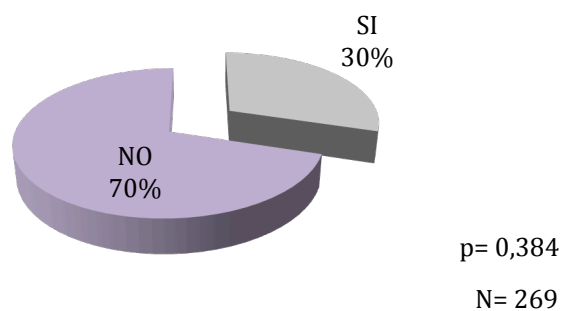


Figura 15: Pacientes fumadores con el test Oraquick Advanced positivo.

El 79,1% de los pacientes (212/269) con test positivo estaban en tratamiento antirretroviral (Tto ARV) ( $p= 0,004$ ) (figura 16).

### Test Oraquick Advanced Positivo: Tto ARV

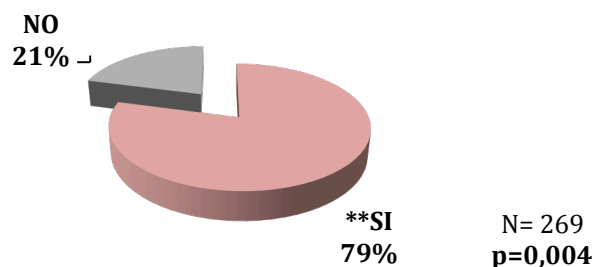


Figura 16: Pacientes en tratamiento anti-retroviral con el test Oraquick Advanced positivo.

Un 22,3% de los pacientes con test positivo (60/269) presentaron algún tipo de lesión oral en el momento del estudio ( $p=0,585$ ) (figura 17).

### Test Oraquick Advanced positivo: Lesión Oral

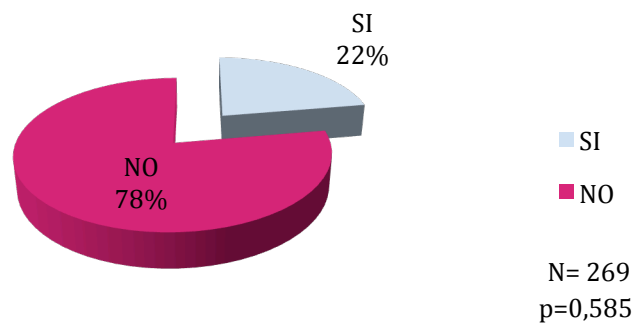


Figura 17: Pacientes con test Oraquick Advanced positivo y presencia de lesión oral.

Con respecto a la relación del resultado del test con el sistema inmune del paciente, el test positivo está relacionado con aquellos pacientes que presentan un menor valor en el cociente CD4/CD8 ( $p=0,009$ ) (figura 18).

En cuanto a la positividad del test y la relación con las células T4, T8 y la carga viral, no se encontraron resultados estadísticamente significativos (figura 18).

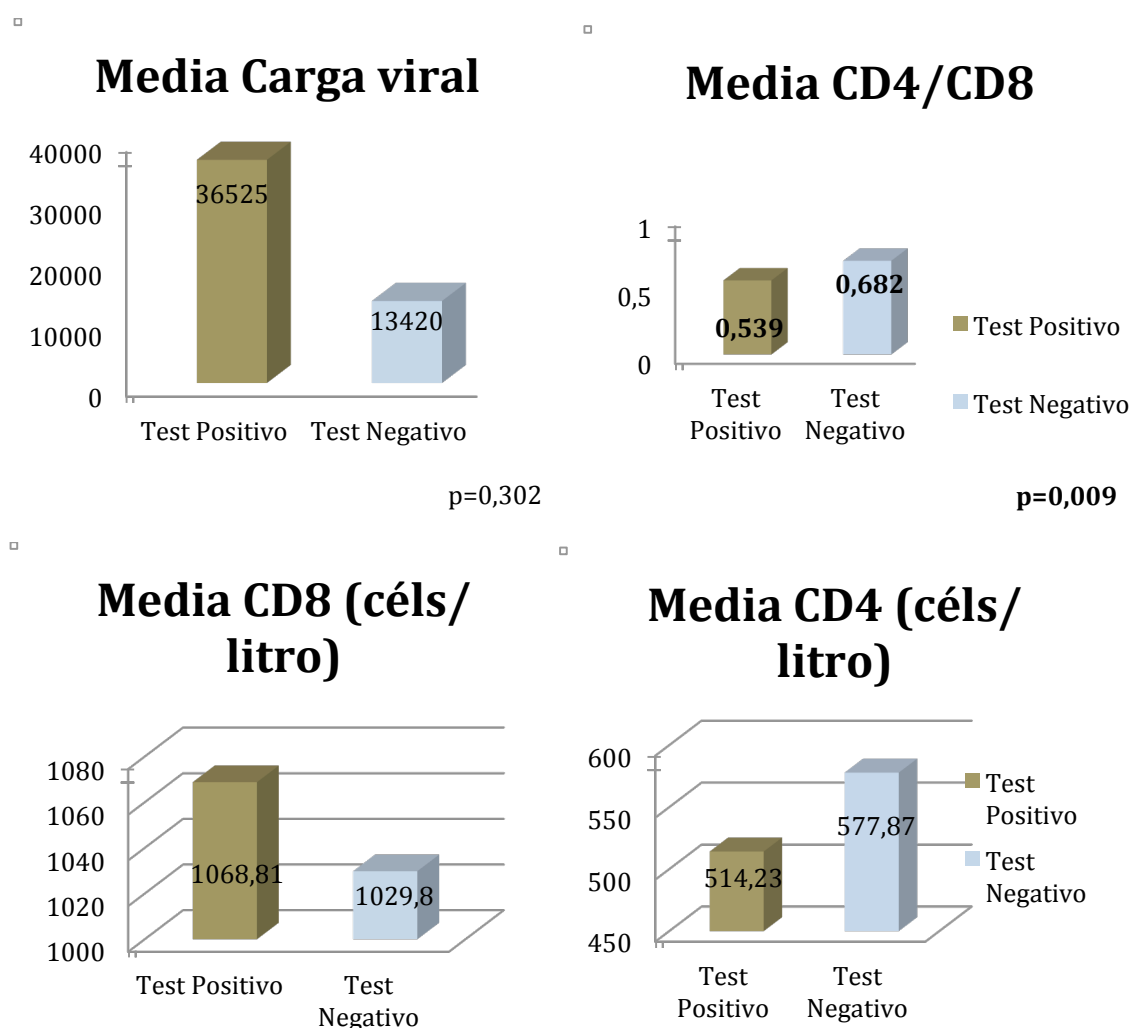


Figura 18: Resultados de Tests Oraquick Advanced positivo con respecto a la media de carga viral, media de CD4/CD8, media de CD8 y media de CD4.

### **Estudio 3: Pacientes VIH positivos, homosexuales con infección gonocócica subclínica.**

Para valorar la presencia de la infección gonocócica, los pacientes que participaron estaban asintomáticos y no habían tenido signos de uretritis ó proctitis en los últimos 6 meses; se tuvieron en cuenta los

pacientes VIH positivos y homosexuales, con lo cual la muestra inicial de 312 pacientes se redujo a 265 pacientes.

Con respecto a la patología previa, del total de la muestra, un 6,8% de los pacientes (18/265) presentaban el virus de la hepatitis C (VHC), un 11,7% (31/265) el virus de la hepatitis B (VHB), un 3,8% (10/265) presentaban mantoux positivo (figura 19).

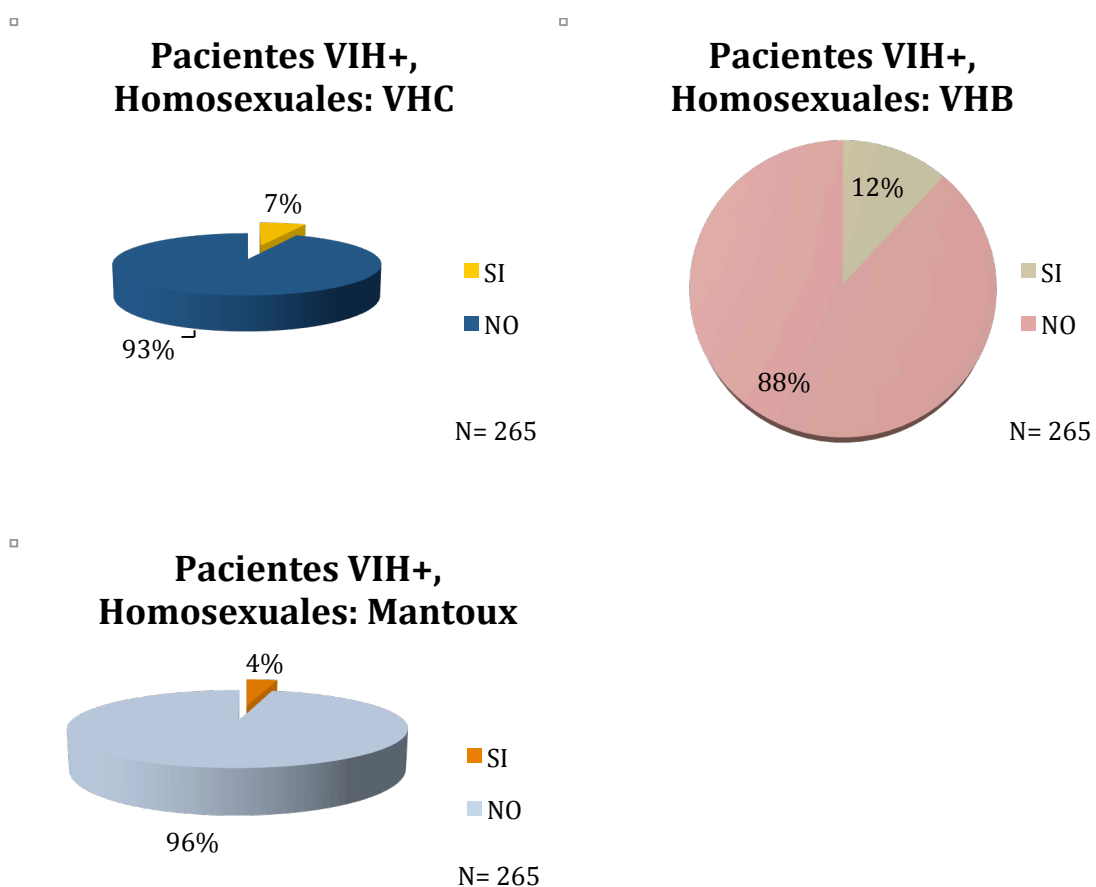
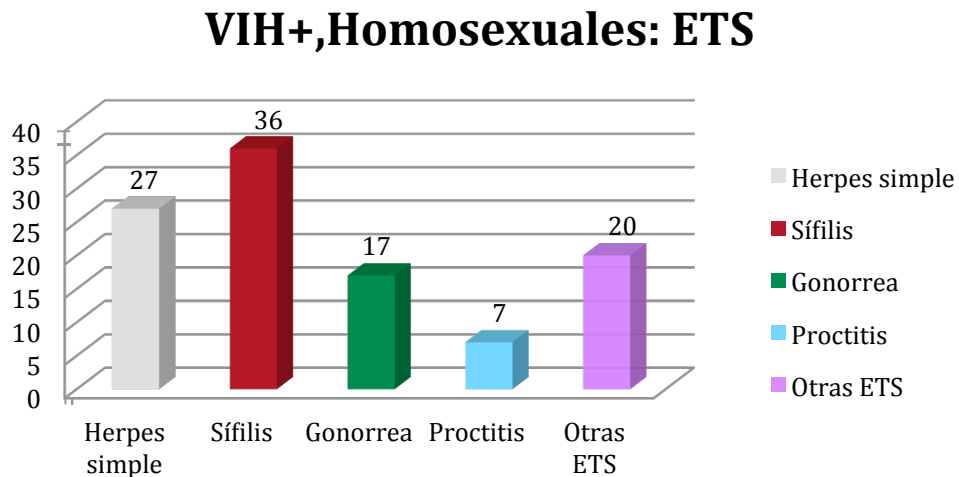


Figura 19: Patología previa en pacientes VIH+, homosexuales: VHC, VHB y mantoux.

Un 42,3% de los pacientes (113/265) habían padecido al menos una ó más de una enfermedad de transmisión sexual (ETS) previa, nunca en los

6 meses anteriores a la realización del estudio. De las enfermedades de transmisión sexual valoradas un 10,2% ha padecido herpes simple, un 13,6% sífilis, un 6,4% gonorrea, un 2,7% proctitis y un 7,6% otras enfermedades de transmisión sexual como uretritis, condilomas, etc... (figura 20).



*Figura 20: Enfermedades de transmisión sexual en pacientes VIH+, homosexuales, nunca en los 6 meses anteriores a la realización del estudio.*

Respecto a los hábitos tóxicos, un 25,7% eran fumadores, un 9,8% tenían antecedentes de etilismo y un 4,2% ingerían otro tipo de drogas como cocaína ó heroína.

En cuanto a la terapia antirretroviral, 81,5% de los pacientes (216/265) estaban en tratamiento anti-retroviral (figura 21). En relación a la patología oral asociada, 18,9% de los pacientes presentaban algún tipo de lesión oral (figura 22).

### VIH, Homosexuales: Tto ARV

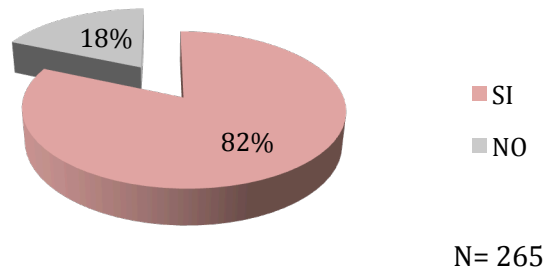


Figura 21: Porcentaje de pacientes VIH+, homosexuales que estaban en tratamiento anti-retroviral.

### VIH+, Homosexuales: Lesión Oral

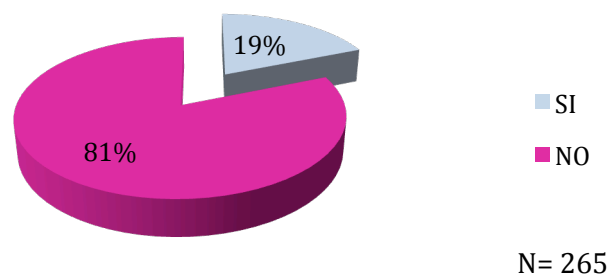


Figura 22: Presencia de algún tipo de lesión oral en pacientes VIH+, homosexuales.

Para valorar la presencia de la infección gonocócica subclínica, se realizaron frotis faríngeos a los pacientes (265 pacientes). De este grupo al que se le realizó el frotis faríngeo, un 9,46% (25 pacientes) presentaron infección por *neisseria gonorrhoeae* (figura 23).

### VIH+, Homosexuales: Gonococo+

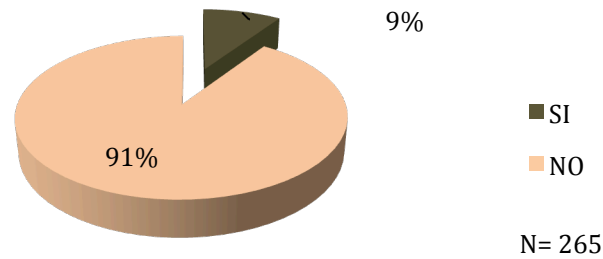


Figura 23: Porcentaje de pacientes VIH+, homosexuales en los que se halló la presencia de gonococo en el frotis faríngeo.

Entre las razas de *neisseria gonorrhoeae* aisladas, 52,2% eran sensibles a penicilina, 48% sensibles a tetraciclinas, el 48% sensibles a ambos antibióticos (12/25 pacientes); el 100% eran sensibles a ciprofloxacino y ceftriaxona (25 pacientes) (figura 24).

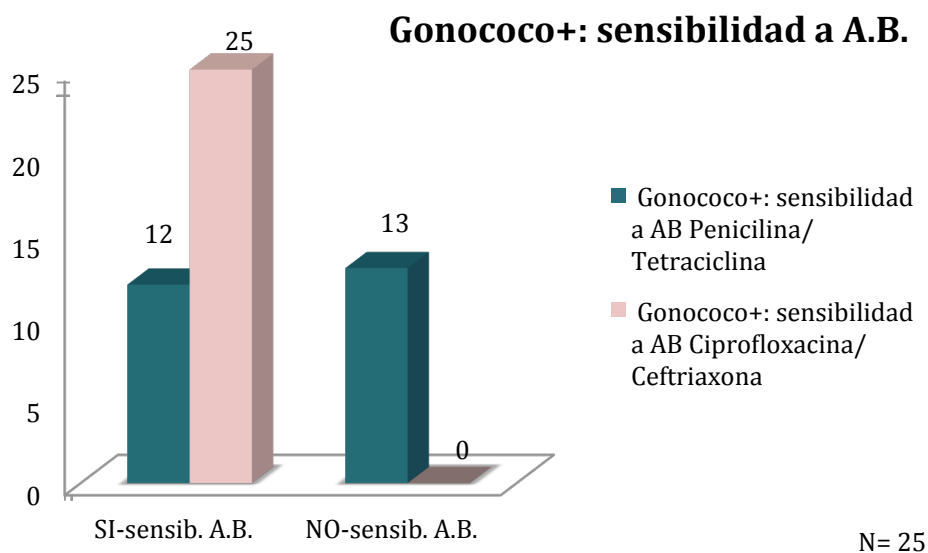
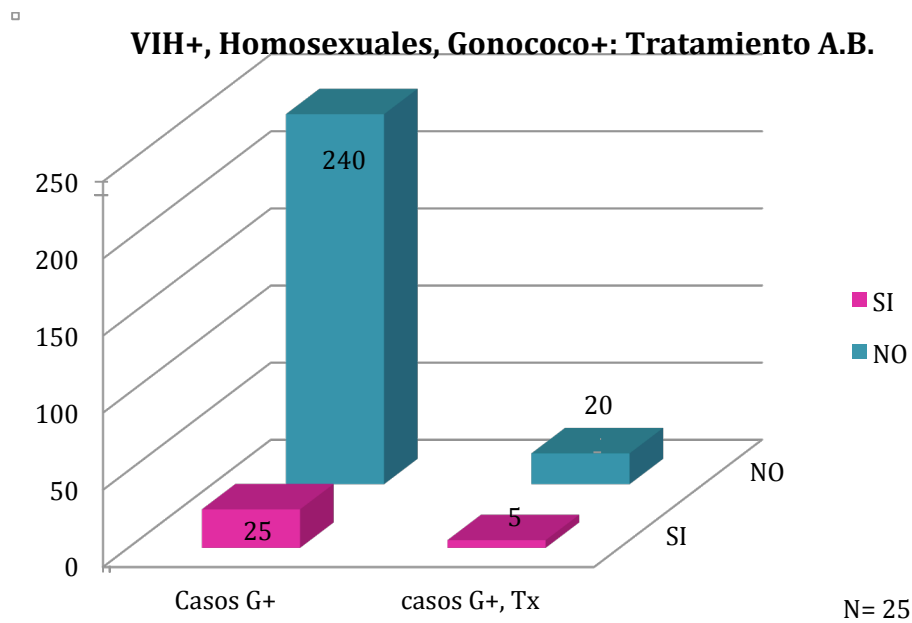


Figura 24: Pacientes con gonococo positivo sensibles a Penicilina/Tetraciclina y sensibles a ciprofloxacino/ceftriaxona.

