



Universidad Abierta Interamericana

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Carrera de Medicina

Título: “Valor de la anoscopía de alta resolución
como método screening en el diagnóstico preventivo
de las lesiones producidas por HPV en pacientes
con VIH”

Alumno: Agustín Fernández Bussy

Tutor: Profesor Dr. Sergio Lupo

Email: agustinfbussy@hotmail.com

Fecha de entrega: 15 de Diciembre de 2014

ÍNDICE:

RESUMEN:.....	3
INTRODUCCIÓN:	5
MARCO TEÓRICO.....	7
PROBLEMA	21
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSION:	35
CONCLUSIONES:	38
BIBLIOGRAFÍA:	41

RESUMEN:

Introducción:

El papilomavirus humano (HPV) pertenece a la familia Papilomaviridae, algunas de las cepas del HPV presentan poder oncogénico induciendo cambios que afectan la expresión o función de las proteínas reguladoras. Las cepas más comunes que afectan mucosas son las 16, 18, 31, 33,35 entre otros más.

Objetivos:

Realizar anoscopías de alta resolución a pacientes que conviven con VIH como método screening para la detección precoz de lesiones en el canal anal que pueden llevar a displasia y carcinoma in situ.

Material y métodos:

Se realizó un estudio prospectivo de tipo observacional y descriptivo a un grupo de pacientes VIH positivos asistidos en el Instituto Centralizado de Asistencia e Investigación Clínica Integral (CAICI) de la ciudad de Rosario.

Resultados:

Se estudiaron 30 pacientes en los cuales el 86,7% de la población eran hombres un 6,7% transexual y el 6,7% restante mujeres. El 90% de la población eran hombres que mantenían sexo con hombres. Solo el 23,3% de la población no presentó lesiones macroscópicas y de esos solo el 13,4% de los pacientes tuvieron anoscopías magnificadas negativas.

Conclusiones:

Concluimos que la realización de anoscopías de alta resolución como método screening es un método valioso preventivo ya que demostró su rédito al encontrar lesiones en el canal anal en pacientes sin sintomatología y sin lesiones macroscópicas compatibles con HPV.

Palabras clave: VIH, HPV, anoscopía, cáncer anal

INTRODUCCIÓN:

El papilomavirus humanos (HPV) pertenece a la familia Papillomaviridae y son un grupo heterogéneo de virus con genoma de ADN doble cadena circular sin envoltura e infectan epitelios cutáneos y mucosos de sitios anatómicos diversos.

Algunas cepas del HPV presentan poder oncogénicos, causan cáncer por inducción de cambios que afectan la expresión o función de proteínas reguladoras que intervienen en el control de la proliferación celular. Se estima que aproximadamente el 20% de todos los casos de cáncer en humanos están asociados a la infección por virus oncogénicos, ya sea como agentes causales o como cofactores, entre los que se encuentran los papilomavirus humanos (HPV). Actualmente se han descrito alrededor de 150 tipos distintos de HPV, el 25% de los cuales está asociado a infecciones de mucosas y el 75% se han identificado en epitelios cutáneos. Además, se han descubierto más de 150 potenciales tipos nuevos, en su mayoría en piel, de los cuales se conocen sólo fragmentos genómicos parciales y se ignoran las implicancias clínicas de sus infecciones. [1] En relación a los HPV que infectan mucosas, está firmemente establecido que la infección persistente con ciertos tipos (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 56, entre otros) es el evento clave en el desarrollo de cáncer anogenital. La infección anal con cepas oncogénicas de HPV es un proceso fundamental en la formación de lesiones precancerosas al igual que en cuello uterino.

La lesión por HPV y los cambios displásicos que se producen pueden ser identificados mediante el análisis de células exfoliativa del canal anal y biopsias obtenidas a partir de anoscopías de alta resolución. En coincidencia con las

neoplasias de cuello uterino, el cáncer anal se sospecha que progresa de neoplasia intraepitelial anal (AIN) y se las clasifica en SIL de bajo grado (AIN1) y SIL de alto grado (AIN2-AIN3). [2]

Estudios recientes demostraron una alta prevalencia de SIL anal (57.2%) en pacientes HIV positivos, similar a la prevalencia del 54.7% descrita en “Cohort of the Spanish HIV Reasearch Network HPV (CoRIS-HPV)” en España. [3]

El recuento bajo de linfocitos CD4 < a 200 cells/ul de larga data es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de carcinoma anorrectal. Otros factores de riesgo para esta patología son la progresión de VIH a Sida y la inmunodeficiencia en pacientes trasplantados. [4] El HPV más frecuente involucrado en estos casos fue el subtipo 16 en 87.1% mientras que el HPV 18 fue reportado solo en el 6.2% de los casos. [3]

La citología cervical (Papanicolau) demostró ser un método eficaz en las mujeres para prevenir el cáncer de cérvix. Con la alta prevalencia de carcinoma invasivo de cuello en mujeres con VIH – evento definidor de Sida- se recomendó realizar este estudio con una mayor frecuencia que en la población general. [5] La incidencia en aumento de la enfermedad neoplásica anorrectal en la población con VIH, sobre todo en hombres que tienen sexo con hombres, hace necesario tener una conducta preventiva, desde el punto de vista diagnóstico, similar. [6] La anoscopía de alta resolución es un procedimiento que sirve para identificar lesiones sin compromiso clínico. El tejido sospechoso obtenido a través de la misma se somete a una biopsia para establecer el diagnóstico etiológico. [7]

Marco Teórico:

HPV:

El papilomavirus humanos (HPV) pertenece a la familia Papillomaviridae y son un grupo heterogéneo de virus con genoma de ADN doble cadena circular sin envoltura con unas 8000 pares de bases e infectan epitelios cutáneos y mucosos de sitios anatómicos diversos. Actualmente más de 150 tipos distintos de HPV fueron descritos y un 75% afectan piel y el otro 25% tienen predilección por los sitios mucosos. [8] La infección tiene lugar por contacto directo con una fuente de virus infeccioso y se facilita cuando existen abrasiones en el punto de contacto. Las verrugas comunes se contagian por contacto directo con la lesión de otro individuo y luego se propagan por auto inoculación. Las verrugas genitales se transmiten durante el coito, es una de las ITS más frecuentes y se considera que un 60% de mujeres jóvenes sexualmente activas tras repetidas pruebas de PCR de hisopados cervicales son positivas para la presencia de DNA viral. [9][10] La replicación de los HPV solo comienza en células capaces de dividirse, por lo que es obligado que estos virus alcancen las células basales para que se desarrolle una lesión.