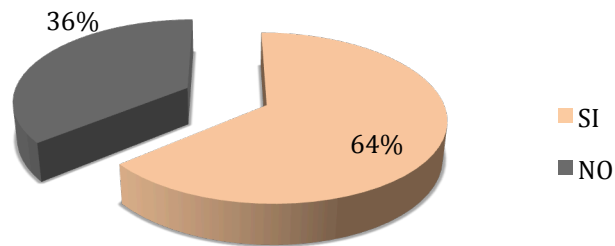
Aquellos pacientes que volvieron a consulta dentro de los 15 días posteriores al resultado del frotis, 20% (5 pacientes), recibieron tratamiento antimicrobiano con ceftriaxona 250mg en una inyección intramuscular como dosis única y en la repetición del frotis faríngeo el resultado fue negativo (figura 25).



*Figura 25: Pacientes VIH+, homosexuales con presencia de gonococo que recibieron tratamiento antimicrobiano.*

A los pacientes que regresaron a consulta pasados 15 días, 44% (11 pacientes), se les repitió el frotis faríngeo sin haber instaurado tratamiento alguno y en todos ellos el resultado fue negativo (figura 26).

### Gonococo+: 2º frotis

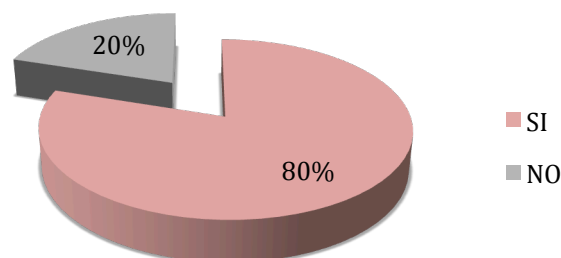


N= 25

Figura 26: Pacientes VIH+, homosexuales, gonococo positivo, a los que se les realizó un segundo frotis a los 15 días del primero, independientemente de haber recibido tratamiento antimicrobiano.

En el grupo de pacientes con Gonococo positivo un 80% (20/25 pacientes) ( $p=0,838$ ) estaban en tratamiento ARV (figura 27), un 12% (3/25 pacientes) presentaban algún tipo de lesión oral ( $p=0,356$ ), un 12% (3/25 pacientes) ingerían algún tipo de droga (cocaína, heroína) ( $p=0,039$ ) (figura 28).

### Gonococo+: Tx ARV



p= 0,838

N= 25

Figura 27: Pacientes VIH, homosexuales, gonococo positivo, que estaban en tratamiento antirretroviral.

### Gonococo+: Otras drogas

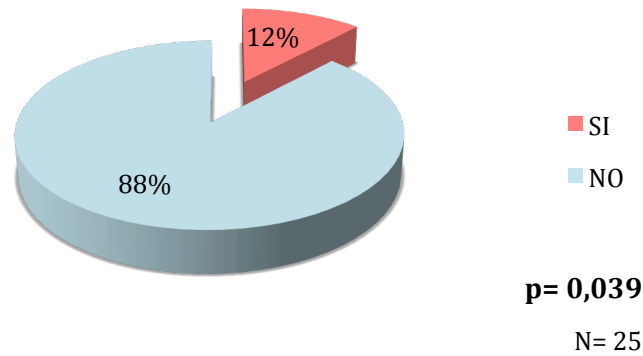


Figura 28: Pacientes VIH+, homosexuales, gonococo+, que ingerían algún tipo de droga (cocaína, heroína).

Del grupo de pacientes VIH+, homosexuales y gonococo positivo, un 40% (10/25 pacientes) ( $p=0,041$ ) tenían antecedentes de alguna ETS (figura 29), no en los 6 meses previos a la realización del estudio, un 60% ( $p=0,720$ ) presentaban una carga viral indetectable, inferior a 20 copias/ml, y la media de células CD4 era de 551 céls/ml ( $p=0,599$ ) (tabla 5).

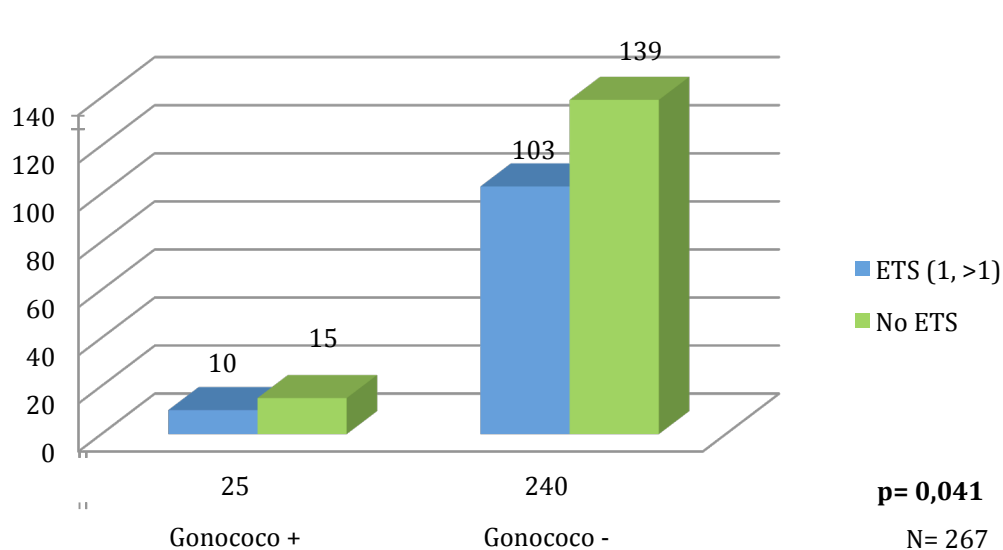


Figura 29: Pacientes VIH+, homosexuales con antecedentes de al menos 1 ETS, nunca en los 6 meses previos a la realización del estudio.

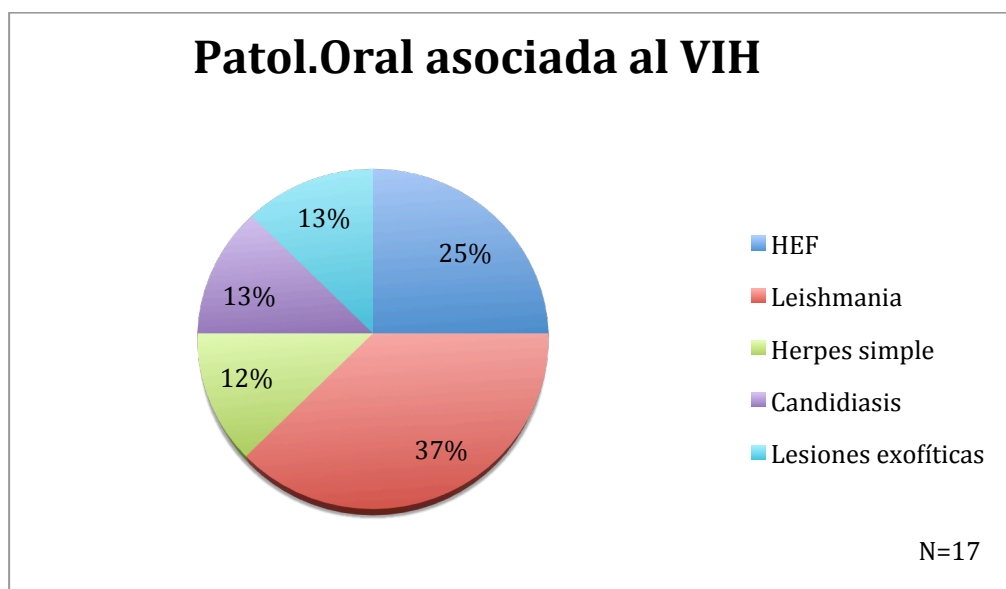
Grupos	Gonococo+	Gonococo-	Valor p
Tratamiento ARV	80%	81,7%	0,838
Lesión oral	12%	19,6%	0,356
Drogas	12%	3,3%	0,039
ETS (1 ó >1)	32%	16,1%	0,041
Carga viral (<20 c/ml)	60%	63,3%	0,720

Tabla 5: Comparativa del grupo de pacientes con y sin presencia de gonococo respecto al tratamiento anti-retroviral, presencia de lesión oral, consumo de drogas, presencia de enfermedades de transmisión sexual (ETS) y carga viral inferior a 20 copias/ml.

Con respecto a la **patología oral de todos los pacientes estudiados**; encontramos las siguientes afectaciones en mucosa bucal:

**Estudio 1:** en cuanto a patología oral de los pacientes en los que se realizó la técnica de hibridación in situ en mucosa bucal observamos que

una gran parte presentaban leishmania en mucosa bucal, 37,50%, diagnosticada mediante análisis anatomopatológico con tinción de giemsa (figuras 37, 38, 39 y 40), un porcentaje menor, 25%, presentaban hiperplasia epitelial focal (HEF) (figuras 33, 34, 35 y 36), y el resto de patología oral que hallamos fueron herpes simple, 12,5% (figura 32), candidiasis, 12,5% (figura 44), y lesiones exofíticas, 12,5% (figura 30).



*Figura 30: Patología oral asociada a pacientes VIH positivos pertenecientes al estudio 1, en los que se realizó la biopsia de mucosa bucal para valorar la presencia del virus mediante hibridación in situ.*

**Estudios 2 y 3:** Respecto patología oral en pacientes VIH positivos a los que se les realizó los tests de diagnóstico en saliva y el frotis faríngeo para valorar la presencia de la infección gonocócica, la mayoría de los pacientes, 38,33%, presentaron lengua saburral ó vellosa, un 35% presentaron candidiasis (figura 44), un 8%, presentaron leucoplasia vellosa (figura 41 y 42), un 6,67% presentaron úlceras o aftas a nivel oral, un 5% presentaron sarcoma de Kaposi (figura 45 y 46), y el resto de patologías observadas fueron papilomas, 1,67%, carcinoma a nivel lingual, 1,67%,

hiperplasia epitelial focal (HEF) (figura 33), 1,67%, y periodontitis ulcero necrotizante (PUN), 1,67% (figura 31 y 48).

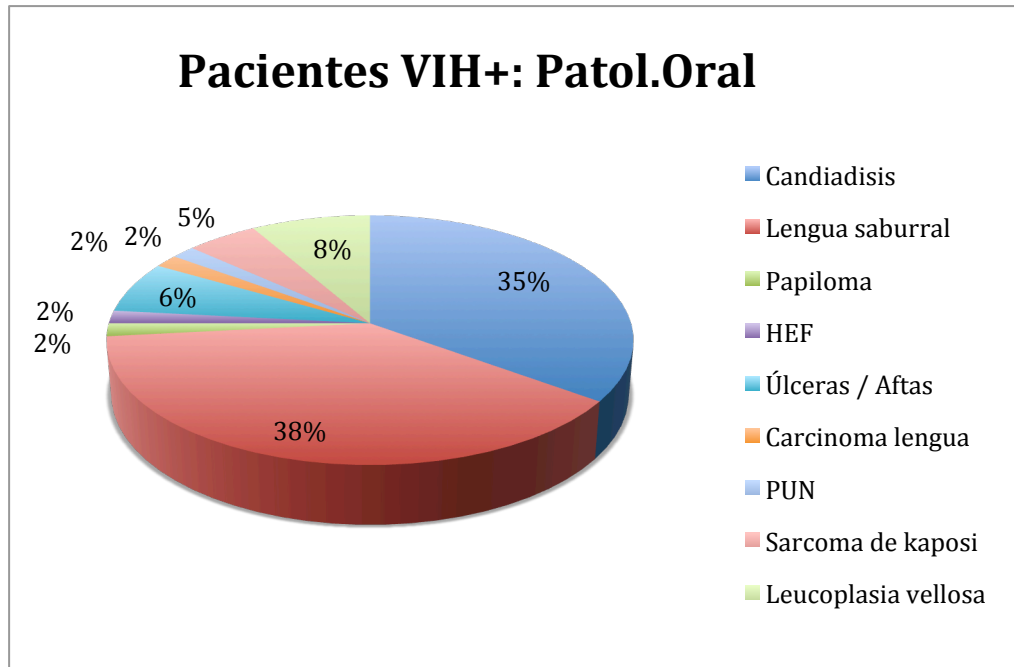


Figura 31: Patología oral de pacientes VIH positivos de los estudios 2 y 3, de los pacientes VIH a los que se les realizó el test oraquick advanced y el frotis faríngeo.

**Fotografías clínicas:**



*Figura 32: Herpes simple perioral en paciente VIH.*



*Figura 33: Hiperplasia epitelial focal en paciente VIH.*



*Figura34: HEF en paciente VIH positivo.*



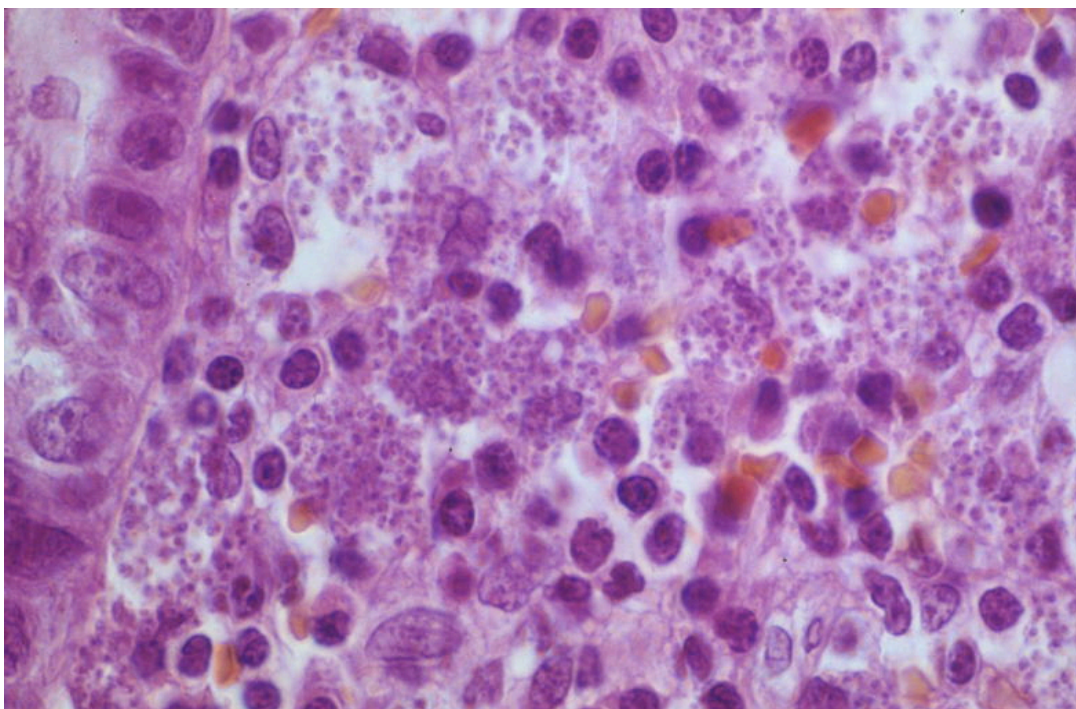
*Figura 35: Lesiones intraorales en caso anterior.*



Figura 36: Lesiones por *Mycobacterium Avium intracellulare* (MAI). Verrugas en zona perioral.



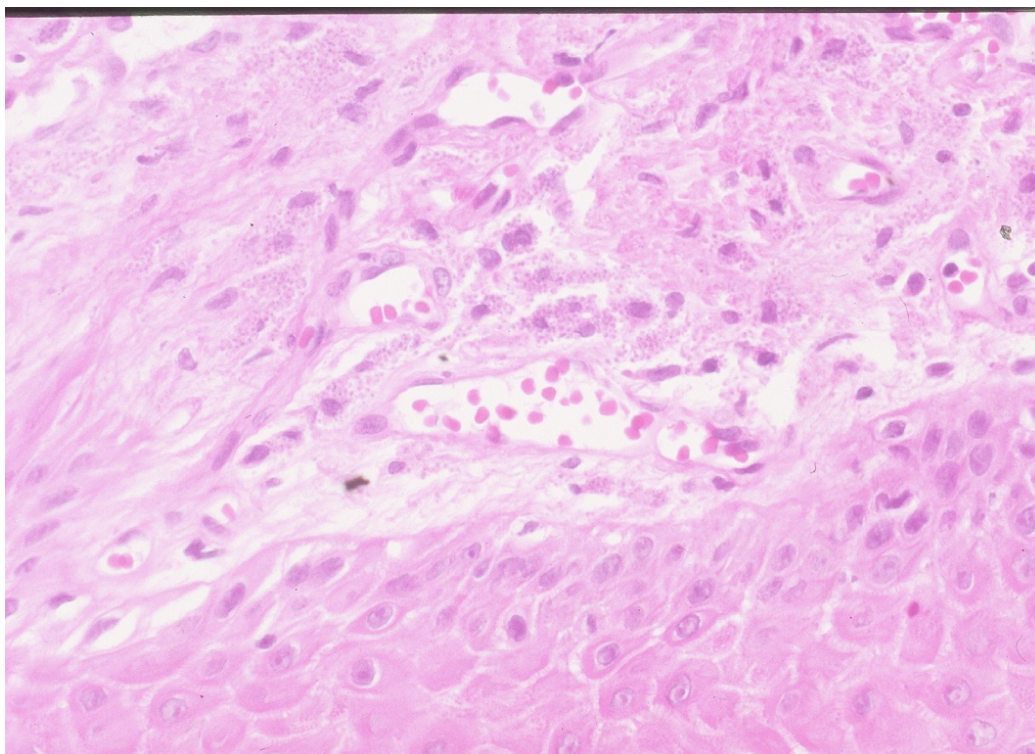
Figura 37: Leishmaniasis visceral: lesiones intraorales.



*Figura 38: Histología de leishmaniasis, caso anterior.*



*Figura 39: Paciente VIH positivo con leishmania en mucosa bucal.*



*Figura 40: Histología de leishmaniasis en mucosa bucal del paciente anterior.*



*Figura 41: Leucoplasia vellosa en borde lateral de lengua.*



*Figura 42: Leucoplasia vellosa en borde lateral de lengua.*



*Figura 43: Lesiones intraorales por linfoma.*



*Figura 44: Candidiasis oral.*



*Figura 45: Sarcoma de Kaposi (SK).*



*Figura 46: Sarcoma de Kaposi.*



*Figura 47: Sífilis.*



*Figura 48: PUN en paciente VIH positivo.*



*Figura 49: Síndrome de Stevens-Johnson por Abacavir.*



*Figura 50: Pigmentación lineal por AZT.*

## **V. DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

### **ESTUDIO 1:** Pacientes VIH positivos, en los que se realizó a técnica de hibridación in situ en mucosa bucal.

#### **Sexo y Edad:**

Observamos una edad media de afectación del VIH de 38 años. Según el informe anual de Sida del Instituto de Salud Carlos III, la edad media de afectación de Sida ha pasado de 31 años en 1990 a 40 años desde 2005 a la actualidad, siendo siempre mayor en hombres que en mujeres; datos que concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio donde también los hombres se caracterizaron por ser de mayor edad.

#### **Mecanismos de transmisión**

Al ser la serie un poco antigua, la mayoría de los pacientes que participaron eran adictos (AVDP), perteneciendo a este grupo más de la mitad de los casos, seguidos por el grupo de hombres que tienen sexo con hombres y finalmente el grupo de transmisión heterosexual.

Con respecto al informe nacional de VIH-Sida del Instituto de Salud Carlos III, un 48,9% de los casos infectados por el VIH fue debido a la ADVP (48,3% mujeres y 39,4% hombres), un 31,1% de los casos se debieron a la infección a través de relaciones heterosexuales no protegidas (siendo más frecuente en hombres que en mujeres) y la tercera vía de transmisión más frecuente han sido las relaciones de hombres que tienen sexo con hombres, que suponen el 13,6% de todos los casos (Informe Nacional de Sida, Junio 2006).

En 2005, la categoría de transmisión más frecuente entre los hombres fue en un 50% la ADVP, seguida de la vía heterosexual y de la transmisión entre hombres que tienen sexo con hombres; en cuanto a mujeres, los casos atribuidos a transmisión heterosexual superan a los diagnosticados en mujeres ADVP, alcanzando una proporción 53,9% y 36,8% respectivamente (Informe Nacional de Sida, Junio 2006).

Es importante destacar el progresivo aumento de los casos de sida atribuidos a transmisión heterosexual, del 8% de 1990 hasta casi el 40% de 2005, llegando al 85% en 2012 a nivel mundial <sup>22</sup>.

En 2007, el mecanismo de transmisión más frecuente sigue siendo los ADVP aunque con un descenso del 21% respecto al anterior, seguido de la transmisión heterosexual, también un 24% inferior respecto de 2006 y por último las relaciones sexuales entre hombres que tienen sexo con hombres, un 19% inferiores al año anterior (Informe Nacional de Sida, Junio 2008).

Observamos respecto a nuestro estudio un ascenso notable del número de casos debido a relaciones heterosexuales no protegidas, esto puede ser debido a que los pacientes que intervinieron en el estudio eran remitidos en su totalidad por el Servicio de Enfermedades Infecciosas de la Fundación Jiménez Díaz, donde la mayor parte de los pacientes provenían de centros de atención a usuarios de drogas vía parenteral (ADVP) de la Comunidad de Madrid, con lo que el grueso del estudio eran pacientes adictos o en vías de recuperación.

## Patología bucal asociada

Todas las personas infectadas por el VIH, tienen más necesidades de salud bucodental, en especial en lo que respecta a las periodontopatías. Es importante el estudio de las lesiones bucodentales como indicadores de la infección por el VIH, siendo uno de los indicadores más tempranos e importantes de la infección por VIH <sup>271</sup>.

De los pacientes estudiados, un tercio, presentaban alguna patología oral asociada, de ellos observamos la presencia de leishmaniasis en un 45,45%, un 18,18% presentaban hiperplasia epitelial focal y un 18,18% candidiasis; siendo el porcentaje de casos que presentaban candidiasis similar al señalado por el Informe Nacional de Sida del Instituto de Salud Carlos III, de Junio de 2006. A pesar de no ser la candidiasis oral una de las manifestaciones orales más frecuentes en los pacientes estudiados, hemos de señalar que todos los pacientes referían haber sufrido candidiasis orofaríngea en algún momento del curso de su enfermedad. El tipo de paciente es de un nivel socioeconómico bajo y con una inmunosupresión moderada.

A nivel internacional, se han identificado y evaluado siete lesiones fundamentales: candidiasis oral, leucoplasia vellosa, sarcoma de kaposi, eritema gingival lineal, gingivitis ulceronecrotizante aguda (GUN), periodontitis ulceronecrotizante aguda (PUN) y linfoma no hodgkin; las cuales aparecen estrechamente relacionadas con la infección por VIH y se dan tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Estas lesiones afectan a la mayoría de los afectados por el virus en algún momento de su evolución. Hemos de tener en cuenta que la terapia antirretroviral puede alterar la prevalencia de las lesiones relacionadas con el VIH <sup>271</sup>.

Principalmente las lesiones orales son más significativas en los estadios iniciales de la enfermedad y pueden predecir la progresión de la infección del VIH en su evolución a sida. Estas lesiones pueden estar presentes hasta en la mitad de las personas con infección por VIH y hasta en un 80% de aquellas personas diagnosticadas de sida <sup>263</sup>. Estas lesiones están asociadas a un descenso en el número de linfocitos CD4+ y un aumento de la carga viral <sup>272</sup>.

En el caso en el que el estadio del VIH de una persona no se conozca, las lesiones orales son un indicador muy fiable de la presencia de infección por VIH <sup>222, 223, 235, 281</sup>; por ello son un criterio importante para el tratamiento y profilaxis en los programas de prevención del VIH <sup>263</sup>.

Con la aparición de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), la prevalencia de candidiasis orales, leucoplasia vellosa, lesiones periodontales asociadas al VIH, etc... han disminuido en adultos; sin embargo, se ha observado un aumento en las lesiones orales por el virus del papiloma humano (VPH): condilomas, papilomas e hiperplasia epitelial focal; así como en las alteraciones de glándulas salivares <sup>235, 271, 273</sup>.

De ahí que en nuestro estudio, en los que más de la mitad de los pacientes están en tratamiento con TARGA, observamos una diferencia en el tipo de lesiones orales encontradas con respecto a la clasificación general antes mencionada, aunque sería necesario un mayor número de pacientes para obtener resultados con mayor peso científico.

A nivel global se ha reconocido que los datos sobre la incidencia de la coinfección leishmaniasis-VIH ha sido subestimada en parte porque la leishmaniasis visceral se da con mayor frecuencia en poblaciones

marginales y porque no está recogida en el listado de infecciones oportunistas presentadas por el Centro de control de Enfermedades (Center of Disease Control, CDC), así que rara vez es notificada en los datos generales que se publican sobre Sida <sup>250</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio es de especial importancia el porcentaje tan elevado de casos de leishmaniasis en pacientes infectados por el VIH, pudiéndose atribuir al hecho de que los pacientes incluidos en el estudio son de clase social baja, muchos de ellos han vivido en las calles lo cual puede haber favorecido el contacto y posterior contagio con la leishmania.

En datos recogidos por la OMS, el país del Sur de Europa que registró más casos de coinfección leishmania-VIH, ha sido España y puede estar influenciado por el hecho de que la mayoría de los contagios por VIH se dan en UDVI y la coinfección por leishmaniasis se puede deber al uso de jeringuillas infectadas por leishmania <sup>250, 274</sup>. Además se ha comprobado que la coinfección leishmania-VIH induce una activación crónica del sistema inmune y por tanto un aumento de la carga viral y acelera la progresión a Sida, al mismo tiempo las alteraciones inmunológicas producidas por el VIH son especialmente favorables para la multiplicación descontrolada del parásito <sup>250</sup>.

Un dato importante es la posible interacción entre los microorganismos presentes en la cavidad bucal y el VIH <sup>183</sup>. Se ha observado que el descenso de casos que presentan candidiasis oral pueda ser debido a que el tratamiento antirretroviral inhibe proteasas de la cándida y sin embargo el aumento en la prevalencia de lesiones exofíticas a nivel oral, se deba al tratamiento de estos pacientes con inhibidores de la proteasa, como observamos en tres pacientes que presentan lesiones exofíticas a nivel oral en nuestro estudio.

Algunos autores resaltan la capacidad del virus del herpes humano (VHH) de aumentar la replicación del VIH-1 tanto in vitro como in vivo. Muchos pacientes VIH+ están infectados por herpesvirus: citomegalovirus, virus del herpes simple, virus varicela zoster, herpesvirus humano-8 (VHH-8 ó Sarcoma de Kaposi) los cuales tienen capacidad de aumentar la infectividad del VIH+, debido a la interacción entre los dos virus ó debido a los efectos secundarios resultantes de la liberación de factores celulares en respuesta a la infección <sup>183</sup>.

## **BIOPSIAS DE MUCOSA BUCAL**

Se realizaron biopsias de mucosa bucal con el fin de comprobar la existencia del virus en mucosa, así como comprobar su localización exacta y ver si existían correlaciones entre el porcentaje de virus encontrado en mucosa y los valores serológicos del paciente.

### **Porcentaje de virus presente en mucosa bucal y valores serológicos**

En la infección por el VIH-1 se distinguen tres períodos:

- La primoinfección, durante la cual el virus se propaga extensamente por los órganos linfoides y se caracteriza por los altos niveles de viremia, con un tiempo de duración de dos a seis semanas.
  
- La infección crónica asintomática, de diez años de duración como media y se caracteriza por niveles de células CD4+ relativamente estables aunque con tendencia a disminuir.

- La infección avanzada ó sida, en la que el recuento de células CD4+ son inferiores a 200 céls/microlitro <sup>87</sup>.

Buscamos una relación entre los valores CD4, CD8 y carga viral (parámetros de estado inmunológico del paciente) y la presencia del virus en mucosa, con el fin de ver si existía una relación entre grado de inmunosupresión e infectividad del virus en mucosa bucal. En cuanto a la correlación entre el porcentaje de linfocitos CD8 y el porcentaje de virus en mucosa se observó una relación directa: a mayor porcentaje de virus en mucosa, mayor número de linfocitos CD8; indicativo de valores más elevados de los linfocitos CD8, por lo tanto la infección es más manifiesta en el paciente, así como el porcentaje de virus que se encuentra en mucosa. A pesar de no encontrar valores significativos, esto, puede ser debido a que el valor donde no se encuentra esta relación directa se corresponde con un paciente con unas características especiales: pertenece a la categoría clínica A2, presenta una carga viral indetectable, tiene un porcentaje de linfocitos CD4 superior al 28% y está en tratamiento con terapia antirretroviral, lo cual nos indica que la infección por VIH está controlada y en una fase de latencia ó asintomática pudiendo justificar el bajo porcentaje de virus presente en mucosa.

Con respecto a los valores de linfocitos CD4 y carga viral con relación al porcentaje de células infectadas presente en mucosa, no hemos encontrado valores significativos. Tampoco hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células que albergan el virus en mucosa y el estado inmunológico de los pacientes,

aunque observamos que este porcentaje tiende a aumentar a medida que el estado inmunológico de los pacientes empeoraba.

Otros estudios demuestran que la prevalencia de lesiones orales en pacientes VIH+ es mayor cuando el número de linfocitos CD4 era inferior a 200 céls/microlitro y el ratio CD4/CD8 era menor a 0,39% <sup>275</sup>.

### **Presencia del VIH en mucosa bucal: hibridación del VIH en mucosa bucal**

El VIH presenta un tropismo especial para células que tienen en su superficie el receptor CD4+ como son los linfocitos y monocitos. Las células epiteliales son las de mayor número a nivel de la mucosa bucal y sin embargo no presentan este tipo de receptor y a priori podrían no ser susceptibles de ser infectadas por el VIH <sup>276</sup>; sin embargo, diversos estudios in vitro han demostrado que el VIH puede infectar células epiteliales CD4 negativas de diverso origen, incluso los queratinocitos orales en humanos <sup>91, 103, 183</sup>, pero el mecanismo por el cual tiene lugar esta infección en células epiteliales in vivo aún no está claro.

En diversas publicaciones, explican la primoinfección y transmisión del VIH-1 de la mucosa bucal, clínicamente sana de pacientes VIH+, hacia las células mononucleares en sangre periférica a través de la sinapsis infecciosa que se produce entre el DC-Sign y el VIH-1 y que infectan a las células T CD4+ <sup>277</sup>.

Estudios in vitro han demostrado que las células epiteliales humanas sí pueden ser infectadas por el VIH y transmitir la infección a los leucocitos adyacentes donde pueden ser neutralizados por la IgA <sup>183</sup>.

Siguiendo este objetivo, Qureshi et al., han detectado mediante reacción en cadena de polimerasa (RCP) in situ, ARN-VIH y ADN proviral en células epiteliales orales de pacientes infectados por VIH. Esta técnica puede dar lugar a falsos positivos, por tanto, continúa habiendo una necesidad de evidencia morfológica de la infección por VIH en células epiteliales a nivel oral <sup>104</sup>.

Se ha demostrado con estudios in vitro, que los queratinocitos orales pueden ser infectados con el VIH y que el alcohol favorece la transmisión y replicación del virus en los linfocitos <sup>91, 183</sup>.

Diversos estudios histológicos han demostrado que las células epiteliales están infectadas en el estrato basal y de ahí migran hacia las capas más superficiales hasta llegar a la cavidad bucal <sup>104</sup>.

Otros autores, como Suzuki et al., han demostrado mediante técnicas de inmunofluorescencia e hibridación in situ la presencia del VIH en células mononucleares del fluido crevicular de pacientes VIH+ <sup>183</sup>.

Estudios sobre encía sana de pacientes sanos, de Jowani et al., demuestran la presencia de células que expresan todos los receptores del VIH-1 y destacan la ausencia de células CXCR4+ en la lámina basal y escasa presencia de células CCR5+ <sup>183</sup>.

Mediante nuestro estudio, realizado en mucosa bucal de pacientes infectados por VIH, hemos comprobado la infección por VIH en el citoplasma de las células epiteliales; se detectaron señales de hibridación positivas en un 82,3% de los pacientes a los que se les realizó el estudio anatomopatológico. La especificidad de la hibridación in situ, se demostró por la ausencia de señales en las biopsias de pacientes anti-VIH negativos que se incluyeron como controles negativos, o cuando las biopsias de

mucosa se hibridaron con una sonda no específica ó cuando la sonda desapareció de la mezcla de hibridación.

Cuando las biopsias de mucosa bucal se pusieron en contacto con ARNasa antes de la hibridación, no se observó ningún tipo de señal, mientras que si la biopsia de mucosa bucal se ponía en contacto con ADNasa previo a la hibridación, no hubo modificaciones en los patrones de hibridación. Estos hallazgos nos muestran que las señales de hibridación observadas se corresponden con la detección del VIH-ARN e indican que el virus se está replicando en las células de la mucosa bucal.

El hecho de que después del contacto con ARNasa no se observasen señales de hibridación también indica que el ADN proviral no se detectó probablemente debido a la sensibilidad de la técnica de hibridación in situ.

El porcentaje medio de las células que mostraron señales de hibridación fue de  $2,64\% \pm 1,77\%$ . Este porcentaje es similar al porcentaje de células de Langerhans que se encuentran en la mucosa bucal, que es de un 2-3% <sup>278</sup>. Podríamos pensar, que las células infectadas por VIH en las biopsias de mucosa bucal analizadas eran células dendríticas. Sin embargo, este no es el caso ya que en la detección inmunohistoquímica del marcador de las células de Langerhans, el antígeno S-100, las señales de hibridación aparecían en células negativas para el antígeno S-100, indicando que el VIH se estaba replicando en las células epiteliales.

Los resultados obtenidos nos indican que la infección del VIH en células epiteliales de la mucosa bucal en principio es independiente del estado inmunológico del paciente, aunque nos haría falta un estudio con mayor número de pacientes para confirmar esta hipótesis <sup>279</sup>.

Las células infectadas por VIH se distribuyeron por el estrato basal, espinoso y granular de las secciones de mucosa bucal. Estas observaciones nos sugieren que las células epiteliales de la mucosa bucal son infectadas en el estrato basal y de ahí migran hacia las capas más superficiales como ha sido descrito por otros autores <sup>104</sup>. El mecanismo por el que las células de la capa basal son infectadas aún está por determinar. A este respecto, en nuestro estudio, no hemos encontrado correlación entre el porcentaje de células epiteliales infectadas y la concentración del VIH-ARN en plasma. Las señales de hibridación positivas se observaron en las biopsias de mucosa bucal de seis pacientes en los que no se halló presencia de VIH-ARN en plasma. Este hallazgo hace poco probable la posibilidad de que las células del estrato basal se infecten por viriones que circulan libremente; así que la otra posibilidad es que estas células se infecten por interacción con células asociadas al VIH.

Favoreciendo esta hipótesis, está el hecho de que las células epiteliales son infectadas de manera más efectiva *in vitro* cuando el virus es presentado por linfocitos ó macrófagos que cuando se exponen a viriones VIH-1 libres <sup>91</sup>.

El estudio de Moore et al., demuestra que los queratinocitos gingivales pueden ser infectados tanto por viriones VIH-1, especialmente los que presentan el fenotipo R5, y por células asociadas al VIH-1, especialmente los que presentan el fenotipo X4, y estas células una vez infectadas son las que transmiten la infección a las células CD4+ <sup>91</sup>.

En este estudio, no hemos encontrado diferencias significativas entre el porcentaje de células infectadas y pacientes en tratamiento ó sin tratamiento. La infección de células de la mucosa se encontró en 9 de los 12 pacientes que estaban en tratamiento antirretroviral, esto indica que el

VIH que infecta las células epiteliales de la mucosa pueda ser en cierto modo, resistente a la terapia antirretroviral.

Hemos encontrado que el VIH infecta y se replica en las células de la mucosa bucal in vivo, que estas células representan un reservorio del virus y que la terapia antirretroviral puede no estar siendo del todo efectiva a este nivel, aunque insistimos en la necesidad de ampliar la muestra para tener la posibilidad de constatar esta tendencia.

En estudios realizados por Boy et al. en 2009, en células epiteliales de mucosa bucal recogidas mediante escobillas colectoras de células (Cytobrush Plus cell collector) exponen que aunque la cavidad bucal no es considerada como una vía principal de transmisión del VIH-1, salvo en casos de transmisión madre-hijo a través de la lactancia materna y en menor medida en casos de relaciones sexuales vía oral, concretamente felaciones, el papel de las células epiteliales es muy importante como reservorio del VIH-1 y debe ser estudiado en mayor profundidad, tanto por la infectividad del virus en mucosa bucal como para analizar los posibles reservorios celulares que pueden explicar las resistencias a algunos fármacos antirretrovirales <sup>280</sup>.

**ESTUDIOS 2 Y 3:** Pacientes VIH positivos, en los que se realizó test de saliva Oraquick Advanced de Orasure; y pacientes VIH positivos, homosexuales, en los que se realizó el frotis faríngeo.

### **Sexo y Edad:**

En nuestro estudio, observamos una clara afectación del VIH en hombres, con un 92,95%; sin embargo, la afectación en mujeres tan sólo era del 7,05%. La proporción hombre-mujer es de 13,18:1. La media de

edad es de 43 años para los hombres, similar a los datos publicados por el Instituto de Salud Carlos III en 2012, que fue de 42 años.

Según datos generales a nivel mundial, el porcentaje de mujeres afectadas por el VIH es alarmantemente más elevado, alcanzando el 53,15% (17,7 millones sobre 33,3 millones) del total de las afectaciones <sup>15</sup>. La gran mayoría de las personas infectadas se encuentran en el África subsahariana y el 77% del total de mujeres VIH positivas <sup>21</sup>.