La forma de presentación son mediante verrugas vulgares, pápulas hiperqueratósicas y exofíticas que suelen aparecer en las manos, pero pueden presentarse en cualquier otra localización y están mayoritariamente asociadas al HPV tipo 2. [9] Las verrugas plantares generalmente están asociadas al HPV 1. Las verrugas planas relacionadas al HPV 3, 10,28 y 41[10] Los HPV de alto riesgo son los principales responsables de cánceres ano genitales, de cuello uterino, vulva, vagina, pene y de cabeza y cuello (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y

56 entre otros). Las propiedades oncogénicas de este virus residen en la proteína E6 que regula la degradación de la proteína p53 supresora de tumores y la proteína E7 une el producto génico del retinoblastoma y las proteínas relacionadas. Las proteínas E1 y E2 regulan la replicación del DNA vírico y la expresión de los genes. [9]

El contagio genital de HPV es muy común y tienen un pico de prevalencia entre los 18 y 30 años. Muchas de estas infecciones curan espontáneamente pero en un 10%-20% de mujeres estas infecciones persisten y pueden generar displasias celulares y eventualmente carcinomas invasivos de cérvix, aumentando la incidencia en personas HIV positivas o inmunocomprometidas. [8]

Diagnóstico

El examen citológico según la técnica Papanicolaou se considera todavía el método de elección para la detección precoz de lesiones cervicales/anales preinvasoras, ya que es un método de diagnóstico sencillo y eficaz. El diagnóstico etiológico sólo puede realizarse mediante técnicas de detección y caracterización del genoma de los HPV, ya que estos virus no pueden ser cultivados y los métodos de detección de antígenos en tejido carecen de sensibilidad suficiente. Los métodos de detección y caracterización de HPV están basados fundamentalmente en métodos de amplificación de señal o de amplificación de secuencias diana (PCR convencional o en tiempo real). [11]

El método de captura de híbridos consiste en la amplificación de señal y es el único aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, EE. UU.) para la detección del genoma de HPV de alto riesgo. [11]

El método de captura de híbridos consiste en la amplificación de señal y es el único aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, EE. UU.) en la actualidad para la detección del genoma de HPV de alto riesgo.[11]

Epidemiología

Las verrugas genitales son casi exclusivas de la población sexualmente activa. La infección anogenital por HPV es la más frecuente de las infecciones de transmisión sexual. [11]

El factor más documentado para la adquisición de infección por HPV es el número de parejas sexuales. Otros posibles factores de riesgo son el inicio temprano de las relaciones sexuales, el consumo de tabaco y la ausencia del uso del preservativo. [11]

A diferencia de lo que ocurre con la infección cervical por HPV en las mujeres, los datos de prevalencia de la infección anal por HPV en varones son escasos, y los estudios se han realizado fundamentalmente en sujetos que practican sexo con otros (HSH) infectados por HIV-1. Los datos de prevalencia de infección anal por HPV en HSH infectados por HIV-1 oscilan entre el 72% y el 92%, mientras que en HSH no infectados por HIV-1 está comprendida entre el 57% y el 66%. [11]

Los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108 son considerados de bajo riesgo; los tipos 26, 53, 66, 68, 73 y 82, de probable alto riesgo; por último, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 se consideran de alto riesgo oncogénico.[11]

PCR

La técnica de PCR es un método poderoso de ampliación de pequeñas cantidades de DNA. Se requiere que la secuencia de nucleótidos detectada sea conocida para poder generar posibles oligonucleótidos primarios de 20-25 bases de largo que concuerden con el DNA de la muestra. Luego de obtener esta muestra de DNA termoestable se repite por 35-40 ciclos para obtener una muestra de 10, 000, 000,000 de copias.

Esta técnica se puede realizar a partir de frotis citológicos, lavados, biopsias congeladas o tejidos embebidos en parafina. [10]

Cáncer anal

El cáncer anal es un cáncer poco frecuente en la población general, pero su incidencia se ha incrementado en los últimos años. La incidencia en los HSH infectados por HIV-1 es más elevada, con valores similares a las tasas de cáncer cervical antes de la implantación del cribado de la displasia cervical. Además, el cáncer anal es dos veces más frecuente en HSH HIV-1 positivos, que en HSH HIV-1 negativos. [11] Como factores de riesgo para esta neoplasia podemos nombrar factores de riesgo como la infección por HPV por conductas sexuales riesgosas y el hábito tabáquico. [8] Histológicamente la porción superior del canal anal está formado por epitelio cilíndrico. A unos 4-5 Mm de la

línea anoperianal hay una capa de epitelio transicional el cual hace la transición con el epitelio escamoso no queratinizado de la porción más baja del canal anal. El límite entre el epitelio cilíndrico y el epitelio escamoso se denomina unión escamocilíndrica y está localizada en la línea dentada. La infección por HPV puede ocurrir en cualquier sitio donde encontremos epitelio escamoso. [10]

El cáncer anal es una de las patologías malignas no SIDA más frecuente en la era del tratamiento antirretroviral de alta eficacia. La lesión precursora el AIN es altamente prevalente en la población HIV positiva y más del 90% de estas lesiones se atribuye a la infección por HPV [16]. Las manifestaciones clínicas de este tipo de neoplasias son el dolor anal y la hemorragia en un 50% de los pacientes, otros síntomas son sensación de masa perianal, prurito, etc. En caso de que se infiltren los esfínteres anales pueden provocar incontinencia anal y si lo hacen hacia el tabique rectovaginal, pueden ocasionar secreción vaginal e incluso fistulización.

Los sitios más frecuentes de metástasis primero son por diseminación linfática a los ganglios mesorrectales e inguinales. Luego a distancia que se observa en un 40% de los pacientes y se localizan en hígado, pulmones y huesos. La ecografía endoscópica se utiliza para determinar la infiltración de las distintas estructuras anales y perianales, mientras que la TC y la RM permiten visualizar la extensión regional y metastásica a distancia. La biopsia de las lesiones permite el diagnóstico histológico cierto. El tratamiento se basa en quimioterapia y en la radioterapia mientras que la cirugía representa una opción de segundo rango. [9]

Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El SIDA fue identificado por primera vez en Estados Unidos en el verano de 1981. Más de una docena de infecciones oportunistas y diversos cánceres se consideraron indicadores suficientemente específicos de la inmunodeficiencia subyacente y se los incorporó en la definición inicial de “caso de SIDA” en 1982. [12]

En 1983 se aisló el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de un paciente con adenopatías linfáticas y en 1984 se demostró claramente que dicho virus era el agente causal del SIDA. [13]

La definición se amplió en 1987 y luego en 1993 para incluir más enfermedades indicadoras y establecer las pruebas serológicas que determinan infección. Además, se consideraba como caso de SIDA toda persona infectada por el HIV que presentara una cifra de linfocitos CD4+ < 200/mm³, independientemente de su estado clínico [12]

El VIH es miembro de la familia Retroviridae, actualmente agrupado dentro del género Lentivirus al cual pertenecen diversos retrovirus. Al igual que todos los miembros de esta vasta familia viral, una de sus principales características es poseer una enzima, transcriptasa reversa (TR), que transcribe ARN viral monocatenario a ADN bicatenario.

Existen dos tipos del virus de la inmunodeficiencia humana el VIH-1 y el VIH-2. Si bien los dos se asocian con SIDA el 1 se encuentra ampliamente difundido

en todo el mundo mientras que el VIH-2 se presenta como endémico en la región de África subsahariana. La partícula viral madura es una esfera con un diámetro aproximado de 100nm con una bicapa lipídica externa que recubre la cápside externa. Esta membrana externa presenta alrededor de 70 proyecciones conformadas por dos glicoproteínas unidas de forma no covalente: la gp120 y la gp41. El interior de la cápside contiene además una densa estructura proteica denominada "core" constituida externamente por la proteína p14. Este core encierra dos copias de ARN y múltiples enzimas de TR.