En España, según datos recientes del Instituto de Salud Carlos III, por sexos, se ha recibido notificación de 2.763 nuevos diagnósticos de VIH, siendo los hombres un 83% de los nuevos diagnósticos y la media de edad de 35 años <sup>35</sup>; observándose un descenso respecto a 2010, donde se notificaron 2.907 casos diagnosticados, un 82% eran hombres y la misma media de edad. Nos llama la atención el elevado índice de nuevos diagnósticos en hombres debido principalmente a las prácticas sexuales de riesgo sin protección.

### **Mecanismos de transmisión:**

El mayor porcentaje de pacientes estudiados adquirieron el VIH por relaciones homosexuales, 85,90%, seguidos de los UDVP, 7,37% y de las relaciones heterosexuales un 6,41%.

En relación a los datos publicados en 2012 por el Instituto de Salud Carlos III, el porcentaje de personas que contrajeron el virus a través de la vía sexual fue el más numeroso, un 85%, dentro de los cuales un 54% corresponden a hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y un 31% por vía heterosexual, seguido de los UDVP, 5%, porcentaje éste último en ligero

descenso respecto a años anteriores, en 2010 fue el 27% los que contrajeron el virus a través de jeringuillas.

En nuestro estudio observamos un porcentaje muy elevado de transmisión del virus en el grupo de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y observamos que la tendencia de los últimos años es claramente ascendente en este colectivo.

A nivel mundial, según los datos publicados por UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) en diciembre de 2012, la vía de transmisión heterosexual es la más frecuente con un 85% de las nuevas infecciones. Dentro de la vía de transmisión sexual, el colectivo de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) es el de mayor prevalencia sobre todo en grandes núcleos urbanos. Puede explicarse esta situación por la poca protección sexual de estos pacientes, a pesar de la información existente, y a los pocos tests de diagnóstico del VIH-1 que se realizan; sólo un 38% de las personas de este colectivo afirman haberse sometido a un test de diagnóstico del VIH-1 en el último año <sup>22</sup>.

### **Test Oraquick Advanced**

El empleo de tests de diagnóstico indirecto del VIH-1, están siendo cada vez más extendidos debido a la poca agresividad en la realización del test y a los rápidos resultados. Son de gran ayuda sobre todo en el colectivo de HSH que tienen relaciones no monogámicas (una gran promiscuidad sexual) y en un porcentaje muy elevado no emplean métodos de protección en sus relaciones sexuales <sup>281</sup>.

Tradicionalmente se ha ofertado la prueba del VIH a personas y a colectivos con prácticas de riesgo para adquirir el VIH, como los usuarios

de drogas inyectadas (UDIs), hombres homosexuales o inmigrantes de países de alta prevalencia. Algunos estudios indican que sólo una tercera parte de los pacientes que acuden a los servicios de salud con indicadores clínicos o con conductas de riesgo, se les realiza la serología del VIH. Además, entre un 10 y un 25% de los pacientes seropositivos no reconocen antecedentes de conductas de riesgo <sup>282</sup>.

La saliva es un fluido biológico, muy útil en el diagnóstico de alteraciones orales y sistémicas. Posee marcadores biológicos (biomarcadores) que la hacen muy útil para el empleo de tests rápidos que forman parte del diagnóstico de una enfermedad y ayudan tomar decisiones clínicas importantes del paciente. Algunos autores, han empleado tests de saliva para la detección de anticuerpos del VIH-1 y han obtenido resultados similares en especificidad y sensibilidad a los obtenidos con análisis de sangre. Estos resultados han ayudado a la implantación de estos tests de manera cada vez más frecuente en las consultas de infecciosas de los hospitales y centros de salud, e incluso en las clínicas dentales. Estos tests se han desarrollado para poder obtener estos biomarcadores de la muestra que se toma de la cavidad bucal, el más empleado es una torunda que recoge una muestra de DNA tras frotarla en distintas zonas de la cavidad bucal <sup>281</sup>.

El test rápido de saliva, a pesar de presentar una especificidad y sensibilidad del 99%, requiere la confirmación de la infección mediante la realización de un análisis de sangre en el que se realizará la prueba de Western Blot. Es importante recordar que el período ventana de la infección, es decir las 6 a 12 primeras semanas del contacto con el virus hasta que se desarrolla la respuesta inmune, puede dar resultados falsos negativos y es el período de mayor infectividad del individuo. Por tanto se están investigando tests que empleen la reacción en cadena de

polimerasa (RCP) para detectar la viremia, que permitiría encontrar individuos infectados a las 2 semanas de contacto con el virus. Estos test también analizarían anticuerpos y RNA viral <sup>283</sup>.

Algunos autores, refieren que los pacientes que acuden a la clínica dental son muy receptivos a la realización de tests rápidos de saliva para el diagnóstico del VIH-1 en la visita de revisión rutinaria.

De los tests rápidos de diagnóstico del VIH-1 que se comercializan, el Test Oraquick Advanced de Orasure (Orasure technologies Inc.) y Calyptive Vanguard HIV (Calypte Biomedical Corp.) han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) con una sensibilidad y especificidad del 99% <sup>284</sup>.

Los tests de diagnóstico indirecto de saliva que se emplean, como el Oraquick Advanced de Orasure, siguen sin cubrir hasta el momento el porcentaje de falsos negativos que se pueden dar sobre todo en el período ventana de la infección y el comienzo de la terapia antirretroviral. También se ha de considerar el hecho de que algunas sustancias puedan interferir con el resultado del test como la heparina, la contaminación bacteriana, niveles elevados de bilirrubina, etc.... Los tests de diagnóstico rápido tienen cabida en urgencias, centros de salud, clínicas dentales, donde poder hacer un diagnóstico rápido y nada invasivo que oriente sobre el riesgo de infección del individuo <sup>207</sup>.

Este tipo de tests pueden dar falsos negativos cuando se emplean en pacientes en tratamiento antirretroviral que tiene niveles variables de anticuerpos y en el diagnóstico precoz de aquellos pacientes asintomáticos que no conocen si están infectados por el virus, especialmente en la infección temprana <sup>218</sup>.

El papel de la cavidad bucal en la transmisión del virus es muy controvertido, a pesar de que la mucosa del organismo a nivel general representa una de las principales rutas de transmisión del VIH-1. No ocurre eso a nivel de la mucosa bucal, ya que posee mecanismos que la hacen más resistente a la infección por VIH-1. El escaso número de casos publicados sobre la transmisión oral del VIH-1, refleja los bajos niveles de VIH-1 con capacidad infectiva en saliva. Las moléculas salivales que poseen actividad anti-VIH *in vitro* son: lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozimas, trombospondinas, mucinas, proteínas ricas en prolina, defensinas, leucocito secretor inhibidor de la proteasa (SLPI) y el gp340 (aglutinina salival). En el caso del SLPI, la interrupción de la infección tiene lugar si los macrófagos son expuestos a esta molécula antes de la exposición al VIH-1, esto indica un bloqueo de la célula diana del virus más que una acción directa sobre el virus. En el caso del gp340, se produce una unión de la molécula al virus, al cual inactiva. Esto unido a la alta producción de saliva, la elevada actividad enzimática que existe en boca, y la histología de la mucosa bucal hace que sea más resistente a la infección que otras zonas mucosa como el tracto genital <sup>285</sup>.

Sin embargo, fracciones de partículas o viriones VIH-1 con capacidad infectiva no son bloqueados en saliva, se introducen en los queratinocitos, que son células diana para bajos niveles VIH-1, y se diseminan a otras células <sup>286</sup>.

Con el empleo del test de saliva Oraquick Advanced de Orasure como método indirecto de diagnóstico del VIH, obtuvimos una sensibilidad del 86,2% y una especificidad del 100% (figura 12). La sensibilidad obtenida en nuestro estudio es algo inferior a las observadas en otros estudios, que oscilan entre el 95%, 98,3% y 99% <sup>283</sup>. La lectura del test se realizó a los 20 minutos de la obtención de la muestra, la mayoría de los pacientes (79%,

p=0,004) que participaron en nuestro estudio en los que el resultado del test fue positivo estaban en tratamiento antirretroviral (HAART), presentaban una media de carga viral mayor que en el grupo en los que el test fue negativo y un valor del cociente CD4/CD8 inferior al de los pacientes en los que el resultado del test fue negativo (figura 18). Casi la mitad de los pacientes en los que el resultado del test fue positivo, presentaban un historial previo de al menos una enfermedad de transmisión sexual (figura 13). Únicamente un 22% de los pacientes que obtuvieron un resultado positivo del test presentaban algún tipo de lesión oral en el momento del estudio (figura 17). En nuestros resultados, aquellos pacientes que tienen una mayor alteración del sistema inmune, dan resultados positivos en la realización del test de saliva.

Habría que hacer una valoración sobre si la terapia antirretroviral puede acabar afectando el resultado del test dando falsos negativos, y que eso pueda haber influido en los resultados de nuestro estudio, o que la presencia de algún tipo de lesión oral en el momento de toma de la muestra pueda afectar al resultado del test. Otros autores, refieren que en la realización del test de saliva la muestra debe ser tomada del fluido crevicular gingival exclusivamente <sup>282</sup>; aunque las indicaciones del fabricante y los estudios que hemos revisado nos indican que la muestra se ha de tomar de fondo de vestíbulo tanto de la arcada superior como inferior. No obstante es un resultado el de nuestro estudio lo suficientemente elevado como para plantear la necesidad de realización de este tipo de pruebas indirectas en un ámbito distinto al convencional, es decir, realizarlas en un ámbito más amplio dentro de la sanidad, que englobe a los médicos de familia, dentistas, dermatólogos, ginecólogos, médicos de urgencias, los cuales deberían ser dianas concretas ya que son con mayor probabilidad los que primero diagnostican pacientes infectados por el VIH. Las personas adultas mayores de 20 años visitan con

más frecuencia al dentista que a sus médicos de cabecera, por lo que los dentistas podrían ofrecer una importante oportunidad para la detección de la infección subyacente por VIH <sup>282</sup>.

En un estudio realizado por el centro de control de enfermedades de Estados Unidos, (Centers for Disease Control, CDC), entre 2005 y 2007, observaron la necesidad de contrastar el resultado de tests de saliva con resultado positivo con un análisis de sangre y confirmación mediante la prueba de Western Blot. En este estudio se obtuvo una sensibilidad del 98%. El CDC, insiste en la importancia de la utilización de este tipo de tests para facilitar el acceso a un método diagnóstico del paciente infectado por VIH sin que se realice una prueba más agresiva. No obstante indican la necesidad de contrastar el resultado del test de saliva positivo con un análisis de sangre posterior que confirme el resultado <sup>287</sup>.

En Europa y en España, actualmente no existe la implantación de este tipo de tests, pero puede ser viable una estrategia dirigida a identificar las poblaciones de riesgo de infección del virus, y a menos que el paciente se oponga de manera explícita, someterse a este tipo de tests. Esto permite elaborar una lista de situaciones y enfermedades indicadoras ante las cuales, cualquier profesional sanitario, independientemente de su especialidad, y el odontólogo en particular, debería recomendar un test para descartar una infección por el VIH-1. Se ha estimado que esta recomendación está justificada en términos de coste eficacia cuando la prevalencia de la infección por VIH-1 es superior al 1% en la situación o enfermedad indicadora de que se trate. Debería facilitarse a todas las personas que los solicitaran, a todas las mujeres embarazadas, a todas las personas con prácticas sexuales de riesgo y a todos los pacientes en los que se identifique algunas de las enfermedades incluidas en las tablas 3 y

4, es en estas enfermedades donde la prevalencia de la infección por el VIH-1 puede ser superior al 1% (anexo, tablas 4 y 5) <sup>43</sup>.

Sin embargo la estrategia adoptada por los Centros para el Control de las Enfermedades (CDC) de Atlanta (EE.UU.), es la de realizar la prueba del VIH de forma generalizada a cualquier persona que accede al sistema sanitario por cualquier motivo y según diferentes estudios establecen que sería rentable a nivel coste-eficacia en aquellas regiones donde la prevalencia del VIH no diagnosticado fuera superior al 0,1%. En España, en un estudio realizado en la Comunidad de Madrid en Centros de Salud de Atención Primaria en el marco de una encuesta de serovigilancia para enfermedades infecciosas, la prevalencia de infección oculta (no diagnosticada) del VIH estaba entorno al 0,35% <sup>282</sup>.

### **Infección gonocócica y VIH**

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un importante problema para la salud pública tanto por su morbilidad como por sus complicaciones y secuelas si no se realiza un diagnóstico y tratamiento precoz. Así mismo, existe una importante interrelación con la infección por el VIH: por una parte las ITS aumentan el riesgo de adquisición y transmisión del VIH a través de distintos mecanismos y por otra, al compartir vías de transmisión con el VIH y tener un período de latencia más corto, son consideradas como indicadores de cambios en los comportamientos sexuales de riesgo <sup>47</sup>.

En Mayo de 2005, se creó el grupo de trabajo sobre infecciones de Transmisión Sexual (Grupo de Trabajo sobre ITS), cuyos objetivos son: monitorizar las tendencias de casos de sífilis e infección gonocócica en los centros participantes, caracterizar los nuevos diagnósticos de sífilis e

infección gonocócica y analizar las circunstancias en las que se producen estos diagnósticos. Las ITS sometidas a vigilancia epidemiológica son la infección gonocócica, la sífilis y la sífilis congénita, todas ellas de declaración numérica semanal. Esta información, permite detectar cambios a lo largo del tiempo <sup>47</sup>.

Ha habido un aumento de estas infecciones en Europa y en España sobre todo en el grupo de hombres que tienen sexo con hombres (HSH), núcleo principal de pacientes de nuestro estudio. En Madrid, hemos observado un aumento muy importante en los últimos años en esta población por la práctica sexual de riesgo sin protección y por la inmigración en los últimos años, y junto con estudios que muestran una alta prevalencia de infecciones gonocócicas asintomáticas en la faringe de pacientes HSH y VIH positivos <sup>288, 289</sup>, es lo que nos ha llevado a la realización de nuestro estudio, cuyo objetivo es determinar la prevalencia de la infección/colonización por *neisseria gonorrhoeae* en pacientes VIH positivos asintomáticos en un área de creciente incidencia de gonorrea.

De la muestra estudiada, 265 pacientes, un 9,46% de los pacientes (25 pacientes) presentaron infección por *neisseria gonorrhoeae* asintomática, debido a que la práctica de sexo oral es muy habitual en este colectivo (HSH), la transmisión de la orofaringe a la uretra representa un mecanismo de transmisión que incide en la propagación de la enfermedad. Este porcentaje es mayor que el observado en las clínicas municipales de infecciones de transmisión sexual (ITS) de San Francisco o San Diego, ambas ciudades con una alta incidencia de gonorrea en la comunidad gay <sup>288, 289</sup>.

En nuestro estudio, los pacientes VIH positivos y gonococo positivo presentaban con mayor frecuencia un historial previo de enfermedad de

transmisión sexual, aunque nunca en los 6 meses previos a la toma de la muestra. Todos los pacientes con gonococo positivo fueron tratados con antimicrobianos, ceftriaxona 250mg I.M. en dosis única, y en aquellos que no fueron tratados la infección se resolvió de manera espontánea. Esto nos alerta sobre la promiscuidad sexual en el colectivo y el número tan alto de nuevas infecciones desconocidas, tanto VIH como infecciones de transmisión sexual, lo cual nos debe alertar sobre la necesidad del uso de tests de diagnóstico rápido de manera más protocolizada en poblaciones de riesgo.

### **Patología Oral en pacientes VIH+**

En los últimos años se ha dado una mayor importancia a las lesiones orales como indicadores de la infección del VIH y como valor predictivo de la progresión de la infección del VIH al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). A nivel internacional se han descrito siete lesiones cardinales que están asociadas de manera directa con la infección por VIH: candidiasis oral, leucoplasia vellosa, sarcoma de Kaposi, eritema lineal gingival, gingivitis ulceronecrotizante aguda, periodontitis ulceronecrotizante aguda y linfoma no-Hodgkin. Estas lesiones pueden estar presentes en un 50% de las personas infectadas por el VIH y hasta en un 80% de aquellas personas diagnosticadas de sida. Estas lesiones van acompañadas de un descenso del número de células CD4+ y un incremento de la carga viral y son indicadores independientes del progreso de la infección <sup>223, 271</sup>.

En casos en los que se desconoce la infección por VIH, las lesiones orales son un indicador importante de la posible infección. Por ello, son consideradas como un criterio para valorar el fin de la profilaxis y valorar el

comienzo del tratamiento antirretroviral; lo que explica su importancia en los protocolos de prevención y tratamiento del VIH <sup>271</sup>.

La aparición de candidiasis oral y leucoplasia vellosa, está directamente relacionada con un descenso de las células CD4+ y un aumento de la carga viral. La reducción en la carga viral en pacientes que están en tratamiento con terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) está relacionada con una reducción de la prevalencia de lesiones orales <sup>223, 271</sup>.

Desde el inicio del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), se ha visto una variación en el tipo e incidencia de lesiones orales en pacientes VIH positivos, observándose una mayor incidencia en las alteraciones de glándulas salivales, verrugas y úlceras orales en detrimento de otras lesiones que hasta ahora eran patognomónicas de la infección por VIH en cavidad bucal como: sarcoma de Kaposi, leucoplasia vellosa y periodontitis ulceronecrotizante aguda (PUN) <sup>240</sup>.

Las **alteraciones en glándulas salivales**, se han descrito en glándulas salivales mayores, principalmente quistes linfoepiteliales benignos en un 5% de pacientes VIH positivos <sup>290</sup>.

En el caso de las **verrugas orales**, su aparición está relacionada con un descenso en plasma del nivel de VIH-ARN en los seis meses anteriores al diagnóstico de la lesión, con lo que la aparición de este tipo de lesiones pueden estar relacionadas con el síndrome de reconstitución inmune (SRI). El mecanismo por el cual la reducción de la carga viral está relacionada con un aumento del riesgo de presencia de verruga oral, no está claro, la inmunidad mediada por células es fundamental para controlar la infección por el VPH; sin embargo, no existe una relación clara entre el

incremento de células CD4 y el riesgo de aparición de verrugas orales y sí existe con el descenso de la carga viral. Se ha descrito que el VIH también puede regular la transcripción del VPH, lo que explicaría la mayor presencia de estas lesiones cuando existe una disminución importante de la carga viral <sup>291</sup>. En el estudio 1, con los pacientes que tomamos las muestras de mucosa bucal para la técnica de la hibridación in situ, observamos en un porcentaje del 25% en lesiones del VPH, concretamente hiperplasia epitelial focal, sin embargo en el estudio 2, el porcentaje de estas lesiones fue del 1,67%, mucho menor probablemente debido al mejor estado inmunológico de estos pacientes.

Las células de Langerhans, que son fundamentales para la presentación de antígenos, están en menor número en la mucosa bucal de pacientes infectados y cuando el número de estas células y de linfocitos CD4 aumenta en la mucosa bucal debido a la disminución de la carga viral, se produce una mayor presentación y reconocimiento de antígenos del VPH y por tanto una mayor respuesta inflamatoria local. Muestras de frotis de mucosa bucal en pacientes VIH positivos muestran una prevalencia de una infección silente del VPH del 16%. Clínicamente se presentan con aspecto de coliflor, sobre elevadas con superficie plana o con proyecciones tipo clavos, son lesiones que tienen una gran tendencia a recurrir. La prevalencia de este tipo de lesiones es de un 3% en pacientes VIH positivos en tratamiento con TARGA <sup>240, 245</sup>.