Una característica importante es el alto número de genes y proteínas con función regulatoria que presenta el VIH1. Los genes se dividen en estructurales y accesorios. Dentro de los genes estructurales tenemos el Gag que codifica para la formación del core a partir de cuatro productos polipeptídicos diferentes, Pol la traducción sirve como precursor para la proteasa, la TR y la integrasa, Env que codifica para dos glicoproteínas gp120 y gp41. La adsorción del VIH a las células blanco esta mediada por la interacción entre la glicoproteína de envoltura gp120 y las moléculas CD4 que están presentes en abundancia sobre la superficie de linfocitos T inmaduros y linfocitos T colaboradores CD4+. A partir de la adsorción viral se desarrolla el proceso de fusión de las membranas (viral y celular), en el que intervienen la glicoproteína gp41 y los co receptores CXCR4 y/o CCR5. Luego del ingreso del core viral, el genoma viral sufre un proceso de retrotranscripción que lo convierte en ADN de doble cadena. La TR es quien lleva a cabo esta reacción y el ADN resultante es transportado al núcleo donde se constituirá el estado de "provirus". A continuación le sigue el proceso de integración que consiste en la unión covalente entre el ADN proviral y el ADN celular que es mediada por la

integrada, este proceso le permite el desarrollo de una infección persistente en su hospedador. El curso de la infección por el HIV-1 varía sustancialmente entre individuos. De hecho el periodo desde la infección hasta el desarrollo de SIDA puede variar en más de diez años. La primoinfección esta frecuentemente acompañada por una enfermedad leve, tipo mononucleosis, con adenopatías, fiebre, cefaleas, mialgia, odinofagia, exantema cutáneo y malestar general. Es frecuente una carga viral alta en plasma (valores de ARN del VIH1) junto con un descenso transitorio de los linfocitos TCD4+. El síndrome generalmente es autolimitado y se resuelve dentro de las doce semanas de la infección y se observa respuesta inmunológica mediada por linfocitos TCD8+ o citotóxicos y anticuerpos específicos (seroconversión).

Luego de la infección primaria por el HIV-1, se observa un prolongado periodo asintomático. En este estado estacionario, nuevas células son infectadas a la misma velocidad en que mueren las células infectadas, mientras que las células son reemplazadas a una velocidad igual a la de muerte de células infectadas y no infectadas. Este estado se pierde cuando la replicación viral y la destrucción celular resultante exceden la capacidad de control por parte de la respuesta inmune. [12]

Esta enfermedad se transmite generalmente por tres vías: sanguínea (transfusiones, injurias con elementos corto-punzantes o compartiendo los elementos para consumo de drogas endovenosas), vertical (durante el embarazo, parto o lactancia) y sexual (por relaciones anales, vaginales u orales). Esta última da cuenta de más del 75% de las infecciones mundiales [4]. El virus ha sido aislado de sangre, semen, secreciones vaginales y leche

materna, que son los líquidos infectantes; pero también se lo ha identificado en tejido nervioso, piel, pulmones, bazo, hígado, médula ósea, ganglios linfáticos, LCR, saliva y lágrimas.[14]

Desde el punto de vista clínico, el curso clásico de la infección por HIV-1 consiste en la infección primaria, con síndrome retroviral agudo o sin él, el período clínico de latencia y la enfermedad clínicamente evidenciable debida a la inmunodeficiencia (SIDA). Desde el momento en que el paciente se infecta, el virus prolifera de manera continua aunque a velocidades diferentes según el estadio evolutivo. Se distinguen entonces 3 fases:

Fase aguda o síndrome retroviral agudo: de semanas de duración donde el virus se disemina e invade tejidos y órganos, en especial los ganglios. Durante esta fase el paciente puede permanecer asintomático o presentar un síndrome mononucleósico caracterizado por fiebre, adenopatías generalizadas, enantema facial y, en ocasiones, un exantema morbiliforme transitorio, entre otros signos y síntomas. También se acompaña de niveles elevados de carga viral y una importante caída en el recuento de linfocitos T CD4+ circulantes por lo que es posible que se presenten enfermedades oportunistas. Al laboratorio podemos encontrar una linfopenia marcada, con depleción de linfocitos T y linfocitos atípicos en sangre periférica.

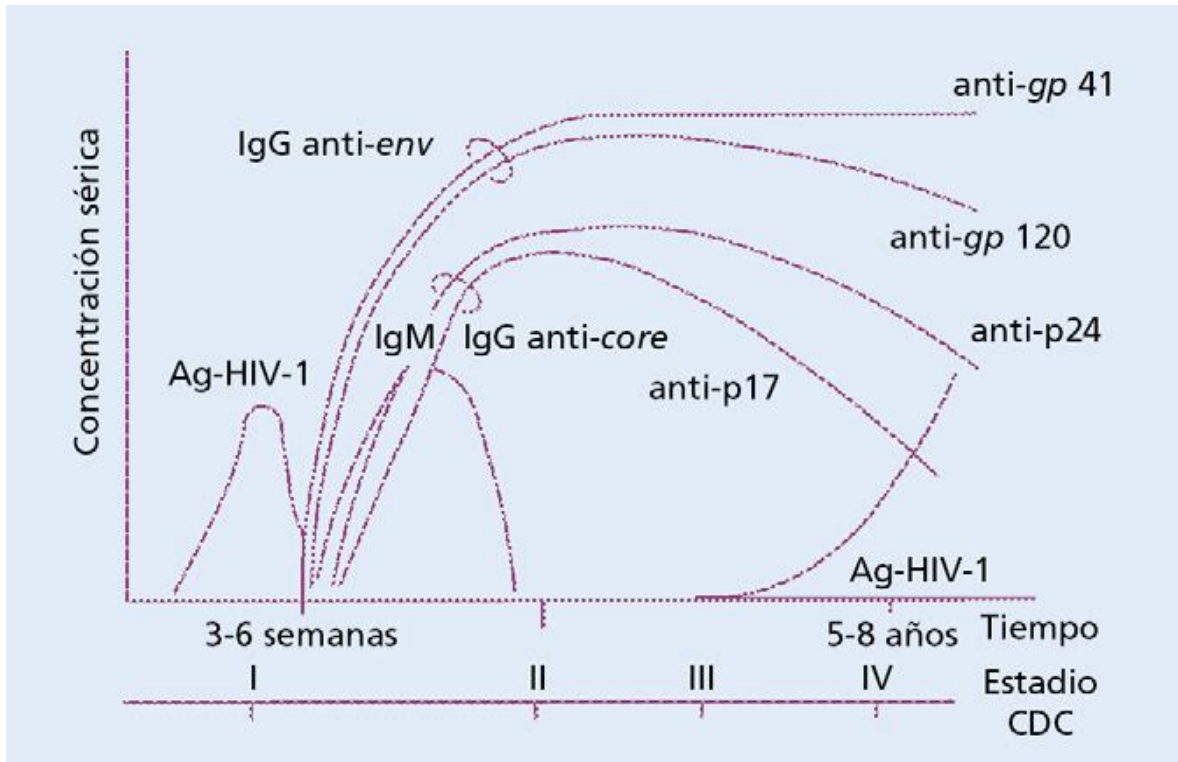
Uno a tres meses después del inicio de los síntomas aparece una respuesta de anticuerpos específica contra el HIV-1, coincidente con una declinación significativa de los niveles de carga viral, desaparición del antígeno p24 y recuperación parcial de los linfocitos T CD4+.