Dentro de las **lesiones ulcerosas**, las producidas por el virus del herpes simple (VHS-1) son bastante comunes. En nuestro estudio observamos la presencia de aftas ó úlceras orales en un 6,67% de los pacientes. Se presentan como vesículas dolorosas que aparecen en ramillete que acaban confluyendo y reventándose, suelen aparecer en el

labio, localización más frecuente, en la encía queratinizada y paladar duro.

Las aftas, son también bastante comunes, suelen aparecer en encía no queratinizada, en mucosa labial o bucal, suelo de boca, superficie ventral de lengua y orofaringe, fondo de vestíbulo en maxilar y mandíbula. Son muy dolorosas, se caracterizan por un halo inflamatorio y un fondo pseudomembranoso amarillo-grisáceo <sup>240</sup>.

En estos pacientes VIH positivos, cerca de un 30 a un 40% presentan **xerostomía**, ya que es un efecto secundario del tratamiento antirretroviral al que están sometidos y también debido a la proliferación de células CD8+ en las glándulas salivares mayores; debido a estos factores se producen cambios en la cantidad y calidad de la saliva, disminución en sus propiedades antimicrobianas lo que facilita la aparición de caries de progreso rápido y enfermedad periodontal <sup>240</sup>.

Respecto a la **candidiasis**, en estos pacientes las tres formas clínicas más frecuentes son: queilitis angular, candidiasis eritematosa y pseudomembranosa. En nuestro estudio hemos detectado candidiasis en un 35% de los pacientes, principalmente del tipo pseudomembranoso. La queilitis angular, se presenta como eritema o fisuras en las comisuras de los labios, puede presentarse sola, junto con la forma pseudomembranosa y/o eritematosa; si no son tratadas permanecen largos periodos de tiempo. La forma clínica que menos se diagnostica, quizás por desconocimiento, es la candidiasis eritematosa. Se presenta como una lesión rojiza, plana, en la zona dorsal de la lengua o en paladar duro o blando, los pacientes refieren sensación de quemazón sobre todo con factores irritantes como los alimentos ácidos, salados y picantes. Se conoce como una lesión por beso debido a la localización que tiene,

cuando una lesión se presenta en lengua, hemos de inspeccionar el paladar y viceversa.

La forma pseudomembranosa, aparece con un aspecto blanquecino, algodonoso, que se desprende al raspado dejando una zona eritematosa subyacente que puede sangrar, generalmente aparece en mucosa yugal y lengua, pudiendo aparecer en mucosa masticatoria. La especie más común es la *candida albicans*, aunque también hay estudios que refieren otras especies de cándida. El diagnóstico es clínico, al igual que en las formas anteriores <sup>240</sup>.

La **leucoplasia oral vellosa**, es causada por el virus de Epstein Barr y se presenta como una lesión filamentosa, en bordes laterales de lengua y que no se desprende con el raspado, asintomática, no se elimina salvo por razones estéticas. Hemos observado la presencia de estas lesiones en un 8% de los pacientes, generalmente de localización en bordes laterales de lengua y bilateral. Esta es una de las lesiones cuya incidencia ha disminuido notablemente desde el inicio de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), la hemos visto en pacientes con sida y con una inmunosupresión severa (menos de 200 céls CD4/mm<sup>3</sup>). En aquellos pacientes que presentan estas lesiones y están en tratamiento antirretroviral puede que el tratamiento no esté siendo todo lo efectivo que debiera y puede alertar sobre un fracaso del mismo <sup>240</sup>.

La **enfermedad periodontal**, puede presentarse como eritema lineal gingival (ELG) y como periodontitis ulceronecrotizante aguda (PUN). Los pacientes estudiados presentaban por lo general buenos hábitos de higiene oral y únicamente observamos la presencia de PUN en algunos de los casos estudiados. El **eritema lineal gingival**, se presenta como una banda rojiza alrededor del margen gingival del diente y puede ir acompañado o no de sangrado y molestias. Se observa principalmente en

dientes anteriores, aunque se puede extender hacia dientes posteriores. Algunos estudios, indican la relación directa entre enfermedad periodontal y la colonización subgingival de distintas especies de cándida (Academia Americana de Periodoncia).

La gingivitis ulceronecrotizante aguda (GUN) y la periodontitis ulceronecrotizante aguda (PUN), tienen el mismo agente causal, se caracterizan por una rápida destrucción del tejido blando, en el primer caso, y del tejido duro el segundo caso. La presencia de PUN, nos alerta sobre una inmunosupresión severa. Se caracteriza por dolor, movilidad, pérdida dentaria acompañada de supuración local, olor fétido, necrosis de papilas y pérdida de hueso de soporte <sup>240</sup>.

La inmunosupresión crónica debida al VIH, el tabaco y otros factores virológicos juegan un papel muy importante en la aparición de enfermedades malignas en pacientes VIH positivos. El **linfoma** es la enfermedad maligna que más ha aumentado en pacientes VIH y su prevalencia no se ha visto alterada por al TARGA. A nivel oral las lesiones son masas de tejido blando que pueden presentarse con o sin ulceración y necrosis que generalmente abarca encía queratinizada, paladar y mucosa alveolar. Estos engrosamientos gingivales pueden enmascarar una enfermedad periodontal. El riesgo de padecer linfoma no-Hodgkin pacientes VIH positivos en tratamiento con TARGA es de un 19% en 3 años. Dentro del colectivo de pacientes VIH positivos, los UDIs son los que presentan con mayor frecuencia linfoma Hodgkin; y este colectivo son los que tienen una mayor frecuencia de infección por el virus de Epstein Barr <sup>292</sup>.

**Sarcoma de Kaposi (SK)**, es la lesión oral maligna más frecuente asociada al VIH, aunque si incidencia ha disminuido notablemente desde la aparición del TARGA. Hemos observado estas lesiones en un 5% de los

pacientes. El agente etiológico ha sido identificado como el herpes virus-8 (VHH8) asociado a Sarcoma de Kaposi (HSSK). Es una enfermedad angioproliferativa que está muy asociada con la transmisión sexual, en pacientes VIH positivos homosexuales es de cinco a diez veces más frecuente que en el resto de la población VIH. Ha sido descrito como macular, nodular, sobre elevado ó ulcerado y con una coloración desde rojo a morado. Las lesiones en etapas iniciales tienden a ser planas, rojizas y asintomáticas, las lesiones se van oscureciendo con el tiempo. El progreso de la lesión puede interferir con el normal funcionamiento de la cavidad bucal y tras un traumatismo o infección en la zona de la lesión se vuelven sintomáticas. El diagnóstico definitivo es histológico y la reducción en su incidencia se debe al empleo de inhibidores de la proteasa en el tratamiento con TARGA <sup>240, 292</sup>.

La mayoría de los pacientes que participaron en nuestro estudio, un 80%, estaban recibiendo terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) y con una media de células CD4+ superior a 500 céls/mm<sup>3</sup>, lo cual puede explicar que únicamente un 20% presentaran algún tipo de lesión oral en el momento del estudio. Hemos observado una incidencia importante de candidiasis oral, leucoplasia vellosa, úlceras, Sarcoma de Kaposi (SK), aunque en un porcentaje menor al encontrado en la literatura, papilomas, hiperplasia epitelial focal (HEF), periodontitis ulceronecrotizante (PUN), herpes simple y una incidencia alta de **leishmaniasis visceral** con afectación en mucosa bucal, siendo ésta una enfermedad fuertemente asociada al VIH. En el estudio 1, donde realizamos la biopsia de mucosa oral, encontramos un porcentaje muy alto de leishmaniasis visceral (37,5%), con manifestaciones orales en mucosa y lengua. Esto puede deberse a que los pacientes que participaron en este estudio presentaban un grado de inmunosupresión alto, pertenecían a un nivel socioeconómico bajo y adquirieron la infección por VIH por vía parenteral (UDIs).

La leishmania asociada al VIH se describió por primera vez en 1986 y desde entonces el número de casos ha ido aumentando progresivamente; aunque desde el inicio del TARGA los casos han disminuido de manera notable, sobre todo en los países del Sur de Europa donde la enfermedad es endémica. Ambas enfermedades actúan sinérgicamente debilitando la respuesta inmune celular porque las células diana sobre las que actúan son las mismas. Se ha descrito que esta enfermedad aumenta la progresión clínica del VIH, aumentando la replicación del virus y disminuyendo el número de linfocitos T CD4. En la mitad de los pacientes coinfectados en los 2 meses siguientes al diagnóstico de la LV, se desarrollan los criterios diagnósticos de Sida. El tipo de lesión en mucosa bucal, es sobrelevada con presencia de ulceración central y la confirmación se realiza mediante análisis histológico de la lesión donde se observan los cuerpos amastigotes en el epitelio. Clínicamente se distinguen 2 tipos: leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis visceral (LV) ó Kala-azar, siendo ésta última la más frecuente en el Sur de Europa. La infección por VIH aumenta el riesgo de la coinfección por leishmania de 100 a 2.320 veces en las áreas donde la enfermedad es endémica, reduce la respuesta terapéutica y aumenta las probabilidades de recidiva de la enfermedad. La coinfección leishmania-VIH se da en un 2-9% de todos los casos donde la enfermedad es endémica, como en España. A nivel global es reconocido que se han subestimado los casos de coinfección en parte porque la LV afecta a sectores de la población muy pobres y porque la LV no se encuentra recogida en la lista de las infecciones oportunistas del CDC, así que rara vez se recoge en los sistemas de notificación del SIDA. Debería estar incluida en la clasificación clínica del CDC, dentro de la categoría C <sup>250</sup>.

## **VII. CONCLUSIONES**

Como resultado de nuestro estudio, clínico y anatomopatológico, establecemos las siguientes conclusiones:

1. Presencia del VIH-1 en células epiteliales de la cavidad bucal, queratinocitos gingivales y células positivas para CD4.
2. El VIH-1 infecta y se replica en células epiteliales de la mucosa bucal in vivo, independientemente de que el paciente esté o no en tratamiento con TARGA.
3. Las células epiteliales de la mucosa bucal pueden ser un reservorio importante del virus.
4. Las pruebas no invasivas de diagnóstico indirecto del VIH, como el test de saliva empleado en el estudio, es útil y sencillo de realizar por el propio odontólogo.
5. Este test es una herramienta eficaz para detectar pacientes infectados que aún desconocen que son portadores del VIH.
6. Las lesiones orales como leucoplasia vellosa, candidiasis, verrugas orales, herpes, leishmaniasis, aparecen con mayor frecuencia en este tipo de pacientes independientemente de que estén en tratamiento anti-retroviral o no.
7. La existencia de una infección gonocócica subclínica en una población de hombres que tienen sexo con hombres y VIH positivos junto con una práctica sexual de riesgo, podría favorecer la

propagación de la gonorrea en nuestro medio y contribuir a la expansión actual de la infección gonocócica en el colectivo de hombres que tienen sexo con hombres en la comunidad de Madrid.

## **VIII. ANEXOS**

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DE INCLUSIÓN EN ESTUDIO

Yo D/DÑA.

Con DNI N°:

Autorizo al servicio de Estomatología de la Fundación Jiménez Díaz a incluir los datos recabados en su examen clínico como parte de un estudio de Tesis Doctoral. Otorgando permiso para que tanto la aplicación de técnicas así como sus resultados sean conocidos, siendo informado de que pudiera aparecer en documentos impresos, versiones en línea y otras licencias; así como concedo mi permiso a terceros para reproducir este material.

Así mismo, autorizo la toma de fotografías y grabación de videos, ocultando siempre los ojos y en lo posible la visión del rostro, y procurando siempre salvaguardar el anonimato.

Entiendo que el nombre bajo ningún concepto será publicado, pero el anonimato completo no puede ser garantizado.

Madrid a        de        de 20

Firma

*Tabla 1: Consentimiento informado según las normas de Helsinki.*

**Estudio 1:****HISTORIA CLÍNICA****FILIACIÓN:**

Nombre:

Apellidos:

Fecha de nacimiento:

Dirección:

Nº Historia:

**HISTORIAL MÉDICO:**Breve resumen de la historia clínica:Origen de la infección:

Adicto:

HMS:

Bisexual

Heterosexual:

Otros:

Antecedentes Personales:

Enf. Cardiovasculares:

Enf. Pulmonares:

Enf. Aparato digestivo:

Enf. Infecciosas:

ETS:

Virus de la hepatitis:

Hábitos tóxicos y parafuncionales:

Alergias conocidas:

Enfermedad actual:Tratamiento:Tratamiento ANTIRRETROVIRAL:Motivo de la consulta:Analítica:

Carga viral fecha		CD4/CD8 fecha	
CD4 fecha		Estadio fecha	
CD8 fecha			

**HISTORIAL DENTAL:**Exploración Intrabucal:

Dental:

Tejidos blandos (encía queratinizada, mucosa yugal, paladar, lengua):

Glándulas:

Exploración Extrabucal:

A.T.M:

Exploración radiológica (ortopantomografía):

Biopsia:

Estudio de cándida bucal:

*Tabla 2: Ficha clínica del paciente del estudio 1.***Estudios 2 y 3:****Ficha clínica del paciente**

Apellidos y nombre		Fecha analítica	
Historia clínica		Carga viral (c/ml)	
F. nacimiento		CD4/CD8	
Sexo		T4(%)	
		T4 (céls/litro)	
Antecedentes personales		T8 (%)	
Fecha Dx VIH		T8 (céls/litro)	
Vía contagio		Leucocitos (microlitro)	
Estadío CDC		Plaquetas (céls/ml)	
VHC		Hb (pg)	
VHB			
Mantoux			
ETS: Herpes simple		Fecha inicio Tx ARV	
ETS: Sífilis		Meds ARV	
ETS: Gonorrea			
ETS: Proctitis		Test Oraquick	
ETS: otras		Resultado Test Oraquick	
Otras enfs. No VIH			
Fumador		Frotis faríngeo	
Alergias		Gonococo	
Etilismo		Tratamiento frente a Gonococo	

Otras drogas		Sensibilidad	
		2º frotis	
Exploración oral			
Lesión oral		Observaciones	
Biopsia mucosa bucal			
Panorámica			

Tabla 3: Ficha clínica del paciente de los estudios 2 y 3.

<b>Tabla 3</b>	
1. Candidiasis traqueal, bronquial ó pulmonar	13. Sarcoma de Kaposi
2. Candidiasis esofágica	14. Linfoma de Burkitt o equivalente
3. Carcinoma de cervix invasivo	15. Linfoma inmunoblástico o equivalente
4. Coccidioidomicosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares)	16. Linfoma cerebral primario
5. Criptococosis extrapulmonar	17. Infección por <i>M. Avium-intacellulare</i> o <i>M. Kansasii</i> diseminada o extrapulmonar
6. Criptosporidiasis, con diarrea de más de un mes	18. Tuberculosis pulmonary
7. Infección por citomegalovirus de un órgano diferente del hígado, bazo o ganglios linfáticos, en un paciente de más de un mes de edad	19. Tuberculosis extrapulmonar diseminada
8. Retinitis por cytomegalovirus	20. Infección por otras micobacterias, diseminada o extrapulmonar
9. Encefalopatía por VIH	21. Neumonía por <i>Pneumocystis jiroveci</i>

10. Infección por virus del herpes simple que cause una úlcera mucocutánea de más de un mes de evolución, o bronquitis, neumonitis o esophagitis de cualquier duración, que afecten a un paciente de más de un mes de edad	22. Neumonía recurrente
11. Histoplasmosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares)	23. Leucoencefalopatía multifocal progresiva
12. Isosporidiasis crónica (más de un mes)	24. Sepsis recurrente por especies de <i>Salmonella</i> diferentes de <i>S. Typhi</i>
	25. Toxoplasmosis cerebral en un paciente de más de un mes de edad

**Tabla 4**

1. Cualquier infección de transmisión sexual	11. Leukoplasia oral vellosa (**)
2. Contactos sexuales de riesgo con personas infectadas por el VIH-1	12. Hepatitis C
3. Síndrome gripal con rash y/o adenopatías	13. Hepatitis B
4. Fiebre de larga evolución o de origen desconocido	14. Leucopenia, linfopenia, plaquetopenia, anemia
5. Onicomicosis	15. VSG elevada
6. Herpes simple recidivante	16. Diarrea crónica
7. Herpes Zoster/ varicela en el adulto	17. Linfoma de Hodgkin, Enfermedad de Castleman
8. Eczema seborreico	18. Leishmaniasis
9. Psoriasis	19. Todas las mujeres embarazadas (*)
10. Candidiasis oral (muguet) (**)	

(\*) La prevalencia en España es inferior al 1% pero el potencial beneficio para el recién nacido justifica recomendar de forma sistemática un test de despistaje de la infección por el VIH-1.

(\*\*) Tienen especial interés para los odontólogos.

Tablas 4 y 5: Enfermedades que indican una prevalencia de infección por VIH-1 superior al 1%. (Gatell J.M., Zulaica D., et al.)<sup>43</sup>

<b>Clasificación clínica del VIH, CDC. Atlanta 1993</b>			
Linf. CD4 cels/mm <sup>3</sup>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>1 &gt;499, &gt;28%</b>	A1	B1	C1(sida)
<b>2 200-499, 14-28%</b>	A2	B2	C2(sida)
<b>3 &lt;200, &lt;14%</b>	A3 (sida)	B3(sida)	C3(sida)

La **categoría clínica A** se aplica a la infección primaria y a los pacientes asintomáticos con o sin linfadenopatía generalizada persistente.

La **categoría clínica B** se aplica a los pacientes que han presentado síntomas relacionados con la infección por el VIH pero que no se encuadren dentro de la categoría clínica C.

La **categoría clínica C** se aplica a los pacientes que han presentado alguno de los cuadros incluidos en la definición de SIDA de 1987 más otros tres nuevos.

Tabla 6: Clasificación clínica del VIH, según el CDC de Atlanta, 1993.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

- 
- <sup>1</sup> Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* 1983;220:868-71.
- <sup>2</sup> Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, et al. Isolation of human T cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:865-7.
- <sup>3</sup> Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira O. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986;233:343.
- <sup>4</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2012. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf). p 8. Acceso Diciembre 2012.
- <sup>5</sup> HIV epidemiology. Roche laboratories. [www.roche.com](http://www.roche.com). Acceso Enero 2012.
- <sup>6</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2006. Geneva: UNAIDS, 2007. Disponible en: [http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2006/2006\\_gr\\_ch02\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2006/2006_gr_ch02_en.pdf). Acceso Marzo de 2012.
- <sup>7</sup> Fauci AS, Lane HC. Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorders. In: Kasper DL, Faucis AS, Longo DL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16 ed. Vol 1. Mc Graw-Hill: New York; 2005. Pp: 1076-139.
- <sup>8</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global aids epidemic 2008. p 15. Disponible en: <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knownyourepidemic/epidemiologypublications/2008reportontheglobalaidsepidemic/>. Acceso Enero 2012.
- <sup>9</sup> Merson MH. The HIV-AIDS Pandemic at 25-The Global Response. *N Engl J Med*, Jun 2006; 354:2414-17.
- <sup>10</sup> Averting in HIV and AIDS. World estimates of the HIV & AIDS epidemics at the end of 2006. Disponible en <http://www.avert.org/worldstats.htm>. Acceso Marzo 2012.
- <sup>11</sup> Department of Health and Human Services, Bethesda, MD. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services, 2005.
- <sup>12</sup> Sepkowitz KA. One Disease, Two Epidemics-AIDS at 25. *N Engl J Med*, 2006 Jun;354:23.Pp: 2411-14.
- <sup>13</sup> Masquelier B, Bhaskaran K, Pillay D, et al. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:505-11.
- <sup>14</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2012. p 58. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf). Acceso Enero 2012.