Es aquí, en esta fase, donde podemos encontrar el denominado “período ventana” o pre serológico donde la detección de anticuerpos por serología es negativa.[14]

Fase intermedia o crónica: con replicación viral activa aunque a velocidad baja, cambios patológicos mínimos y varios años de duración. En casi todos los pacientes es posible detectar y cuantificar la carga viral. Este nivel de equilibrio tiene valor pronóstico, es estable durante períodos discretos de tiempo y es muy variable de un individuo a otro. Los pacientes suelen estar asintomáticos, con o sin adenopatías, y pueden presentar trombocitopenia (sobre todo en los drogadictos) o trastornos neurológicos centrales o periféricos. La carga viral y, en mayor medida, la cifra de linfocitos CD4 son los mejores marcadores pronósticos de progresión clínica y mortalidad si no se efectúan intervenciones terapéuticas. El propio VIH o con mayor probabilidad la hiperactivación crónica del sistema inmunitario y la inflamación crónica es probablemente responsable de que se aceleren procesos fisiopatológicos asociados al envejecimiento, como el deterioro cognitivo, la arteriosclerosis o un incremento de determinados tipos de neoplasias. [14] En consecuencia, queda claro que si bien hay un período de latencia, se trata de un acontecimiento clínico y no virológico-[10]

Fase final avanzada: que clínicamente corresponde al denominado síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) propiamente dicho, con una duración de meses a años de acuerdo con la respuesta al tratamiento.

Evolución de los marcadores serológicos de la carga viral de la infección por el HIV-1 a lo largo del tiempo. CDC: Centers for Disease Control. (Adaptada de V. Soriano.) [12]



Evolución de los marcadores serológicos de la carga viral de la infección por el HIV-1 a lo largo del tiempo. CDC: Centers for Disease Control. (Adaptada de V. Soriano.) (5)

Sistema de clasificación de casos [10]

El sistema se basa en 3 rangos de recuentos de linfocitos T CD4+ y en 3 categorías clínicas:

Categoría A (una o más de las siguientes)

o Primoinfección aguda sintomática o antecedentes de ella.

o Infección asintomática.

o Linfadenopatía persistente generalizada.

Categoría B (incluye enfermedades relacionadas con el VIH, aunque no marcadoras de SIDA):

o Angiomatosis bacilar.

o Candidiasis orofaríngea.

o Candidiasis vulvovaginal frecuente o persistente.

o Displasia cervical o carcinoma in situ.

o Síntomas constitucionales (Temperatura superior a 38,5 °C y diarrea más de un mes).

o Leucoplasia oral vellosa.

o Herpes zoster.

o Púrpura trombocitopénica idiopática.

o Listeriosis.

o Enfermedad inflamatoria pélvica.

o Neuropatía periférica.

Categoría C: (enfermedades marcadoras de SIDA):

o Candidiasis traqueal, bronquial, pulmonar o esofágica.

o Criptococosis extrapulmonar.

- o Criptosporidiasis o isosporidiasis.
- o Infección por CMV. Retinitis por CMV.
- o Encefalopatía por VIH.
- o Herpes simple de más de un mes de evolución.
- o Histoplasmosis diseminada.
- o Sarcoma de Kaposi.
- o Linfoma de Burkitt.
- o Linfoma cerebral primario.
- o Tuberculosis pulmonar, extrapulmonar o diseminada.
- o Infección por M. Avium.
- o Neumonía por P. Jirovecii.
- o Neumonía recurrente (más de dos episodios por año).
- o Sepsis recurrente por Salmonella.
- o Toxoplasmosis cerebral.
- o Síndrome caquético.
- o Carcinoma de cérvix invasivo.
- o Coccidiomicosis diseminada.

Categorías según el N° de linfocitos T CD4+ Categorías clínicas

A B

≥ 500/mm³ A1 B1

200 – 499/mm³ A2 B2

< 199/mm³ A3 B3

Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por el virus del VIH se basa en las manifestaciones clínicas, la epidemiología y las pruebas de laboratorio - mediante la detección de anticuerpos contra el virus (pruebas indirectas) o la puesta en evidencia del propio virus (DNA proviral; RNA plasmático del virus).[14]

El test serológico estándar para detección de anticuerpos es un Enzimoimmunoensayo (ELISA). La positividad de un ELISA, que es sumamente sensible, requiere de la reconfirmación mediante una prueba de mayor especificidad como la de Western blot (WB), que demuestra la existencia de varias bandas de proteínas producidas contra el virus como la p24, pg41 o gp120 y 160. Si no se encuentra ninguna banda el resultado es negativo. [15]

Complicaciones

Se deben a la inmunodeficiencia producida por la agresión del VIH. Pueden ser de causa infecciosa o enfermedades proliferativas malignas que asientan en distintos órganos, aparatos o sistemas. [14; 17]

Tratamiento

El tratamiento antirretroviral de alta eficacia revirtió la historia natural que terminaba en progresión y muerte y convirtió a esta enfermedad en una infección asintomática, crónica con una expectativa de vida muy parecida a la de la población general. [18] La presencia de reservorios virales en células de vida media prolongada no permite la suspensión del tratamiento antirretroviral [19]. En los últimos años se ha observado además la producción de eventos serios no Sida, como trastornos cardiovasculares; renales; hepáticos y cánceres, entre las que se encuentran las neoplasias anorrectales, cuya prevención es el objetivo del presente trabajo. [20]

PROBLEMA

La patología anal por infección con HPV en pacientes VIH positivos es más frecuente que en la población general con un mayor riesgo de malignizar formando displasias, carcinomas in situ y carcinomas epidermoides de ano y recto. El control de los pacientes con VIH realizando anoscopía de alta resolución y PAP en forma periódica, pueden prevenir las lesiones graves anorrectales producidos por el HPV.

OBJETIVOS

- Generales:
 - ✓ Realizar anoscopía de alta resolución en forma preventiva a una población de pacientes que conviven con el VIH.
- Específicos:
 - ✓ Estudiar las lesiones de la región anorrectal en un grupo de pacientes VIH positivos.
 - ✓ Determinar la importancia de la anoscopía de alta resolución como método de screening.
 - ✓ Realizar biopsia y eventual tratamiento y seguimiento del paciente si fuera necesario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo de tipo observacional y descriptivo a un grupo de pacientes VIH positivos asistidos en el Instituto Centralizado de Asistencia e investigación Clínica Integral (CAICI) de la ciudad de Rosario.

Luego de una entrevista y revisión de la historia clínica del paciente evaluando la presencia o no de síntomas/signos de enfermedad anorrectal, se realizó examen proctológico de rutina con observación y tacto rectal, seguido de anoscopía de alta resolución como método de screening para comprobar o descartar lesiones compatibles con HPV. La anoscopía de alta resolución es un procedimiento que sirve para identificar lesiones sin compromiso clínico. Inicialmente se inserta el anoscopio con la ayuda de un lubricante de base acuosa. A continuación, se introduce un escobillón con una gasa empapada de ácido acético al 3% enrollada en él. Se saca el anoscopio y se deja 2 minutos,

a la espera de que la solución empape la pared del recto. Se saca el escobillón y la gasa que lo envuelve y se vuelve a introducir el anoscopio, observando la presencia de lesiones acetoblancas en todas las paredes del canal anal, rotando el anoscopio. El tejido sospechoso se somete a una biopsia para establecer el diagnóstico o tratamiento de las respectivas lesiones con ácido tricloroacético al 90%, imiquimod en pomada o tratamiento quirúrgico si fuese necesario.

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 16 años con diagnóstico de infección por VIH (ELISA y Western Blot positivos).
- Que asistan a su control clínico en forma regular.
- Con o sin síntomas/signos de enfermedad anorrectal.

Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de 16 años.

Las variables a analizar serán:

Cualitativas:

- Género (masculino/femenino/ transexual)
- Forma de transmisión: sexual, sanguínea o de madre a hijo.
- Categoría clínica según CDC al momento del diagnóstico del VIH.

Cuantitativas:

- Año de diagnóstico.
- Esquema antirretroviral si estuviera bajo tratamiento.

- Tiempo de tratamiento.
- Valor de Linfocitos CD4+ (Valor absoluto y relativo).
- Valor de la carga viral plasmática.
- Lesión/es macroscópicas
- Informe anoscopía magnificada/colposcopia
- Anatomía patológica/genotipificación VPH
- Intervención terapéutica (si hubiera)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

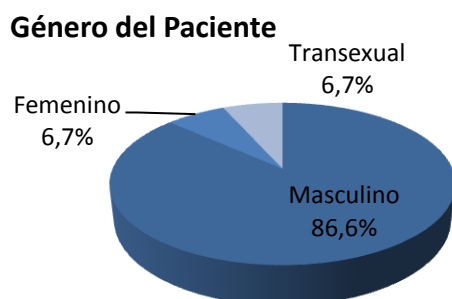
Los datos obtenidos se procesaron en una base de datos de Microsoft Excel. Se usaron gráficos y tablas para visualizar los resultados y se realizaron mediciones de resumen de tendencia central (media aritmética, mediana, modo) y medidas de dispersión (desvío estándar).

Se complementó el estudio con técnicas estadísticas descriptivas (distribuciones de frecuencias, porcentajes) e inferenciales (prueba chi cuadrado). Los resultados se expresaran como media \pm desviación estándar, para un nivel de significación $p < 0,05$.

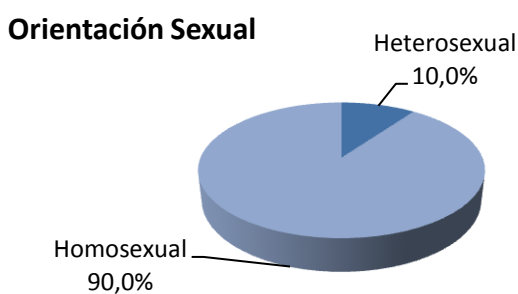
RESULTADOS

Se estudiaron 30 pacientes que consultaron al proctólogo por síntomas proctológicos o simplemente como control y screening para la prevención de lesiones por HPV. Los 30 pacientes presentaban infección por VIH y cumplieron los criterios de inclusión.

El 100% de los pacientes adquirió el virus por vía sexual. Un 86,7%(26) era de género masculino, el 6,7%(2) femenino y el 6,7% (2) restante transexual.

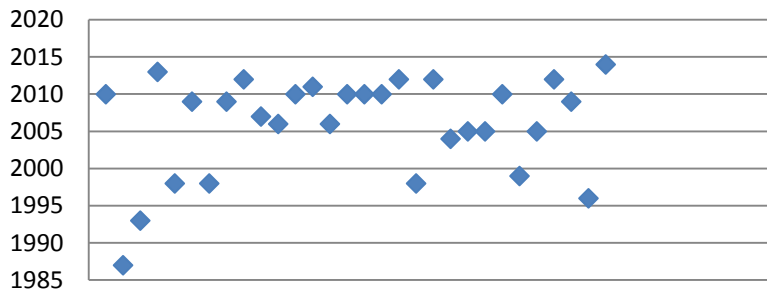


El 90% de la población era homosexual (27) y el 10% heterosexual.



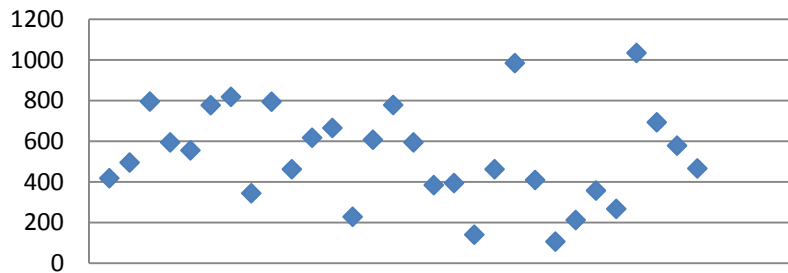
El año de diagnóstico promedio es 2006 con un desvío estándar de 6; 7 años. El año del primer diagnóstico fue 1987 y el último en el 2014.

Año de Diagnóstico



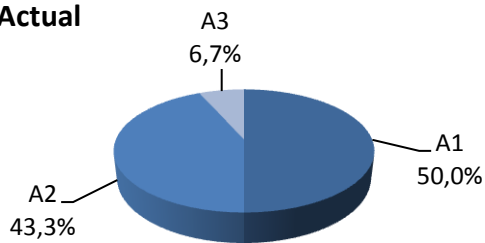
Con respecto al nivel de CD4 se observó una media de 534,2 con un desvío estándar de 235,9 con un mínimo de 106 y un máximo de 1034.

CD4



De acuerdo a la clasificación de los CDC, en el momento de la evaluación, el 50% (15) se encontraban en el estadio A1, el 43,3% en el estadio A2 (13) y un 6,7% (2) en el estadio A3.

CDC Actual



Para la variable de la carga viral plasmática el 60% (18) tenía CV indetectable y el 36,7% (11) detectable mientras que el 3,3%(1) era desconocido.



Variable: TARV (Esquema Antirretroviral si estuviera en tratamiento)

Catorce pacientes (46%) estaban bajo TARV con esquemas basados en INNTR (20% del total con tenofovir/emtricitabina/efavirenz) y 12 (40%) con esquemas basados en IP (10% del total con tenofovir/emtricitabina/atazanavir/r). El 13,3% de los pacientes no recibía TARV. (Ver tabla 1)

Pacientes según TARV. Tabla 1

Tratamiento	Pacientes
Esquemas basados en INNTR	14
Esquemas basados en IP	12
Sin tratamiento	4

INNTR: inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa

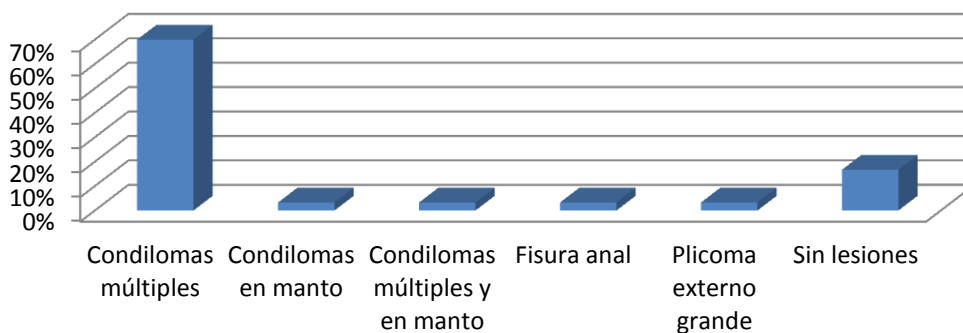
IP: inhibidores de la proteasa

Lesiones macroscópicas: se detectaron 21 lesiones por condilomas múltiples (70%) y otras lesiones que se enumeran en la tabla 2. No se visualizaron lesiones en 5 pacientes.