- 
- <sup>15</sup> Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica del SIDA en España. Registro Nacional de casos de SIDA. Julio 2012.
- <sup>16</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic. Programa conjunto ONUSIDA/OMS sobre SIDA, 2012. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_with\\_annexes\\_es.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_with_annexes_es.pdf). Acceso Diciembre 2012.
- <sup>17</sup> Simon V, Ho D, Karim A. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. The Lancet 2006 Aug 5; vol 368.
- <sup>18</sup> Hayes R, Weiss H. Epidemiology. Understanding HIV epidemic trends in Africa. Science 2006; 311: 620-21.
- <sup>19</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2008. Pp 5-16. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510\\_2008globalreport\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510_2008globalreport_en.pdf). Acceso Enero 2012.
- <sup>20</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2012. P 8. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf). Acceso Diciembre 2012.
- <sup>21</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2012. P 12. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf). Acceso Diciembre 2012.
- <sup>22</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2012. P 25. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf). Acceso Diciembre 2012.
- <sup>23</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2010. Disponible en: [http://www.unaids.org/documents/20101123\\_globalreport\\_en.pdf](http://www.unaids.org/documents/20101123_globalreport_en.pdf). Acceso Julio 2012.
- <sup>24</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2008. Pp 16-20. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510\\_2008globalreport\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510_2008globalreport_en.pdf). Acceso Enero 2012.
- <sup>25</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2008. P 32. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510\\_2008globalreport\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510_2008globalreport_en.pdf). Acceso Enero 2012.

- 
- <sup>26</sup> Lurie MN, Williams BG, Zuma K, et al. The impact of migration on HIV-1 transmission in South Africa: a study of migrant and nonmigrant men and their partners. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 149–56.
- <sup>27</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2008. P 7. Disponible en: <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourepidemic/epidemiologypublications/2008>. Acceso Enero 2012.
- <sup>28</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2010. P 32. Disponible en: [http://www.unaids.org/documents/20101123\\_globalreport\\_em.pdf](http://www.unaids.org/documents/20101123_globalreport_em.pdf). Acceso Julio 2012.
- <sup>29</sup> Aral SO, Padian NS, Holmes KK. Advances in multilevel approaches to understanding the epidemiology and prevention of sexually transmitted infections and HIV: an overview. *J Infect Dis* 2005; 191 (Suppl 1): S1–6.
- <sup>30</sup> Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000; 342: 921-29.
- <sup>31</sup> Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, et al. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 2005; 191: 1403-09.
- <sup>32</sup> Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 33-42.
- <sup>33</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2008. P 33. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaid/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510\\_2008globalreport\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaid/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510_2008globalreport_en.pdf). Acceso Enero 2012.
- <sup>34</sup> Glick M. Rapid HIV testing in the dental setting. *JADA* Sep 2005; Vol. 136.
- <sup>35</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2010. P 50. Disponible en: [http://www.unaids.org/documents/20101123\\_globalreport\\_em.pdf](http://www.unaids.org/documents/20101123_globalreport_em.pdf). Acceso Julio 2012.
- <sup>36</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid report on the global AIDS epidemic 2008. P 35. Disponible en: <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourepidemic/epidemiologypublications/2008>. Acceso Enero 2012.
- <sup>37</sup> Gatell JM, Zulaca D, Del Romero J, et al. Cómo promover y facilitar el diagnóstico precoz de la infección por VIH-1: papel de los odontólogos. *Cient Dent* Abr 2012; Vol. 7, n 1.
- <sup>38</sup> Euro HIV, Estonia 2005. Epidemiological surveillance of HIV infection and AIDS in Europe. Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/432726/Epidemiological-surveillance-of-HIV-infection--AIDS-in-Europe>. Acceso Enero 2012.

- <sup>39</sup> Instituto de Salud Carlos III. Registro Nacional de casos de Sida. Vigilancia Epidemiológica de Sida en España. Instituto de Salud Carlos III. Actualización a 30 de Junio de 2012. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-sida/sistemas-de-informacion-poblacionales-sobre-vih.shtml>. Acceso Diciembre 2012.
- <sup>40</sup> Organización de las Naciones Unidas. Report on the global AIDS epidemic 2008. P57. Disponible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510\\_2008globalreport\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2008/jc1510_2008globalreport_en.pdf). Acceso Enero 2012.
- <sup>41</sup> Barrio G, De La Fuente L, Toro C, et al. Injecting and HIV prevalence among young heroin users in three Spanish cities and their association with the delayed implementation of harm reduction programmes. *J Epid Comm Health*, 60(6): 537-42.
- <sup>42</sup> Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: Absence of intact nef sequences in a long term survivor with non-progressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995, 332:228-32.
- <sup>43</sup> Marks G, Crepaz N, Jansen RS. Estimated sexual transmission of HIV from persons aware and unaware that they are infected with the virus in the USA. *AIDS* 2006; 20:1447-50.
- <sup>44</sup> Marks G, Crepaz N, Janssen RS. Estimated sexual transmission of HIV from persons aware and unaware that they are infected with the virus in the USA. *AIDS* 2006;20:1447-50.
- <sup>45</sup> Instituto de Salud Carlos III. Encuesta hospitalaria de pacientes con VIH/SIDA. Evolución 2000-2011. Resultados 2011. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-sida/Informe-Encuesta-hospitalaria-2011.pdf>. Acceso Noviembre 2012.
- <sup>46</sup> Cohen M. HIV and sexually transmitted disease: lethal synergy. *Top HIV Med* 2004;12(4):104-7.
- <sup>47</sup> Diagnóstico de sífilis y gonococia en una red de centros de ITS: características clínico epidemiológicas. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/grupotrabajoits.pdf>. Acceso Noviembre 2012.
- <sup>48</sup> Hoffman, Rockstroh, Kamps. *HIV Medicine* 2005. Libro. Pp 61-67.
- <sup>49</sup> Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thkallapally R. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 2001; 58: 19-42.
- <sup>50</sup> Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev* 2005; 7:210-24.
- <sup>51</sup> Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1108-14.

- 
- <sup>52</sup> Coffin JM, Retroviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM., Howley PM., Griffin DE, et al. Eds. Fields virology 3<sup>rd</sup> Ed. Philadelphia, New York: Lippencott-Raven, 1996: 348: 31-35.
- <sup>53</sup> Oh SY, Cruickshank WW, Raina J, et al. Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *J Acquired Immune Defic Syndr* 1992, 5:251.
- <sup>54</sup> Sunila I, Vaccarezza M, Pantaleo G, Fauci AS, Orenstein JM. GP120 is present on the plasma membrane of apoptotic CD4 cells prepared from lymphnodes of HIV-1-infected individuals: an immunoelectron microscopic study. *AIDS* 1997, 11:27-32.
- <sup>55</sup> Hoffman, Rockstroh, Kamps. HIV Medicine 2005. Libro. Pp 70-75.
- <sup>56</sup> Chun TW, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997 May 8; 387(6629):183-8.
- <sup>57</sup> Chun TW, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. 5<sup>th</sup> Conf Retrovir Oppor Infect. 1998 Feb 1-5;176 (abstract n° 515).
- <sup>58</sup> Sotrel A, Dal Canto MC. HIV-1 and its causal relationship to immunosuppression and nervous system disease in AIDS: a review. *Hum Pathol* 2000; 31:1274-1298.
- <sup>59</sup> Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* 2003; 13: 39-56.
- <sup>60</sup> Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997 Nov; vol. 278, n°5341, p:1291.
- <sup>61</sup> Gatell JM, Clotet B, Podzamczer D. Guía práctica del SIDA: Clínica, diagnóstico y tratamiento. 10<sup>a</sup> Edición. Ed. Masson 2010; P 26.
- <sup>62</sup> Gatell JM, Clotet B, Podzamczer D. Guía práctica del SIDA: Clínica, diagnóstico y tratamiento. 10<sup>a</sup> Edición. Ed. Masson 2010; Pp 27-35.
- <sup>63</sup> Finzi D, Hermankova M, Pierson T et al.: Identification of a reservoir for HIV-1 in patients of highly active antiretroviral therapy. *Science*, nov.1997, vol.278, n°5341, p 1295.
- <sup>64</sup> Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, et al. Cross-linking CD4 by HIV gp120 primes T cells for activation induced apoptosis. *J Exp Med* 1992, 176:1099-106.
- <sup>65</sup> Balabanian K, Harriague J, Decroin C, et al. CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2004; 173: 7150-60.
- <sup>66</sup> Cicala C, Arthos J, Selig SM, et al. HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:9380-85.
- <sup>67</sup> Ray N, Doms RW. HIV-1 coreceptors and their inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunolo* 2006; 303: 97-120.

- 
- <sup>68</sup> Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 777-810.
- <sup>69</sup> Platt EJ, Durnin JP, Kabat D. Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *J Virol* 2005; 79: 4347-56.
- <sup>70</sup> Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Plainview, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- <sup>71</sup> Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002; 8: 673-680.
- <sup>72</sup> Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* 1996, 17:217-24.
- <sup>73</sup> Van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 697-709.
- <sup>74</sup> Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100: 587-597.
- <sup>75</sup> Dean M, Carrington M, Wincler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science* 1996; 273: 1856.
- <sup>76</sup> Gatell JM, Clotet B, Podzamczar D. *Guía práctica del SIDA: Clínica, diagnóstico y tratamiento*. 10ª Edición. Ed. Masson 2010; p 31.
- <sup>77</sup> Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; 280: 1949-1953.
- <sup>78</sup> Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, et al. The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 2004; 427: 848-853.
- <sup>79</sup> Bublinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir of HIV-1 infection. *Science* 1991; 254: 423-427.
- <sup>80</sup> Jordan A, Defechereux P, Verdin E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *Embo J* 2001; 20: 1726-1738.
- <sup>81</sup> Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 co-receptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 657-700.
- <sup>82</sup> Maddon PJ, Dalgleish JS, Mc Dougal PR, et al. The T4 gene encodes the AIDS receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986; 47: 333-348.
- <sup>83</sup> Pomerantz JL, Baltimore D. Two pathways to NF- $\kappa$ B. *Molecular Cell* 2002; 10: 693-701.

- 
- <sup>84</sup> Alcamí J, Laín T, Folgueira L, et al. Absolute dependence on kB responsive elements for initiation and tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T Lymphocytes. *EMBO J* 1996; 14: 1552-1560.
- <sup>85</sup> Bermejo M, Sánchez-Palomino S, Usán L, Alcamí J. Dynamics of HIV Replication in Lymphocytes and Consequences in the Efficacy of Protease inhibitors. *J Med Virol* 2004 (en prensa).
- <sup>86</sup> Von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, et al. The protein network of HIV budding. *Cell* 2003; 114: 701-713.
- <sup>87</sup> Gatell JM, Clotet B, Podzamczer D. Guía práctica del SIDA: Clínica, diagnóstico y tratamiento. 8ª Edición. Ed. Masson 2005; Página 9.
- <sup>88</sup> Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, et al. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990; Apr 20; 61(2): 213-22.
- <sup>89</sup> Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature Rev Microbiol* 2003; 1: 25-34.
- <sup>90</sup> Brodie SJ, Determinants of mucosal HIV replication and shedding. The PRN notebook. Vol.7 nº4. December 2002. Disponible en: [www.PRN.org](http://www.PRN.org). Acceso Enero 2012.
- <sup>91</sup> Moore JS, Rahemtulla F, Kent WL, Hall SD, Ikizler MR, Wright PF, Nguyen HH, Jackson S. Oral epithelial cells are susceptible to cell-free and cell-associated HIV-1 infection in vitro. *Virology* 313 (2003) 343-353.
- <sup>92</sup> Cameron PU, Lowe MG, Crowe SM. Susceptibility of dendritic cells to HIV-1 infection in vivo. [J Leukoc Biol](http://www.jleukocbiol.org). 1994 Sep;56(3):257-65.
- <sup>93</sup> Dezzutti CS, Guenther PC, Cummins Jr. JE, Cabrera T, Marshall JH, Dillberger A, et al. 2001. Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 183, 1204-1213.
- <sup>94</sup> Jung HC, Eckmann L, Yang SK, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; 95:55-65.
- <sup>95</sup> Cummins JE Jr., Dezzutti CS. Sexual HIV-1 transmission and mucosal defense mechanisms. *AIDS Rev* 2000; 2:144-54.
- <sup>96</sup> Phillips DM, Zacharopoulos VR, Tan X, Pearce-Pratt R. Mechanisms of sexual transmission of HIV: Does HIV infect intact epithelia?. *Trends Microbiol* 1994; 2:454-8.
- <sup>97</sup> Delezay O, Koch N, Yahi N, Hammache D, Tourres C, Tamalet C, et al. Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29. *AIDS* 1997;11; 1311-1318.
- <sup>98</sup> Harouse JM, Laughlin MA, Pletcher C, Friedman HM. Entry of HIV-1 into glial cells proceeds via an alternate, efficient pathway. *J Leukoc Biol*, 1991, 49: 605-609.

- 
- <sup>99</sup> Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thompson DA, Petraki K, Westwick J. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104:1061-1069.
- <sup>100</sup> Murdoch C, Monk PN, Finn A. Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology* 1999, 98; 36-41.
- <sup>101</sup> Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 1997, 235:179-90.
- <sup>102</sup> Chou LL, Epstein J, Cassol SA, West DM, He W, Firth JD. Oral mucosal Langerhans' cells as target, effector and vector in HIV infection. *J Oral Pathol Med* 2000, 29; 394-402.
- <sup>103</sup> Liu X, Zha J, Chen H, Nishitani J, Camargo P, Cole SW, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection and replication in normal human oral keratinocytes. *Journal of Virology* Mar 2003, p 3470-3476.
- <sup>104</sup> Qureshi Nasar M, Barr Charles E, Seshamma T, Reidy J, Pomerantz RJ, Bagasra O. Infection of oral mucosal cells by human immunodeficiency virus type 1 in seropositive persons. Concise communication, *J Infec Dis* 1995;171:190-3.
- <sup>105</sup> Stahl-Henning C, Steinman RM, Tenner-Racz K, Pope M, Stolte N, Matz-Rensing K, et al. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science* 1999;285:1261-1265.
- <sup>106</sup> Walker DM. Review article. Oral Mucosal Immunology: An Overview. *Ann Acad Med Singapore* 2004;33(Suppl):275-305.
- <sup>107</sup> Czerkinsky C, Anjuere F, McGhee JR, George-Chaudy A, Holmgren J, Kieny MP, et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunology Review*. 199, Aug; 170:197-222.
- <sup>108</sup> Shugars DC, Walh SM. The role of the oral environment in HIV-1 transmission. *J Am Dent Assoc* 1998; 129:851-8.
- <sup>109</sup> Corthesy B, Spertini F. Secretory immunoglobulin A: From mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 1999; 380:1251-62.
- <sup>110</sup> McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 1995; 96:456-64.
- <sup>111</sup> Diane C. Shugars. Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *JID* 199; 179 (Suppl 3):S431-S434.
- <sup>112</sup> Page R. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 1998; 3:108-20.
- <sup>113</sup> Han Y, Ventura CL, Black KP. Productive Human Immunodeficiency virus-1 Infection of epithelial cell lines of salivary gland origin. *Oral Microbiol Immunol*, 2000, Apr; 15(2): 82-8.

- 
- <sup>114</sup> Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- <sup>115</sup> Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowoski H, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997, 3:1369-1375.
- <sup>116</sup> Delgado E, Finkel V, Baggiolini M, Clark-Lewis I, Mackay CR, Steinman RM, et al. Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several  $\beta$  chemokines. *Immunobiol* 1998, 198:490-500.
- <sup>117</sup> Reece JC, Handley A, Anstee J, Morrison W, Crowe SM, Cameron PU. HIV-1 selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin. *J Exp Med* 1998,187:1623-1631.
- <sup>118</sup> Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. Immature dendritic cells selectively replicate M-tropic HIV-1, while mature cells efficiently transmit both M-and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 1998, 72:2733-2737.
- <sup>119</sup> Ingulli E, Mondino A, Khortus A, Jenkins MK. In vitro detection of dendritic cell antigen presentation to CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997, 185:2133-2141.
- <sup>120</sup> Gandhi RT, Chen Bk, Straus SE, Dale JK, Lenardo MJ, Baltimore D. HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism. *J Exp Med* 1998, 187:1113-1122.
- <sup>121</sup> Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, Chen D, Wei Y, Isdell F, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 1996, 184:2433-2438.
- <sup>122</sup> Granelli-Piperno A, Finkel V, Delgado E, Steinman RM. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Current Biology* 1999, 9:21-29.
- <sup>123</sup> Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200: 761–70.
- <sup>124</sup> Cimarelli A, Zambruno G, Marconi A, Girolomoni G, Bertazzoni U, Giannetti A. Quantitation by competitive PCR of HIV-1 proviral DNA in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994, 7:230-235.
- <sup>125</sup> Canque B, Rosenzweig M, Camus S, Yagello M, Bonnet M-L, Guigon M, et al. The effect of in vitro human immunodeficiency virus infection on dendritic-cell differentiation and function. *Blood* 1996, 88:4215-4228.
- <sup>126</sup> Blauvelt A, Asada H, Saville MW, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Yarchoan R, et al. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J Clin Invest* 1997, 100:2043-2053.
- <sup>127</sup> Tsunetsugu-Yokota Y, Yasuda S, Sugimoto A, Yagi T, Azuma M, Yagita H, et al. Efficient virus transmission from dendritic cells to CD4+ T cells in response to antigen depends on close contact through adhesion molecules. *Virology* 1997, 239:259-268.