Hallazgos de lesiones Macroscópicas. Tabla 2

		Casos	%
Lesiones	Condilomas múltiples	21	70,0%
Macroscópicas	Condilomas en manto	1	3,3%
	Condilomas múltiples y en manto	1	3,3%
	Fisura anal	1	3,3%
	Plicoma externo grande	1	3,3%
	Sin lesiones	5	16,7%
Total		30	100%

Lesiones Macroscopicas

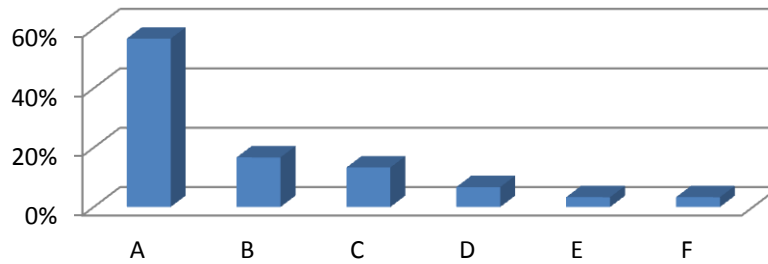


Hallazgos en la anoscopía magnificada: 17 pacientes (56%) presentaron lesiones acetoblancas positivas sin signos de displasia y 5 (16%) con signos de displasias. En cuatro pacientes la anoscopía fue negativa. El resto de los hallazgos se resumen en la tabla 3.

Anoscopía magnificada. Tabla 3

	Caso s	%
Informe de A- Lesiones acetoblancas positivas (A+) sin Anoscopia signos de displasia	17	56,7%
B-Lesiones acetoblancas positivas (A+) con signos de displasia	5	16,7%
C-Anoscopia negativa	4	13,3%
D-Lesiones acetoblancas positivas (A+)	2	6,7%
E-Lesiones acetoblancas positivas (A+) en manto	1	3,3%
F-Lesiones acetoblancas positivas (A+) en manto sin signos de displasia	1	3,3%
<hr/> Total	30	100%

Informe de Anoscopia



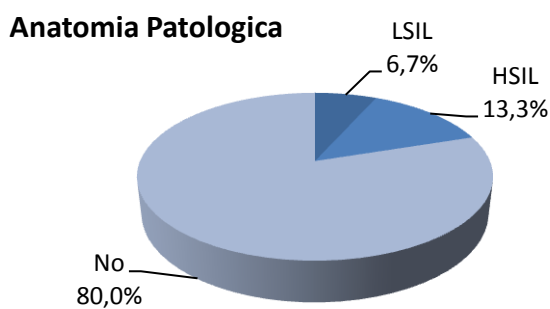
Se concluye que el 56,7% de los pacientes presentó lesiones acetoblancas positivas (A+) sin signos de displasia y el 16,7% A+ con signos de displasia.

Tratamiento Instaurado: las intervenciones quirúrgicas se realizaron en 10 casos (33%) y diferentes tratamientos médicos se hicieron en 16 (46%). En tabla 4 se detallan las intervenciones.

Tratamiento Instaurado. Tabla 4

	Casos	%
Tratamiento A-Cirugía	10	33,3%
Instaurado B-Topificación con Ac. TCA al 90%	6	20,0%
C-Topificación con Ac. TCA al 90% + Cirugía	4	13,3%
D-Topificación con Ac. TCA al 90% + Cirugía + Biopsia	3	10,0%
E-Imiquimod + Cirugía	2	6,7%
F-Penicilina G 1.400000 U, 3 aplicaciones (1 x sem.), Imiquimod 3 vs. X sem. X 16 sem.	1	3,3%
G-Sin tratamiento	4	13,3%
Total	30	100%

Anatomía Patológica: se realizó biopsia en el 20% de los pacientes. En el 13,3% se encontró lesiones de alto grado (HSIL) y en el 6,7% de bajo grado (LSIL).



LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado

Correlación entre las lesiones macroscópicas y la anoscopía: de los 21 casos de condiloma múltiple, 4 fueron acetoblancas positivas con signos de displasia y las 17 restantes fueron acetopositivas sin displasia. En los 7 pacientes que no presentaron lesiones macroscópicas compatibles con HPV, tres fueron acetoblancas positivas, y una presentó signos de displasia. En la tabla 5 se describen los datos completos.

Lesiones Macroscópicas según Informe de Anoscopia (tabla 5)

				Casos	%
Lesiones Macroscópicas	Condilomas múltiples	Informe	A-Lesiones acetoblancas positivas (A+) sin	17	81%
		Anoscopia	B-Lesiones acetoblancas positivas (A+) con	4	19,0%
Total				21	100%
	Condilomas en manto	Informe	A-Lesiones acetoblancas positivas (A+) en	1	100,0%
		Anoscopia	Total	1	100%
	Condilomas múltiples y en manto	Informe	A-Lesiones acetoblancas positivas (A+) con	1	100%
		Anoscopia	Total	1	100%
	Fisura anal	Informe	A-Lesiones acetoblancas positivas (A+) sin	1	100,0%
		Anoscopia	Total	1	100%
	Plicoma externo grande	Informe	A-Lesiones acetoblancas positivas (A+) con	1	100,0%
		Anoscopia	Total	1	100%
	Sin lesiones	Informe	A-Lesiones acetoblancas positivas (A+) sin	1	20,0%
		Anoscopia	B-Anoscopia negativa	4	80,0%
Total				5	100%

Test Chi Cuadrado entre lesiones macroscópicas e informe de anoscopía

Hipótesis

Ho) Las lesiones macroscópicas no están asociadas con el informe de anoscopía.

H1) Las lesiones macroscópicas están asociadas con el informe de anoscopía.

Test Chi-Cuadrado

Probabilidad Asociada	0.103
-----------------------	-------

Dado que la probabilidad asociada = 0.103 es mayor que el nivel de significación $\alpha = 0.05$, no se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, en base a la evidencia desarrollada las lesiones macroscópicas no están asociadas con el informe de anoscopía.

Relación entre la carga viral plasmática (CVP) y la anatomía patológica.

Hipótesis

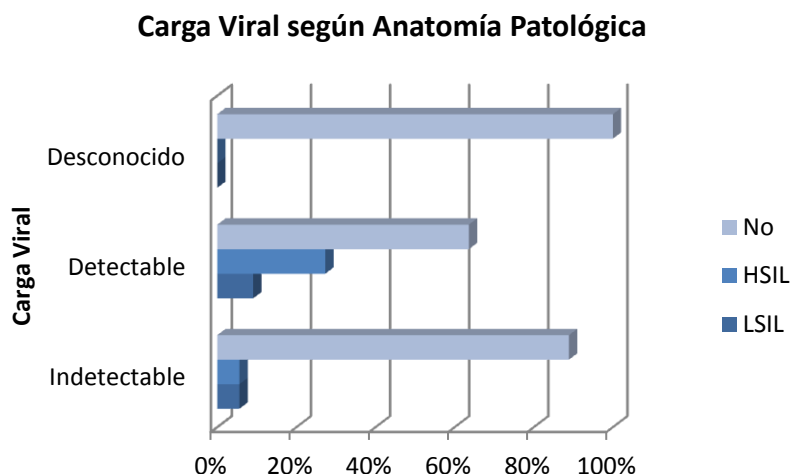
Ho) La carga viral no está asociada con la anatomía patológica.

H1) La carga viral está asociada con la anatomía patológica.

Test Chi-Cuadrado

Probabilidad Asociada	0.502
-----------------------	-------

Dado que la probabilidad asociada = 0.502 es mayor que el nivel de significación $\alpha = 0.05$, no se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, en base a la evidencia desarrollada la carga viral no está asociada con la anatomía patológica.



Aunque estadísticamente no se demostró una correlación entre la anatomía patológica y los niveles de CVP, hubo mayoría de lesiones displásicas en los pacientes con CVP detectables.

Relación entre los linfocitos CD4 y la anatomía patológica: no hubo diferencias entre el nivel de CD4 y la anatomía patológica de los pacientes. La media de CD4 varió entre 446 para los que tenían lesiones de bajo grado, 543 los de alto grado y 540 los no biopsiados (tabla 6). Sólo dos pacientes tenían CD4 debajo de 350 y presentaban condilomas múltiples sin signos de displasia.

Estadísticas Descriptivas de Linfocitos CD4 según Anatomía Patológica (tabla 6)

Anatomía Patológica	Media	Desvío Estándar	Mínimo	Máximo
LSIL	446,5	309,0	228	665
HSIL	543,8	129,7	409	693
No	540,0	251,2	106	1034

DISCUSION:

Se estudiaron 30 pacientes VIH positivos con anoscopía de alta resolución con el objeto de identificar la presencia de lesiones relacionadas al HPV y hacer diagnóstico y tratamiento temprano. Se detectaron 21 lesiones macroscópicas por condilomas múltiples (70%) y 17 pacientes (56%) presentaron lesiones acetoblancas positivas sin signos de displasia y 5 (16%) con signos de displasias. De acuerdo a la sospecha que generó la anoscopía se realizó biopsia en el 20% de los pacientes diagnosticándose lesiones de alto grado en el 13% y de bajo grado en el 6,7%.

Con respecto a la incidencia de condilomas en el presente trabajo se encuentra entre las mayores de acuerdo a la bibliografía revisada (15 al 62%), mayor en los varones homosexuales. [22-23] La prevalencia de displasias fue del 20%, inferior a la de otras series donde ascendió hasta un 54%. [3]

Piketty et.al. realizaron un seguimiento de pacientes VIH + desde 1992 a 2004 sobre la base de datos de un grupo de hospitales franceses en donde observaron que la incidencia de cáncer anal aumentó en la población VIH+ desde el año 1996. Identificaron 132 casos de cáncer anal incluyendo 124 hombres que tenían sexo con hombres (HSH) con un promedio de edad de 43 años. Al momento del diagnóstico, 103 pacientes estaban bajo TARV pero el

tratamiento no previno el cáncer anal. Esto apoya la necesidad de realizar programas de screening para la detección precoz de lesiones pre neoplásicas sobre todo en HSH por presentar un riesgo aumentado [24-25] En presente estudio observamos que el TARV no estaba en relación con la presencia de lesiones, aunque hubo más lesiones displásicas en los pacientes con carga viral detectable. Otro estudio realizado por el mismo autor sobre 45 pacientes VIH+ y HSH bajo tratamiento con inhibidores de proteasa a los que se les realizó citología anal y test de DNA en búsqueda de HPV mostró un 71% de citología anal anormal. Los resultados demostraron que existe una alta prevalencia de SIL anal incluyendo H-SIL a pesar de la reconstitución inmune por el TARV parecido a los hallazgos de nuestro trabajo.

En un estudio de casos controles realizado en Suiza por Engels y Madeleine se demostró que el riesgo de cáncer anal en esta población esta aumentado en pacientes con bajos niveles de linfocitos CD4+. Se observó que la inmunodepresión era mayor 6-7 años anteriores al diagnóstico de cáncer anal, lo que nos da a interpretar que la inmunosupresión cumple un papel importante en los estadios tempranos de la enfermedad, poniendo en evidencia la importancia de realizar un tratamiento antirretroviral precoz.[4] En contraste con este trabajo nosotros encontramos que no había relación entre los niveles de CD4 que presentaban los pacientes y la anatomía patológica ya que los que presentaron lesiones de alto grado tenían como media 543 CD4. En este sentido hay que apuntar que nuestra población tenía una buena inmunidad en general y no había pacientes progresados a estadios B o C.

Pokomandy et.al. realizaron un estudio de cohorte en Montreal con una población de HSH, VIH+ para investigar la adquisición de la infección por HPV.

Los participantes de este estudio eran seguidos cada 6 meses por 3 años. El 97,9% de los 247 participantes tenían por lo menos una media de 5 serotipos distintos de HPV siendo el más frecuente el 16 y 6. Concluyeron que dentro del canal anal de HSH VIH+ coexisten múltiples cepas de HPV aumentando así el riesgo de cambios displásicos. [2] En nuestro trabajo también observamos una alta prevalencia de infección por HPV ya que solo 4 pacientes de los 30 no tenían lesiones compatibles con dicha infección. También la población analizada en un 90% fueron HSH.

Richel et.al. publicaron un estudio prospectivo donde realizaron 311 anoscopias de alta resolución con biopsia de lesiones sospechosas. La población analizada eran pacientes VIH+ y HSH. Población muy similar a la de nuestro trabajo donde 90% eran HSH y el 100% de la población VIH+. Un 56% de los pacientes presentaron cualquier tipo de AIN. En nuestro estudio sólo 4 anoscopía fueron negativas. También observaron que no hay una relación evidente entre los niveles de CD4 y las lesiones anales por HPV pero si una relación con el tiempo de TARV donde se ve una disminución de la incidencia a mayor tiempo de TARV. [25] En nuestro trabajo también observamos que no hay relación entre los niveles de CD4 y las lesiones ya que los que presentaron HSIL tiene una media de 543 CD4

Las limitaciones del actual trabajo tienen que ver con el número acotado de pacientes y el poco tiempo de seguimiento, por lo que es importante la continuación del mismo para obtener resultados más concluyentes y de ser posible realizar la tipificación del HPV por técnicas de PCR para evaluar el riesgo oncogénico de acuerdo a las cepas que se encuentren.

CONCLUSIONES:

La población estudiada, VIH positiva en su mayoría HSH, presentó alta prevalencia de lesiones macroscópicas relacionadas al HPV (76% de condilomas)

Más del 50 % de las anoscopías mostraron lesiones acetoblancas positivas.

De acuerdo a la sospecha que generó la anoscopia se realizó biopsia en el 20% de los pacientes diagnosticándose lesiones de alto grado en el 13% y de bajo grado en el 6,7%.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de lesiones con el recuento de linfocitos Cd4 o la carga viral de los pacientes.

La anoscopia ampliada mostró ser útil para permitir un diagnóstico temprano de neoplasia anal, aún donde no hubo lesiones macroscópicas.

Se realizaron intervenciones quirúrgicas en un tercio de los pacientes y tratamiento médico no quirúrgico en casi la mitad de los mismos.