- 
- <sup>128</sup> Cameron PU, Pope M, Gezelter S, Steinman RM. Infection and apoptotic cell death of CD4<sup>+</sup> T cells during an immune response to HIV-1 pulsed dendritic cells. *Aids Res Hum Retrovir* 1994, 10:61-71.
- <sup>129</sup> Pope M, Gezelter S, Gallo N, Hoffman L, Steinman RM. Low levels of HIV-1 in cutaneous dendritic cells initiate a productive infection upon binding to memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1995, 182:2045-2056.
- <sup>130</sup> Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li H, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell specific survival factor. *J Exp Med* 1997, 186:2075-2080.
- <sup>131</sup> Kumar RB, Maher DM, Herzberg MC, et al. Expression of HIV receptors, alternate receptors and co-receptors on tonsillar epithelium: implications for HIV binding and primary oral infection. *Virology* 2006; Apr 6; 3: 25.
- <sup>132</sup> Nave H, Gerbert A. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anat Embriol (Berl)*. 2001 Nov; 204(5): 367-73.
- <sup>133</sup> Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today*. 1998 Sep; 19(9): 414-21.
- <sup>134</sup> Hedges SR, Agace WW, Svanborg C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol* 1995 Jul; 3(7): 266-70.
- <sup>135</sup> Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005; 11(4 Suppl): S45-53.
- <sup>136</sup> Maher D, Wu X, Schacker T, et al. A model system of oral HIV exposure using human palatine tonsil, reveals extensive binding of HIV infectivity, with limited progression to primary infection. *J Inf Dis* 2004, 190(11): 1989-1997.
- <sup>137</sup> Baba TW, Trichel AM, An L, Liska V, Martin LN, Murphey-Corb M. Infection and AIDS in adult macaques after nontraumatic oral exposure to cell-free SIV. *Science* 1996, 272(5267): 1486-1489.
- <sup>138</sup> Milush JM, Kosub D, Marthas M, Schmidt K, Scott F, Wozniakowski A, et al. Rapid dissemination of SIV following oral inoculation. *Aids* 2004, 18(18):2371-2380.
- <sup>139</sup> Stahl-Hennig C, Steinman RM, Tenner-Racz K, Pope M, Stolte N, Matz-Rensing K, et al. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science* 1999, 285(5431):1261-1265.
- <sup>140</sup> Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P, Wenig BM, Hansen CH, Heffner D, et al. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol* 1997, 151(1):89-96.
- <sup>141</sup> Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355-8.

- 
- <sup>142</sup> Patel M, Yanagishita M, Roderiquez G, Bou-Habib DC, Oravec T, Hascall VC, et al. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993, 9(2):167-174.
- <sup>143</sup> Liuzzi G, Chirianni M, Clementi P, Bagnarelli A, Valenza PT, Cataldo, et al. Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS* 1996,10:F51-F56.
- <sup>144</sup> Fultz P. Components of saliva inactivate human immunodeficiency virus. *Lancet* 1986, ii:1215.
- <sup>145</sup> Shine N, Konopka K, Duzgunes N. The anti-HIV-1 activity associated with saliva. *J Dent Res* 1997, 76:634-640.
- <sup>146</sup> Jannoff EN, Scamurra TC, Sanneman K, Eidman, Thurn JR. Human immunodeficiency virus type 1 and mucosal humoral defense. *J Infect Dis* 1999,179:S475-S479.
- <sup>147</sup> Bergey EJ, Cho MI, Blumberg BM, et al. Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7:995-1002.
- <sup>148</sup> Robinovitch MR, Iversen JM, Resnick L. Anti-infectivity activity of human salivary secretions toward human immunodeficiency virus. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4:455-9.
- <sup>149</sup> Rodríguez Íñigo E, Jiménez E, Bartolomé J, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA by in situ hybridization in oral mucosal epithelial cells from anti-VIH-1 positive patients. *J Med Virol.* 2005 sep;77(1):17-22.
- <sup>150</sup> Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *Advances in immunology.* Volume 343, Number 1:37-49.
- <sup>151</sup> Embretson J, Zupanic M, Ribas JL, et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993, 362:359-62.
- <sup>152</sup> Gatell JM, Clotet B, Podzamczar D. Guía práctica del SIDA: Clínica, diagnóstico y tratamiento. 8ª Edición. Ed. Masson 2005; p 20.
- <sup>153</sup> Sereti I, Lane HC. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus: implications for immune-based therapies. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1738-1755.
- <sup>154</sup> Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:625-656.
- <sup>155</sup> Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-1586.
- <sup>156</sup> Ten Cate AR. Oral histology: development, structure, and function. Ed. Mosby 2003, 5th. Ed. Chap 16; 345-350..
- <sup>157</sup> Ten Cate AR. Oral histology: development, structure, and function. Ed. Mosby 2003, 5th. Ed. Chap 16; 370-385..

- 
- <sup>158</sup> Bandrés JC, Zolla-Pazner S. Inmunidad humoral en la infección por el VIH. Eds. Infección por el VIH 1999. Madrid: Doyma, 1999.
- <sup>159</sup> Nabel GJ, Sullivan J. Antibodies and resistance to natural HIV infection. *N Eng J Med* 2000; 343: 17-19.
- <sup>160</sup> Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000; 6: 207-210.
- <sup>161</sup> Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nature Med* 2003; 7: 861-866.
- <sup>162</sup> McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001; 410: 980-987.
- <sup>163</sup> Pitcher CJ. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nature Med* 1999; 5: 518-525.
- <sup>164</sup> Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997; 278: 1447-1450.
- <sup>165</sup> McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001;410: 980-987.
- <sup>166</sup> Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in aids virus infections. *Nature Med* 2003; 7: 861-866.
- <sup>167</sup> Mackewicz CE, Blackburn DJ, Levy JA. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2308-2312.
- <sup>168</sup> Cocchi F, De Vico AL, Garnizo-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-1 suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270: 1811-1815.
- <sup>169</sup> Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382: 833-835.
- <sup>170</sup> Bermejo M, Martin Serrano J, Alonso J, Pablos JL, Gamallo C, et al. SDF-1 production by dendritic cells and regulation of CXCR4 in T lymphocytes. XIV International AIDS Conference, Barcelona, Julio 2002. (Abstract nº 1137).
- <sup>171</sup> Le Borgne S, Fevrier M, Callebaut C, et al. CD(+)-Cell antiviral factor activity is not restricted to human immunodeficiency virus (HIV)-specific T cells and can block HIV replication after initiation of reverse transcription. *J Virol* 2000; 74: 4456-4464.
- <sup>172</sup> Métodos de detección del VIH-1. Septiembre 1998. Disponible en: [www.ctv.es](http://www.ctv.es). Acceso Enero 2012.
- <sup>173</sup> Hodinka RL, Nagashunmugam T, Malamud D. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. *Clin Diagn Lab Immunol*, July 1998, p.419-26.

- 
- 174 Archibald DW, Zon LI, Groopman JE, A JS, Mc Lane MF, Essex ME. *J Clin Microbiol.* 1986 Nov; 24(5):873-5.
- 175 Archibald DW, Zon L, Groopman JE, Mc Lane MF, Essex M. *Blood.* 1986 Mar;67(3):831-4.
- 176 Malamud D, Friedman HM. HIV in the oral cavity; virus, viral inhibitory activity, and antiviral antibodies: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4:461-466.
- 177 Lehner T. Gingival crevicular fluid. In *Immunology of oral diseases*, 3<sup>rd</sup> Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom. 1992 p. 18-27.
- 178 Roitt I, Lehner T. Oral immunity. In *Immunology of oral diseases*, 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom. 1983; p. 279-304.
- 179 Klokke AH, Ocheng D, Kalluvya SE, Nicoll AG, Laukamm-Josten U, Parry UJV, et al. Field evaluation of immunoglobulin G antibody capture tests for HIV-1 and HIV-2 antibodies in African serum, saliva and urine. *AIDS* 1991; 5:1391-1392.
- 180 Gaudette D, North L, Hindahl M, Griffin K, Klimkow N, Thieme T. Stability of clinically significant antibodies in saliva and oral fluid. *J Clin Immun* 1994; 17:171-175.
- 181 Cell JA, Parry V, Mortimer PP, Duncan J. Novel assay for the detection of immunoglobulin G antihuman immunodeficiency virus in untreated saliva and urine. *J Med Virol* 1993;41:159-164.
- 182 Gallo D, George JR, Fitchen JH, Goldstein AS, Hindahl MS, and the Orasure HIV Clinical trials Group. Evaluation of a system using oral mucosal transudate for HIV-1 antibody screening and confirmatory testing. *JAMA* 1997; 277:254-258.
- 183 Campo J, Perea MA, Del Romero J, Cano J, Et al. Review: Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral Diseases* 2006, 12; 219-228.
- 184 O'Shea S, Cordery M, Barrett WY, et al. HIV excretion patterns and specific antibody reponses in body fluids. *J Med Virol* 1990, 31: 291-296.
- 185 Artenstein AW, VanCott TC, Sitz KV, et al. Mucosal immune reponses in four distinct compartments of women infected with human immunodeficiency virus type 1: a comparison by site and correlation with clinical information. *J Infect Dis* 1997,175: 265-271.
- 186 Challacombe SJ and Sweet SP. Oral mucosal immunity and HIV infection: current status. *Oral Dis* 2002;8 (suppl.2): 55-62.
- 187 Nagashunmugam T, Malamud D, Davis C et al. Human submandibular saliva inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection by displacing envelope glycoprotein Gp120 from the virus. *J Infect Dis* 1998;178: 1635-1641.
- 188 Crombie R, Silverstein RL, MacLow C, et al. Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. *J Exp Med* 1998; 187:25-35.

- 
- <sup>189</sup> Nakashima H, Yamatmoto N, Masuda M, Fuhii N. Defensins inhibit HIV replication in vitro [Letter]. *AIDS* 1993; 7:1129.
- <sup>190</sup> Cole AM y Lehrer RI. Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. *Curr Pharm Des* 2003;9: 1463-1473.
- <sup>191</sup> Shugars DC, Sauls DL, Weinberg JB. Secretory leukocyte protease inhibitor blocks infectivity of primary monocytes and mononuclear cells with both monocytoprotropic and lymphocytoprotropic strains of human immunodeficiency virus type I. *Oral Dis* 1997; 3(Suppl 1):S70-2.
- <sup>192</sup> Eisenberg SP, Hale KK, Heimdal P, Thompson RC. Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Biol Chem* 1990, 265:976-7981.
- <sup>193</sup> Ying QL, Kemme M, Simon SR: Functions of the N-terminal domain of secretory leukocyte protease inhibitor. *Biochemistry* 1994, 33:5445-5450.
- <sup>194</sup> Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, et al. Expression of the secretory leukocyte protease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest* 1991, 87:2207-2215.
- <sup>195</sup> Stromatt SC. Secretory leukocyte protease inhibitor in cystic fibrosis. *Proteases, Protease Inhibitors and Protease-derived Peptides*. Basel Birkhäuser Verlag. 1993, pp 130-110.
- <sup>196</sup> Mc Neely TB, Dealy M, Dripps DJ et al.. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 1995;96: 456-464.
- <sup>197</sup> Wahl SM, McNeely TB, Shugars D, Worley P, Tucker C, Orenstein JM, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-1. *Oral Dis* 1997 (in press).
- <sup>198</sup> Grütter MG, Fendrich G, Hubert R, Bode W. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analyzed in its complex with bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. *EMBO J* 1988; 7:345-51.
- <sup>199</sup> Mc Neely TB, Tucker C, Shugars DC, Rosendhal M, Eisenberg SP, Wahl SM. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* 1997; 90:1141-9.
- <sup>200</sup> Wahl SM, McNeely TB, Janoff EN, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV. *Oral Dis* 1997; 3(Suppl 1): S64-9.
- <sup>201</sup> Thompson RC, Ohlsson K. Isolation, properties and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:6692.
- <sup>202</sup> Wahl SM, Worley P, Jin WW, McNeely TB, Eisenberg S, Fasching C, et al. Anatomic dissociation between HIV-1 and its endogenous inhibitor in mucosal tissues. *Am J Pathology* 1997 Apr; Vol. 150 n°4.
- <sup>203</sup> Schiott CR, Loe H,: The origin of and variation in number of leucocytes in the human saliva. *J Periodont Res* 1970, 5:6-41.

- 
- 204 Sweet SP, Rahman D, Challacombe SJ. Ig A subclasses in HIV disease: dichotomy between raised levels in serum and decreased secretion rates in saliva. *Immunology* 1995; 86:556-9.
- 205 Matsuda S, Oka S, Honda M, et al. Characteristics of Ig A antibodies against HIV-1 in sera and saliva from HIV-seropositive individuals in different clinical stages. *Scand J Immunol* 1993; 38:428-34.
- 206 Hussain LA, Lehner T. Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptor for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. *Immunology* 1995, 85:475-484.
- 207 Pant Pai N. Oral fluid-based rapid HIV testing: issues, challenges and research directions. *Expert Rev Mol Diagn* 2007;7(4), 325-328.
- 208 Gottfried TD, Mink RW, et al. Calypte AWARE HIV-1/2 OMT antibody test using oral fluid: special challenges of rapid HIV testing in the developing world. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6, 139-144.
- 209 Branson BM. FDA approves OraQuick for use in saliva. On March 25, the FDA approved the first rapid test for HIV in oral fluids. *AIDS Clin Care* 2004;16, 39.
- 210 Medina R, Morán E, Regalado MA. La saliva como medio diagnóstico del VIH. *Rev Cubana Estomatol* 2000; 37(3):146-56.
- 211 Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW. HIV Testing in a High-Incidence Population: Is antibody Testing Alone Good Enough?. *CID* 2009 Aug 1:49.
- 212 Pink R, Simek J, Vondrakova J. Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomuc Czech Repub* 2009, 153(2):103-110.
- 213 Turner RJ. Mechanisms of fluid secretion by salivary glands. *Ann NY Acad Sci* 1993; 694:24-35.
- 214 Gilks CF, Balbirnie E. Testing sputum samples for HIV antibodies using a rapid, saliva-card test system. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91:115-7.
- 215 Gilks CF, Balbirnie E. Testing sputum samples for HIV antibodies using a rapid, saliva-card test system. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91:115-7.
- 216 Gleeson M, Allan W, Clancy RT. Modifiers of the human mucosal immune system. *Immunol Cell Biol* 1995:379-404.
- 217 Stekler JD, Wood RW, Swenson PD, Golden M. Negative and rapid HIV antibody testing during early HIV infection. *Ann Intern Med* 2007; 147:147-8.
- 218 Repeatedly False-Negative Rapid HIV Test Results in a Patient with Undiagnosed Advanced AIDS. *Letters. Annals Of Internal Medicine* 2008, Jul 1. Vol 49, nº1.
- 219 Reynolds SJ, Muwonga J. Oraquick ADVANCED Rapid HIV-1/2 antibody test. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4, 587-591.

- 
- 220 Academia Biomédica Digital. Medicina molecular: nueva perspectiva en Medicina. Microbiología e infectología.
- 221 Torres M. Diagnóstico de infecciones con técnicas de biología molecular. Boletín de la Escuela de Medicina. Universidad Católica de Chile.1997. Vol. 26 nº 3.
- 222 Aguirre Urizar JM, Echebarría Goicuría MA, Eguía del valle A. Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida: manifestaciones en la cavidad bucal. Med Oral Patol Cir Bucal 2004; 9 Suppl:S148-57.
- 223 Saini R. Oral Lesions: A true clinical indicator in human immunodeficiency virus. J Nat Sci Biol Med. 2011. Jul-Dec; 2(2):145-150.
- 224 AAHIVM Fundamentals of HIV Medicine, 2007. Libro. Pp 457-473.
- 225 Bascones A, Serrano C, Campo J. Manifestaciones de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en la cavidad bucal. Med Clin (Barc) 2003;120(11):426-34.
- 226 Podzamczar D, Bolae F,Pagerols X, et al. Leucoplasia vellosa: una nueva enfermedad de la mucosa asociada con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Med Clin Barc 1989;92:488-91.
- 227 Cruchley AT, Williams DM. Epstein-Barr virus: biology and disease. Oral Diseases 1997; 3 (Suppl 1):156-63.
- 228 Reichart PA. Oral Ulcerations in HIV infection. Oral Diseases 1997; 3 (Suppl 1):180-2.
- 229 Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL. Tratamiento odontológico del paciente bajo tratamiento médico . 5ª Ed. México: Harcourt Brace, 1995; 325-56.
- 230 Ficarra G. Oral ulcers in HIV-infected patients: an update on epidemiology and diagnosis. Oral Diseases 1997;3 (Suppl 1):183-9.
- 231 Ficarra G, Shillitoe EJ. Oral melanotic macules in patient infected with human immunodeficiency virus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1990; 70:748-55.
- 232 Reichart PA. Oral Ulcerations in HIV infection. Oral Diseases 1997. 3 (Suppl. 1):180-2.
- 233 Challambe SJ, Coogan MM; Williams DM. Overview of the Fourth International Workshop on the oral manifestation of HIV infection. Oral Dis 2002; 8:9-14.
- 234 Leao JC, Ribeiro CMB, et al. Oral complications of HIV disease. Clinics 2009;64(5):459-70.
- 235 Patton LL, Phelan JA, Ramos-Gomez FJ, et al. Prevalence and classification of HIV-associated oral lesions. Oral Dis. 2002;8 Suppl 2:98-109.
- 236 Diz P, Ocampo A, Miralles C. Changing prevalence of human immunodeficiency virus-associated oral lesions. Oral Surgery Oral Medicine Oral pathology. October 2000. Letters to the editor. Pp 403-4.

- 
- 237 Aguirre JM, Echebarría MA, Ribacoba L. Reduction of HIV-associated oral lesions after highly active antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* Aug 1999. Letters to the editor. Pp: 114-5.
- 238 Grando LJ, Yurgel LS, Machado DC, et al. The association between oral manifestations and the socioeconomic and cultural characteristics of HIV-infected children in Brazil and in the United States of America. *Rev Panam Salud Publica* 2003;14:112-8.
- 239 Ceballos Salobreña A, Gaitán Cepeda LA, Ceballos García L. Oral Lesions in HIV/AIDS patients undergoing highly active antiretroviral treatment including protease inhibitors: A new face of oral AIDS? *AIDS Patient Care STDS* 2000; 12:627-35.
- 240 Reznik DA. Oral Manifestations of HIV Disease. International Aids Society USA. *Topics in HIV Medicine* Dec 2005/ Jan 2006. Vol 3, nº 5.
- 241 Patton LL, McKaig RG, Eron JJ. Oral Hairy Leukoplakia and Oral Candidiasis as predictors of HIV viral load. *AIDS* 1999;13:2174-6.
- 242 Greenspan D, Canchola AJ, Macphail LA, et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on frequency of oral warts. *Lancet* 2001; 357:1411-2.
- 243 Li TS, Tubiana R, Katlama C, et al. Long-lasting recovery of CD4 T-cell function and viral load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998; 351:1682-6.
- 244 Kaufman GR, Bloch M, Zaunders JJ, et al. Long-term immunological response in HIV-1-infected subjects receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14:959-69.
- 245 King MD, Reznik DA, O'Daniels CM, et al. Human papillomavirus-associated oral warts among human immunodeficiency virus-seropositive patients in the era on highly active antiretroviral therapy: an emerging infection. *Clin Infect Dis*. 2002;34:641-648.
- 246 Tying SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis and host immune response. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43:18-26.
- 247 King MD, Reznik DA, et al. Human Papillomavirus-Associated Oral Warts among Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients in the era of Highly Active Antiretroviral Therapy: An Emerging Infection. *Clin Infect Dis* 2002; 34:641-8.
- 248 Jacobson MA, Zegans M, Pavan PR, et al. Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 1997; 349:1443-5.
- 249 Coutlée F, Trottier AM, Ghattas G, et al. Risk factors for oral human papillomavirus in adults infected and not infected with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis* 1997; 24:23-31.
- 250 Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*, Apr 2008; pp. 334-359.
- 251 Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006; 22:552-557.