Es necesario continuar el seguimiento de los pacientes y aumentar el número de los mismos para obtener resultados más concluyentes.

CONSENTIMIENTO ESCRITO INFORMADO

Título del estudio

“Valor de la anoscopía de alta resolución como método screening en el diagnóstico preventivo de las lesiones producidas por HPV en pacientes con VIH”

Información para el paciente:

Se invita a Ud. a participar en un estudio encaminado a prevenir lesiones en la región anorrectal fundamentalmente las relacionadas el papilomavirus. Los papilomavirus humanos son virus que producen lesiones (tipo verruga/condilomas) en la piel y mucosas a las que infectan. Si bien la mayoría de estos microbios no producen enfermedad, existen algunos tipos que sí lo hacen aumentando la probabilidad de desarrollar tumores, por lo tanto es importante identificar el tipo de papilomavirus que afecta la lesión. Si Ud. decide participar en este estudio, se le realizará una inspección de la región perianal y anal y se le introducirá un pequeño cepillo para hacer un Papanicolau (similar a la que se realizan en mujeres para prevenir el cáncer de cuello uterino). También y se tomarán muestras con un hisopo húmedo de para analizar la presencia de ciertas células y se determinar si hay presencia de papilomavirus humano. En caso de encontrar alguna anomalía se le realizará una anoscopía de alta resolución para descartar enfermedades que pueden producir cáncer anorrectal.

Todos sus datos serán guardados en forma confidencial y su nombre no será revelado en caso de inspección. Tanto su decisión de participar o no en este

estudio como su renuncia en cualquier momento no afectarán sus derechos como paciente a ser tratado/a y controlado/a.

Yo,....., manifiesto que he sido informado/a de lo expresado más arriba y otorgo mi consentimiento de participar voluntariamente en el estudio.

Lugar y fecha:

Firma del paciente:

BIBLIOGRAFÍA:

[1] Chouhy D., Bolatti E., Piccirilli G., Sanchez A., Fernandez Bussy R. y Giri A. Identification of human papillomavirus type 156, the prototype of a new human gammapapillomavirus species, by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments *Journal of General Virology* (2013), 94, 524–533

[2] Pokomandy A.,Rouleau D., Ghattas G.,Vézina S.,Coté P., Macleod J., Allaire G., Franco E. and Coutlée F or the HIPVIRG Study Group.Prevalence, Clearance, and Incidence of Anal Human Papillomavirus Infection in HIV-Infected Men: The HIPVIRG Cohort Study .*The Journal of Infectious Diseases* 2009; 199:965–73

[3] Torres M., González C.,Romero J.,Viciano P.,Ocampo A., Rodríguez-Fortúnez P.,Masiá M.,Blanco J.,Portilla J.,Rodríguez C., Hernández-Novoa B.,Amo J. and Ortiz Anal human papiloma virus Genotype Distribution in HIV-Infected Men Who Have Sex with Men by Geographical Origin, Age, and Cytological Status in a Spanish Cohort.*M. J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(11):3512.

[4] Engels E. and Madeleine.Invited Commentary: Biological and Clinical Insights from Epidemiologic .Research Into HIV, HPV, and Anal Cancer.M.*American Journal of Epidemiology* July 30, 2013.

[5] Keith Alcorn. “Anal cancer screening may be appropriate for all women with HIV, French researchers suggest”. Extraído de: <http://www.aidsmap.com/anal-cancer-screening-may-be-appropriate-for-all-women-with-hiv-french-researchers-suggest/page/2781539/> (18/12/13)

- [6] Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, et al. Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. *Ann Intern Med.* 2008; 148: 728-736.
- [7] Rosa-Cunha I, DeGennaro VA, Hartmann R, Milikowski C, Irizarry A, Heitman B, et al. *AIDS Patient Care and STDs.* 2011 April; 25 (4): 213-219. doi:10.1089/apc.2010.0233.
- [8] Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010 May
- [9]. Farreras-Rozman *Medicina Interna- Decimoquinta edición 2004 Elsevier España S.A* capitulo 309 pág. 2477
- [10]Gross, Barraso. *Human papiloma virus infection: a clinical atlas.* Berlín, Wiesbaden: Ulstein Mosby,1997
- [11] Farreras; Rozman - “*Medicina Interna*”. Ed. Elsevier - 17º ed. Madrid - 2012 – Vol. 1 – Cap. 300, 286.
- [12] Cecchini, Emilio; González Ayala, Silvia E. – “*Infectología y Enfermedades Infecciosas*” – Ediciones Journal – Edición - país – año – Capítulo 16-107
- [13]. Harrison – “*Principios de Medicina Interna*” - Ed. Mc Graw Hill - 17º edición – 2009 – Vol. 1 – Cap. 182.
- [14] Palmieri, Omar J. - “*Enfermedades Infecciosas*” - Ed. McGraw Hill - 2º edición - Buenos Aires – 2005 – Cap. 41.

[15] Lupo, Sergio - “Clínica y Terapéutica de la infección por VIH y SIDA” - 1º edición – Rosario - URN – 2003 - Tomo I y II.

[16] WWY Tong, RJ Hillman, AD Kelleher, AE Grulich, A Carr. Anal Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma in HIV-Infected Adults. HIV Medicine. 2014; 15(2):65-76.

[17].Lupo S; Infecciones oportunistas en el paciente con HIV y Sida; Capítulo del libro “Terapéutica Clínica”. Pág. 667-674; 2011; Corpus editorial.

[18].Lupo S.; El paciente con HIV y Sida. Capítulo del libro “Terapéutica Clínica”. Pág. 655-666; 2011; Corpus editorial.

[19] Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, et al. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. Nature Medicine. March 7, 2010.

[20].Lupo S; “Eventos serios no Sida”; capítulo del libro Medicina Ambulatoria (en prensa)

[21] Stanley M, Winder D, Sterling J, Goon P HPV infection, anal intra epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues, 2012. Extraído de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/398>

[22]Savafi A, Gottesman L, Dailey T. Anorectal surgery in the HIV+ patients: update. Dis Colon Rectum 1991; 34: 299-304.

[23] Bannura G, Torres J, Melo C, Uribe S, Contreras J. Patología proctológica en pacientes portadores VIH. Rev Chil Cir 1998; 50: 493-497.

[24] Piketty C, Selinger-Lenemanb H, Grabarb S,; Duvivierb C, Bonmarchandf M, Abramowitzg L, Costagliolab D, Mary-Krauseb M Marked increase in the incidence of invasive anal cancer among HIV-infected patients despite treatment with combination antiretroviral therapy. Lippincott Williams & Wilkins ;AIDS 2008, 22:1203–1211

[25] Piketty C, Darragh T. †; Heard I. Da Costa M ; Bruneval,P; Kazatchkine M; Palefsky J. High Prevalence of Anal Squamous Intraepithelial Lesions in HIV-Positive Men Despite the Use of Highly Active Antiretroviral Therapy. Sexually Transmitted Diseases, February 2004, Vol. 31, No. 2, p.96–99

[26] Richel O., De Vries H., Dijkgraaf M., Van Noesel C., Prins J. Risk Factors for the Presence of Anal Intraepithelial Neoplasia in HIV+ Men Who Have Sex with Men. December 18, 2013 Plos one.