- 
- 252 Gillis D, Klaus S, Schnur F, et al. Diffusely disseminated cutaneous *Leishmania major* infection in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:247-249.
- 253 López-Vélez R, Pérez-Molina JA, Guerrero F, et al. Clinico-epidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:436-443.
- 254 Olivier M, Badaro F, Medrano J, Moreno J. The pathogenesis of *Leishmania*/VIH co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(Suppl. 1):79-98.
- 255 Zhao C, Papadopoulo B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha. *J Immunol* 2004; 172:3086-3093.
- 256 WHO. *Leishmania*/HIV co-infection. Epidemiological analysis of 692 retrospective cases. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72:49-54.
- 257 Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(Suppl.1):3-15.
- 258 Cacopardo B, Nigro L, Preiser W, Fama A, et al. Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:434-435.
- 259 Preiser W, Cacopardo B, Nigro L, et al. Immunological findings in HIV-*Leishmania* co-infection. *Intervirology* 1996; 39:285-288.
- 260 Bernier R, Turco SJ, Olivier M, Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoid cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol* 1995; 69:7282-7285.
- 261 Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jiménez M, Laguna R, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first ten years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:298-319.
- 262 Paredes R, Muñoz J, Díaz L, Domingo M, et al. *Leishmaniasis* in HIV infection. *J Postgrad Med* 2003; 49:39-49.
- 263 Centers for Disease, Control and Prevention. Update: transmission of HIV infection during an invasive dental procedure. Florida. *MMRW Morb Mortal Wkly Rep* 1991b; 40:377-381.
- 264 Ciesielski C, Marianos D, Ou CY, Dumbaugh R, White J, Berkelman R, et al. Transmission of human immunodeficiency virus in a dental practice. *Ann Intern Med* 1992;116:798-805.
- 265 Flint SR, Croser D, Reznik D, Glick M, Naidoo S, Coogan M. HIV Transmission in the dental setting and the HIV-infected Oral Health Care Professional: Workshop 1C. *Adv Dent Res* 2011; 23(1):106-9.
- 266 Croser D. Written off. *Br Dent J* 2006; 201:497-499.

- 
- 267 Porco TC, Martin JN, Page-Shafer KA. Decline in HIV infectivity following the introduction of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18:81-88.
- 268 Gostin LO. Workers living with HIV/AIDS and other blood-borne pathogens. *JAMA* 2000; 284:1965-1970.
- 269 Callacombe SJ. Beijing Declaration. *Adv Dent Res* 2011 23:6.
- 270 Van Wijk PTL, Meiberg AE, Bruers JJM, et al. The risk of blood exposure incidents in dental practices in the Netherlands. *Community Dent Oral Epidemiol* 2012; 40: 567-573.
- 271 Coogan MM, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral Lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bulletin of the World Health Organization*. Sep 2005; 83 (9).
- 272 Greenspan JS, Greenspan D. The epidemiology of the oral lesions of HIV infection in the developed world. *Oral Diseases* 2002; 8 Suppl 2:34-9.
- 273 Schmidt-Westhausen AM, Priepke F, Bergmann FJ, et al. Decline in the rate of oral opportunistic infections following introduction of highly active antiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:336-41.
- 274 Cruz I, Morales MA, Noguer I, et al. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002; 359:1124-1125.
- 275 Butt FM, Vaghela VP, Chindia ML. Correlation of CD4 counts and CD4/CD8 ratio with HIV-infection associated oral manifestations. *East Afr Med J* 2007 Aug; 84(8):383-8.
- 276 Milman G, Sharma O. Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1305-1312.
- 277 Herzberg MC, Weinberg A, Wahl SM. The oral epithelial cell and first encounters with HIV-1. *Adv Dent Res* Apr 2006;19:158-166.
- 278 Chu T, Jaffe R. The normal Langerhans cell and the LCH cell. *Br J Cancer Suppl* 1994 Sep; 23:S4-10.
- 279 Rodríguez Íñigo E, Jiménez E, Bartolomé J, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA by in situ hybridization in oral mucosal epithelial cells from anti-HIV-1 positive patients. *J Med Virol*. 2005 sep;77(1):17-22.
- 280 Boy SC, Van Heerden MB, Wolfaardt M., et al. An investigation of the role of oral epithelial cells and Langerhans cells as possible HIV viral reservoirs. *J Oral Pathol Med* 2009; 38:114-119.
- 281 Malamud D, Rodríguez-Chavez I. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 2012 Jan; 55(1): 159-178.
- 282 Campo J, Cano J, Del Romero J, et al. Papel del odontólogo en la detección precoz de pacientes adultos con infección subyacente por VIH/Sida. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17:289-96.
- 283 Wesolowski LG, Mackellar DA, Facente SN, et al. Post marketing surveillance of

---

Oraquick whole blood and oral fluid rapid HIV testing. *AIDS* 2006 Aug 1; 20(12):1661-6.

<sup>284</sup> Johnson NW, Malamud D, Reznik D, et al. Mucosal fluids and biomarkers of clinical disease: Workshop 3B. *Advanced Dental Research* 2011; 23: 137.

<sup>285</sup> Malamud D, Wahl SM. The mouth: a Gateway or a trap for HIV?. *AIDS* 2010 Jan 2; 24(1):5-16.

<sup>286</sup> Coogan M, Challacombe S. *Journal of Dental Research* 2011; 90(4):397-398.

<sup>287</sup> Center for Disease Control and Prevention (CDC). False-Positive Oral Fluid Rapid HIV Tests. New York City, 2005—2008. 2008 Jun 18, CDC.

<sup>288</sup> Kent CK, Cahw JK, Wong W, et al. Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal chlamydia and gonorrhoeae detected in 2 clinical settings among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. *Clin Infect Dis* 2005;41:67-74.

<sup>289</sup> Baker J, Plankey M, Josayma Y, et al. The prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* among asymptomatic men who have sex with men in a prospective cohort in Washington, D.C. *AIDS Patient Care & STDs* 2009; 23:585-8.

<sup>290</sup> García Calich AL, Freire de Carvalho L. Sicca syndrome with parotid gland enlargement as the first manifestation of HIV. *Organo Oficial de la Sociedad Portuguesa de Reumatología. Acta Reumatol Port* 2010; 35:99.

<sup>291</sup> Arany I, Tyring SK. Systemic immunosuppression by HIV infection influences HPV transcription and thus local immune responses in condiloma acuminatum. *Int J STD AIDS* 1998; 9:268-71.

<sup>292</sup> Epstein JB. Oral malignancies associated with HIV. *JCDA* Dec 2007/Jan 2008; Vol. 73,nº10:953-56.

## **X. RESUMEN EN INGLÉS**

# **“Analysis and implications of HIV infection in the oral cavity”**

D<sup>a</sup> Esther Jiménez Martínez

Directores:

Profa. Dra. D<sup>a</sup> Carmen Gasco García

Prof. Dr. Manuel L. Fernández Guerrero

Dr. D. Juan José Arrieta Blanco

Madrid 2013

## **I. INTRODUCTION**

The first description of type I human immunodeficiency virus (HIV-1) dates from 1983, and HIV-2 in 1986. HIV infection is a pandemic. Over 65 million people have been infected and more than 25 million have died of AIDS in the past 25 years <sup>1</sup>. Worldwide, more than 40% of new infections occurring in adults are to people aged between 15 and 25. AIDS is now the leading cause of premature death among people aged 15 to 59 and only a fifth of the population of developed countries who need treatment receive antiretroviral therapy.

Heterosexual transmission represents 85% of all infections. In 2011 worldwide, the prevalence of HIV infection in the group of men who have sex with men (MSM) is up to 13 times higher in the cities. In Spain, sexual relations between men (MSM), is the most frequent mode of transmission representing 54% of the total number of new HIV infections <sup>2</sup>.

Onset of treatment in early stages improves prognosis in contrast to treatment that is established once the patient has a severe immunosuppression. Coupled with this, in the past years the cases of syphilis and gonorrhoea reported in Spain, are starting to soar <sup>3</sup>.

Among HIV detection mechanisms, specific antibody searching, is the most valuable mechanism to detect infected persons <sup>4,5,6</sup>. Currently the Center for Disease Control and Prevention (CDC), recommends rapid tests, results of which are obtained in less than 30 minutes, for HIV-1 detection in risk populations and health system for all adults ranging from 13 to 64 <sup>7</sup>.

At least 60 to 80% of HIV infected patients have an oral lesion at some time during the course of the disease. The oral lesion can be an early sign that allows the clinician and dentist to suggest the diagnosis, and anticipate the progress of the disease <sup>8</sup>. Nowadays, HIV oral manifestations are chronic especially since the onset of HAART over 10 years ago <sup>9</sup>.

## **II. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES**

The hypothesis that we considered on the basis of the reviewed iconography and literature for our study are:

1. The mouth may be an HIV reservoir. There is a large number of HIV infected patients who are unaware of their condition, and therefore a late diagnosis of the disease is performed. We want to check if the use of non invasive rapid test at the dental office, as an alternative diagnostic test for HIV over conventional methods, can help us increase the percentage of this early diagnosis of HIV infection.

Saliva, is a fluid in which HIV antibodies can be detected, and we want to see if we can find accurate information to make an early diagnosis of HIV infection and avoid more aggressive techniques.

2. We believe that patients with HIV may have variations on the type of oral lesions and we want to assess the most frequent lesions whether in antiretroviral treatment or not.

3. We have also confirmed the existence of a high percentage of bacterial infections. Given the growing frequency in our región of sexually transmitted diseases such as gonorrhoea in HIV men who have sex with men, it is possible to consider that asymptomatic colonization of the mouth and pharynx for *neisseria gonorrhoeae* may be a frequent and enabling factor on the spread of gonorrhoea in our midst. Therefore, we will focus on checking the existence of this type of infections in this group.

### **Objectives:**

1. Checking sensitivity and specificity of an indirect diagnostic method for HIV and non-invasive saliva test, Oraquick Advanced Orasure;

2. Determine the relationship between the test result and the patient's immune status or the antiretroviral treatment;

3. Evaluation of oral lesions in the HIV positive patients, either undergoing or without antiretroviral treatment;

4. Demonstrate the existence, through analytical study with pharyngeal smear of asymptomatic gonococcal infection in a significant percentage of homosexuals HIV positive patients;

5. Determine the relationship between the intake of drugs, the presence of any sexually transmitted disease or antiretroviral therapy and the presence of gonococcal infection;

6. We carried out exploratory studies on the oral pathology of HIV patients attending a medical office for the control of such infection.

### **III. PATIENTS AND METHODS**

Since 2005, we carried out research (3 studies) to try to find out the role of human immunodeficiency virus in the mouth. In a first attempt, in 2005, we studied the behavior of HIV in oral mucosa; in the second phase, we evaluated the usefulness of rapid tests for HIV diagnosis in oral cavity and the presence of asymptomatic gonococcal infection in the mouth of HIV positive homosexual which is the group that has increased more over the past years.

It is a prospective, observational study, on 312 HIV patients attending the service of infectious diseases of the Fundación Jimenez Diaz (FJD) in Madrid. Patients selected were willing to participate in the study and gave their consent.

- **1st. study:** in 2005, a histopathological study was performed on 20 HIV-positive patients in order to evaluate the presence of the virus in healthy oral mucosa, and a serological study was also performed (to asses the presence of peripheral blood lymphocytes)

- **2nd. study:** where Orasure's Oraquick Advanced saliva test was. This group is composed of:

- group A, 312 HIV positive patients who underwent a clinical and dental examination;
- grupo B, control, composed of 70 healthy patients, not HIV-positive, who also performed the clinical examination.

Both A and B groups, underwent, Oraquick Advanced Orasure rapid saliva test, and the sensitivity and specificity of the test was studied.

- **3rd. study:** from 312 HIV positive patients, homosexual and males were chosen, so the resulting sample was 265 patients who underwent clinical and dental examination. This group underwent a pharyngeal swab to study the existence of a subclinical, gonococcal infection. We evaluated the *neisseria gonorrhoeae* species isolated and studied the different sensitivities to different antimicrobials: penicillin, tetracycline, ciprofloxacin and ceftriaxone.

The statistical study was conducted at the Center for research and data process of the Complutense University. 19.0 SPSS program for Windows, using different variables with the Pearson test and Student's T test were correlated to analyze quantitative data.

#### IV. RESULTS

In all cases the percentage of men was higher than women.

- **1st. study:** 82,35% men and 17.65% women. In oral mucosa biopsies, positive hybridization signals in 82,35% of samples were observed. The percentage of samples in which hybridization signals were not observed, were of patients who were under antiretroviral treatment at the time of the study and had no detectable HIV viral load at the time of obtaining biopsy.

- **2nd. Study:** 92,95% were men and 7.05% women. Orasure Oraquick Advanced test sensitivity was 86.2% and the specificity was 100% of the patients where the test result was positive, 79.1% were on antiretroviral treatment ( $p = 0, 004$ ), and had a lower value of the CD4/CD8 ratio ( $p = 0, 009$ ).

- **3rd. Study:** in 265 patients where a pharyngeal swab was conducted, 9.46% presented infection by *neisseria gonorrhoeae*. In the group with the presence of gonococcus 12% took drugs, cocaine, heroin ( $p = 0, 039$ ); 40% had previous history on any STD ( $p = 0,041$ ), but not in the 6 months prior to the study. 100% of the cases with positive gonococci were sensitive to treatment with ceftriaxone, and ciprofloxacin.

#### V. DISCUSSION

- **1st. study:** this group belongs to a low socio-economic level and have moderate immunosuppression. One third, presented an associated oral pathology, in 45.45% we observed the presence of leishmaniasis, up 18.18% showed focal epithelial hiperplasia and 18.18% candidiasis.

HIV infection has been detected in the cytoplasm of epithelial cells: in 82.3% of the patients positive hybridization signals were observed. These results indicate that the HIV infection in epithelial cells of the oral mucosa is non-dependent on the patient's immune status, although a study with a larger number of patients is needed to confirm this hypothesis.

- **2nd. study:** rapid saliva test has been approved by the FDA. The sensitivity obtained in our study is somewhat lower than those observed in other studies, ranging between 95%, 98.3% and 99%<sup>10</sup>. Despite having very high levels of sensitivity and

specificity, confirmation of infection through a blood test is mandatory, in which the Western Blot test it will be performed. Rapid tests should be used in emergency rooms, , health centers and dental offices, where a quick diagnosis and a harmless technique can be used without any risk of infection to the healthcare workers and we will have useful information of risk of infection of the patient <sup>11,12</sup>.

The effects of antiretroviral treatment in the test results should be analyzed, yet there are false negatives. On the other hand the presence of some kind of oral lesion at the time of sample collection may have affected the test result.

- **3rd. study:** There has been an increase of these infections in Europe and Spain especially in the group of men who have sex with men (MSM). In Madrid, there has been a very significant increase in this population by unprotected sexual practice and by immigration, and together with studies that show a high prevalence of asymptomatic gonococcal infections in the pharynx of MSM and HIV positive patients <sup>13, 14</sup>.

9.46% of the patients presented *neisseria gonorrhoeae* asymptomatic infection, since the practice of oral sex is very common in this group (MSM) the transmission of the oropharynx to the urethra represents a transmission mechanism that has an impact on the spread of the disease.

Regarding the **oral pathology** observed, since the onset of HAART, changes in the nature and incidence of oral lesions can be seen in HIV-positive patients, an increase incidence in the presence of warts and oral ulcers instead of other lesions previously considered as pathognomonic of HIV infection such as: Kaposi's sarcoma (KS), Hairy Leukoplakia (HL) and ulceronecrotizing periodontitis.

## VI. CONCLUSIONS

1. The presence of HIV-1 in epithelial cells in the mouth, queratinocitos gingival and cells positive for CD4.
2. HIV-1 infects and replicates in oral mucosa epithelial cells whether or not the patient is under TARGA.
3. Oral mucosa epithelial cells can be an important reservoir of the virus.
4. Non-invasive tests for the indirect diagnosis of HIV, such as the saliva test used in this study, are simple and useful and can be carried out by the dentist.
5. This test is a useful tool to detect infected patients who are unaware that they are HIV carriers.
6. Oral lesions such as Hairy Leukoplakia (HL), candidiasis, oral warts, herpes, leishmaniasis, appear more frequently in this type of patient regardless of whether they are undergoing antiretroviral treatment or not.
7. The existence of symptomatic gonococcal infection in a population of men who engage in sex with other men and who are HIV positive together with high-risk sexual practices, favours the spread of gonorrhoea in our environment

## VII. REFERENCES

---

<sup>1</sup> Organización de las Naciones Unidas. Unaid's report on the global AIDS epidemic 2012. Disponible en: [http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/20012/20012\\_gr-executivesummary\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/20012/20012_gr-executivesummary_en.pdf). Acceso Marzo de 2012.

<sup>2</sup> Instituto de Salud Carlos III Vigilancia Epidemiológica de Sida en España. Registro Nacional de casos de Sida. Junio de 2012. Instituto de Salud Carlos III. Acceso: Diciembre 2012.

- 
- <sup>3</sup> Diagnóstico de sífilis y gonococia en una red de centros de ITS: características clínico epidemiológicas. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Noviembre 2012.
- <sup>4</sup> Branson Bm. FDA approves OraQuick for use in saliva. On March 25, the FDA approved the first rapid test for HIV in oral fluids. *AIDS Clin Care* 2004;16, 39.
- <sup>5</sup> Medina R., Morán E., Regalado M.A. La saliva como medio diagnóstico del VIH. *Rev Cubana Estomatol* 2000; 37(3): 146-56.
- <sup>6</sup> R. L. Hodinka, T. Nagashunmugam, D. Malamud. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. *Clin Diagn Lab Immunol*, July 1998, p.419-26.
- <sup>7</sup> Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW. HIV Testing in a High-Incidence Population: Is antibody Testing Alone Good Enough?. *CID* 2009, Aug 1:49.
- <sup>8</sup> Saini R. Oral Lesions: A true clinical indicator in human immunodeficiency virus. *J Nat Sci Biol Med.* 2011, Jul-Dec;2(2):145-150.
- <sup>9</sup> Leao JC, Ribeiro CMB, et al. Oral complications of HIV disease. *Clinics* 2009;64(5):459-70.
- <sup>10</sup> Malamud D., Wahl S.M. The mouth: a Gateway or a trap for HIV?. *AIDS.* 2010 January 2; 24(1): 5-16.
- <sup>11</sup> Malamud D., Rodríguez-Chavez I. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 2012, January; 55(1): 159-178.
- <sup>12</sup> Boy SC, Van Heerden MB, Wolfaardt M., et al. An investigation of the role of oral epithelial cells and Langerhans cells as possible HIV viral reservoirs. *J Oral Pathol Med* 2009; 38:114-119.
- <sup>13</sup> Kent CK, Cahw JK, Wong W, et al. Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal chlamydia and gonorrhoeae detected in 2 clinical settings among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. *Clin Infect Dis* 2005;41:67-74.
- <sup>14</sup> Baker J, Plankey M, Josayma Y, et al. The prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* among asymptomatic men who have sex with men in a prospective cohort in Washington, D.C. *AIDS Patient Care & STDs.* 2009;23:585-8.